



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCIBILIDAD
EN LA OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES
MEDIANTE MUESTREOS NO INVASIVOS EN LA
BALLENA AZUL (*Balaenoptera musculus*)
DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
PRESENTA**

LETICIA MARÍA LILI CARRILLO

LA PAZ, B.C.S., JULIO 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 31 del mes de Mayo del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCIBILIDAD EN LA OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES MEDIANTE MUESTREOS NO INVASIVOS EN LA BALLENA AZUL (*Balaenoptera musculus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

Presentada por el alumno:

LILI Apellido paterno	CARRILLO materno	LETICIA MARÍA nombre(s)	Con registro:						
			B	1	5	0	2	4	7

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. DIANE GENDRON LANIEL
Directora de Tesis

DR. LUIS MANUEL ENRIQUEZ PAREDES
2o. Director de Tesis

DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ

DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ

DRA. FABIOLA GUERRERO DE LA ROSA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 15 del mes de Junio del año 2017

El (la) que suscribe BIÓL. LETICIA MARÍA LILI CARRILLO Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B150247 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. DIANE GENDRON LANIEL Y DR. LUIS MANUEL ENRÍQUEZ PAREDES

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCIBILIDAD EN LA OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES

MEDIANTE MUESTREOS NO INVASIVOS EN LA BALLENA AZUL (*Balaenoptera musculus*)

DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: Leticia_lili2@hotmail.com - dianegendroncimar@gmail.com - lmenriquez@uabc.edu.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BIÓL. LETICIA MARÍA LILI CARRILLO

Nombre y firma del alumno

Dedicatoria

A mi Mamá por el simple hecho de ser mi mamá, por todo lo que me enseñaste en la vida, por enseñarme a soñar, lograr lo que me propongo y volar muy alto, por todos tus consejos y apapachos, por todo ese coraje que siempre has demostrado para salir adelante a pesar de todo, gracias por nacerme.

A mi Papá por todas sus lecciones de vida, y todo el conocimiento que compartió conmigo, por haber hecho de mí una persona honesta y valiosa, porque siempre está ahí cuando lo necesito, por su ejemplo de fuerza y optimismo.

A mis hermanas Susana, Cristina y Sofía, por siempre ayudarme y hacerme sentir bien, por todas las alegrías que hemos compartimos juntas.

“Todo lo que vivamente imaginemos, ardientemente deseemos, sinceramente creamos y con entusiasmo emprendamos... inevitablemente sucederá”

Anónimo

I. AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Dra. Diane por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y ser mi directora de tesis, por compartir su conocimiento, experiencia y su pasión, gracias por ayudarme a cumplir el sueño de muchos años de conocer y estudiar a tan extraordinario ser vivo la ballena azul.

Al Dr. Luis Enríquez Paredes por haberme apoyado en cada momento de la estancia, por permitirme realizar los experimentos en el laboratorio y haber aguantado el mal olor de mis muestras y gracias porque a pesar de estar muy ocupado siempre te tomaste el tiempo de explicarme y ayudarme con el proyecto. Gracias también por proporcionarme los datos de las muestras de piel descamadas y biopsias.

A CICIMAR por formarme y permitirme pertenecer a la institución y darme un lugar en sus instalaciones y por los apoyos económicos. A CONACYT por la beca otorgada

A Cetacean Society International (CSI) y a Society for Marine Mammalogy (SMM) por los apoyos económicos con los cuáles su pudo desarrollar este trabajo.

Al Dr. Francisco García, Dr. Jaime Gómez y Dra. Fabiola Guerrero por formar parte de mi comité, por sus comentarios que me ayudaron a mejorar el trabajo, así como el tiempo que se tomaron para las juntas y las revisiones.

A Nelva Victoria Cota por su gran conocimiento en las técnicas del laboratorio, por ayudarme con los materiales y por responder las dudas que me surgieron en el proceso.

A Fabiola Guerrero por su ayuda y enseñanza en cuanto a los procedimientos necesarios para la técnica de restauración del ADN.

A la Dra. Karina Acevedo por darme un espacio en su laboratorio durante mi primera estancia, a ella y a su estudiante Carlos Domínguez por proporcionarme las muestras de ADN de los soplos.

A mis compañeros de laboratorio Geraldine, Mirsha, Erika, Sofy, Aurora y Cristy por compartir sus experiencias y hacer un ambiente amigable en el laboratorio. A Zamarrón, Arturo, Dany, Madeleine, Carlos, Lavinia y Alex por compartir la experiencia del campo, por sus ocurrencias y alegría.

A Martín Yohualpi Banuelos por ayudarme con los estadísticos y tener la paciencia de explicarme, gracias por tus postres, tu amistad y tu buena vibra.

A Nicole y Juan por haber sido como una familia durante la maestría, por su amistad y su ayuda. A tu familia Nicole por darme asilo y ayudarme durante la estancia.

A mis "brothis" Edgar, Jorge y Stephy por su amistad y sus locuras.

A Pablo y Pedro por todas sus ocurrencias, por siempre sacarme una sonrisa, por despertarme en la madrugada con sus llamadas y por hacer "parkour", por las noches de tacos y risas extrañas y sobre todo gracias por alimentarme cuando comía como pobre.

A mis amigos y compañeros de Cicimar, gracias por esos días de cotorreo, de pláticas, de playa, por ser excelentes personas y darme un espacio en sus vidas, gracias por tan gratas experiencias a su lado y por aguantar mis locuras.

A Diego por aparecer en mi vida, por estar al pendiente de mí, por toda tu ayuda y cariño, por hacerme reír tanto, por estar ahí para mí siempre.

II. RESUMEN

Los muestreos biológicos no invasivos han demostrado ser eficaces en estudios genéticos y ecológicos de mamíferos marinos. En este estudio se obtuvieron perfiles genéticos de individuos de ballena azul del Golfo de California mediante métodos no invasivos (heces, piel descamada, soplos) como un método alternativo a colectas semi-invasivas como las biopsias que potencialmente pueden alterar el comportamiento de los individuos. Se analizó la eficiencia y reproducibilidad en la obtención de datos genéticos de muestras de heces, piel descamada y condensados de soplo de la ballena azul empleando marcadores moleculares del sistema ZFX/ZFY para identificar el sexo, de la región control mitocondrial para identificar haplotipos y 8 microsatélites específicos. A su vez dentro de cada grupo de muestras se evaluó también el método de preservación (etanol al 96%, congeladas, dimetilsulfóxido) con respecto a la cantidad y calidad del ADN obtenido. La mayoría de los individuos empleados para el análisis, habían sido previamente genotipificados a partir de biopsias de piel, lo que permitió contrastar la eficiencia en la identificación de individuos a partir de muestras no invasivas como fuente de ADN. La obtención de secuencias de ADN con calidad suficiente para la identificación del haplotipo mitocondrial, resultó más consistente en las muestras de piel descamada en DMSO y en etanol al 96% (88% de eficiencia global); mientras que para la identificación del sexo, las heces congeladas obtuvieron el mejor porcentaje de eficiencia con un 65%. Por su parte, para el caso de los microsatélites las muestras de heces más recientes y preservadas en etanol al 96%, fueron las de mejor desempeño, con un 31% de eficiencia global. Se infiere que el bajo éxito de asignación del genotipo se debe al conjunto de la baja cantidad y calidad del ADN de las muestras. A pesar de la baja calidad de ADN obtenido se logró amplificar más de la mitad de las muestras pero realizando una amplificación del mismo producto de PCR original. Las muestras de piel descamada y heces preservadas en etanol recién recolectadas mostraron una mejor eficiencia en la identificación del individuo. Se concluye que la información genética proveniente de la piel descamada, heces y soplos de ballena azul analizados fue incompleta y requiere de un mayor esfuerzo de tiempo y recursos económicos para obtenerla.

III. ABSTRACT

Noninvasive biologic sampling has proven to be efficient in genetic and ecologic studies on marine mammals. Genetic profiles were obtained on blue whale individual from the Gulf of California using non-invasive methods (feces, sloughed skin and blows) as an alternative to replace semi-invasive methods such as biopsies that can potentially alter individual's behavior. We analyzed the efficiency and reproducibility on "data obtaining" from samples of faeces, sloughed skin and blows, using the ZFX/ZFY system to identify the sex, from mitochondrial control region to identify haplotypes and 8 specific microsatellites. The preservation method was also evaluated within groups (96% ethanol, frozen, dimethylsulfoxide) in regard to the quantity and quality of the DNA obtained. Most of the individuals used for the analysis had been previously genotyped using skin biopsies, which allowed us to contrast the efficiency on identification of individuals from non-invasive samples as a source of DNA. Obtaining DNA sequences with sufficient quality for mitochondrial haplotype identification, was more consistent in sloughed skin samples on DMSO and ethanol 96% (88% overall efficiency); while for sex identification, frozen faeces obtained the best result with a 65% of efficiency. Meanwhile, in the microsatellites case, the most recent feces samples preserved in ethanol 96%, had the best result, with an overall efficiency of 31%. We inferred that the low success in genotype assignment was due to the low amount of quality and quantity of DNA in the samples, despite the low DNA quality we manage to amplify more than half of the samples performing an amplification of the same product from the original PCR. Sloughed skin and feces samples preserved in ethanol that were most recently taken showed better efficiency identifying individuals. We conclude that genetic information obtained from sloughed skin, feces and blows in blue whale analyzed samples, was incomplete and requires more time and financial resources to obtain a reliable result.

IV. ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS	5
II. RESUMEN	7
III. ABSTRACT	8
IV. ÍNDICE	9
V. GLOSARIO	11
VI. ÍNDICE DE FIGURAS	14
VII. ÍNDICE DE TABLAS	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
3. OBJETIVO GENERAL	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 TRABAJO DE CAMPO	25
5.2 EXTRACCIÓN DEL ADN	28
5.3 RESTAURACIÓN DEL ADN	29
5.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL Y EL SISTEMA ZFX-ZFY DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES	30
5.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATELITES	30
5.6 REAMPLIFICACIÓN	31
5.7 CONTROL DE CALIDAD Y GENOTIPADO	31
5.8 ÉXITO EN LA AMPLIFICACIÓN Y EL GENOTÍPADO	33
5.9. IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS.....	33
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	34
6. RESULTADOS.....	34
6.1 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA MUESTRAS DE HECES.....	34
6.2 RESTAURACIÓN Y LIGACIÓN DEL ADN.....	36
6.3 EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD Y LA CALIDAD DEL ADN	37
6.4 ÉXITO EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA	39

6.5 ÉXITO EN LA REAMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA.....	40
6.6 REPRODUCIBILIDAD DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA	40
6.7 EFICIENCIA GLOBAL DEL USO DE LAS DIFERENTES CATEGORÍAS	42
7. DISCUSIÓN	43
7.1 CANTIDAD Y CALIDAD DE ADN	43
7.2 EFICIENCIA EN AMPLIFICACION Y REAMPLIFICACION	47
7.3 REPRODUCIBILIDAD Y EFICIENCIA GLOBAL.....	49
7.4 CONSIDERACIONES GENERALES	50
8. CONCLUSIÓN	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	63
ANEXO 1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE PIEL DESCAMADA Y BIOPSIAS POR EL PROTOCOLO DE SALES- PROTEINASA K.	63
ANEXO 2. RESTAURACIÓN DEL ADN	63
ANEXO 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL HAPLOTIPO MITOCONDRIAL (REGIÓN CONTROL) Y EL SEXO (ZFX/ZFY)	64
ANEXO 4. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES	65
ANEXO 6. TOTAL DE PORCENTAJES DE LOS TRES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA TIPO DE MUESTRA.....	70

V. GLOSARIO

Amplificación de ADN: Se lleva a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método básico de amplificación de material genético que consiste en el uso de oligonucleótidos sintéticos complementarios a los fragmentos de ADN a amplificar. En cada ciclo de PCR se comienza con un calentamiento para separar las dos cadenas. Posteriormente se disminuye la temperatura para que se produzca la hibridación de los primers y finalmente se vuelve a aumentar para que actúe la ADN polimerasa y se sintetice la nueva cadena de ADN (Raña, 2008).

Electroforesis en gel de agarosa: Método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, en el cual las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 (\log_{10}) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo (Puerta & Ureña, 2005).

Electroforesis capilar: Técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo condiciones de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en un capilar de sílice de diámetro muy pequeño. Es la modalidad más utilizada por su simplicidad operacional y versatilidad y requiere pequeños volúmenes de muestra (Osatinsky, 2007)

Genotipado o genotipificación: técnica que se utiliza para caracterizar y determinar la información genética de un organismo para diferenciarlo del resto y se realiza mediante marcadores moleculares como los microsatélites (Oliva & Vidal, 2006).

Haplotipo: Constitución genética de un cromosoma individual. Un haplotipo es una combinación de alelos ligados a múltiples loci que se transmiten juntos. Haplotipo se define como el conjunto de genes que determinan un cierto fenotipo.

Heterocigoto: Individuo con alelos no idénticos para un determinado gen o genes. La condición se denomina “heterocigosis” (Jáuregui-Rincon, *et al.*, 2006).

Inhibidores: componentes orgánicos que pueden presentar las muestras biológicas y que limitan la sensibilidad de la PCR. Se puede producir por el enmascaramiento de los cebadores impidiendo su unión al ácido nucleico (López-Vázquez, 2007).

Locus/Loci: Localización específica de un gen o una secuencia de ADN en un cromosoma (Locus- singular, loci-plural) (Vázquez-Lobo & García-Morales, 2014).

Microsatélite: Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases. Se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, por lo tanto son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional. Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (Vázquez-Lobo & García-Morales, 2014).

Nicks: es la ruptura de un enlace éster en un fosfato 5' con la liberación de un grupo hidroxilo 3'. La ADNasa produce nicks (Vázquez-Lobo & García-Morales, 2014).

Nucleasas: Enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace fosfodiéster en un ácido nucleico (Alberts & Bray, 2006).

Polimerasa: Enzima que se encarga de la replicación del ADN, partiendo de una cadena inicial o primer, la ADN polimerasa añade nucleótidos complementarios a la cadena modelo extendiendo la nueva cadena de ADN en dirección 5'-3' (Maldonado-Jiménez, 2002).

Secuenciación del ADN: Procedimiento destinado a determinar la secuencia nucleotídica en una cadena de ADN (Teijón-Rivera & Garrido-Pertierra, 2006).

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de muestreo. Región suroeste del Golfo de California que comprende desde el Parque Nacional Bahía de Loreto hasta la Bahía de La Paz.	26
Figura 2. Muestreo de Soplos. Drone phantom 2 con cajas de Petri adaptadas en la parte inferior adheridas a tubos de goma.	27
Figura 3. Concentraciones de ADN de las muestras de heces con los diferentes métodos de extracción y un grupo de 8 biopsias para comparar las diferencias en la cantidad de material genético con muestra semi-invasiva y no invasiva. Extracción por sales (n= 3), kit de tejido y sangre (n=10) y kit específico para heces (QIAGEN) (n=13).	35
Figura 4. Concentración de ADN de las muestras de heces con los diferentes tratamientos de restauración y la ligación.	36
Figura 5. Calidad del ADN en los cuatro grupos de muestras y sus diferentes preservación, S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%	37
Figura 6 Cantidad del ADN en ng/µl en los cuatro grupos de muestras y sus diferentes categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%	38
Figura 7. Porcentaje de éxito en la amplificación de los cuatro grupos demuestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%	39
Figura 8. Porcentaje de éxito en reamplificación en los cuatro grupos de muestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO,	

PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96% 40

Figura 9. Porcentajes de éxito en la reproducibilidad en los cuatro grupos de muestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%..... 41

VII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de muestras utilizadas y sus diferentes categorías de la forma en la que se preservaron.....	28
Tabla 2.- Condiciones para el control de calidad en geles de agarosa para cada marcador molecular.....	32
Tabla 3.- Porcentajes de probabilidad global de amplificación, reamplificación y reproducibilidad para todas las categorías de muestras y los tres marcadores moleculares.....	43
Tabla 4. Marcadores microsatélites, cebadores y tamaño en pares de bases (pb)	66
Tabla 5. Combinación que se utilizó para los microsatélites, cada combinación con fluorocromo diferente (Ned:Negro;Fam:Azul;Vic:Verde)	67
Tabla 6. Concentración y calidad del ADN por cada muestra en sus diferentes formas de preservación.....	67
Tabla 7. Porcentajes de amplificación (A), reamplificación (R) y reproducibilidad (Re) de los tres marcadores moleculares (Haplotipo mitocondrial, identificación del sexo y los 8 microsatélites) para cada grupo de muestras no invasivas.	70

1. INTRODUCCIÓN

Los grandes avances en las técnicas de genética molecular han ampliado considerablemente el conocimiento de la historia de vida y la dinámica de las poblaciones de un gran número de especies silvestres. Estas técnicas pueden ser aplicadas a cualquier variedad de organismos (Green *et al.*, 2007) y su uso en todas las disciplinas biológicas se ha generalizado desde la primera década del siglo XIX (Vázquez-Lobo & García-Moral, 2014). Como consecuencia, se han generado una vasta gama de marcadores moleculares con la capacidad de proporcionar información relevante sobre la variabilidad genética, linajes maternos, relaciones de parentesco y la identificación de individuos (Hoelzel *et al.*, 1998; Adams-Lara & Rosel, 2006).

Para muchas especies de cetáceos, que presentan una alta capacidad migratoria, sigue siendo prioritario entender los factores que determinan la estructura genética de sus poblaciones (conectividad). Esta información facilita el generar planes de conservación adecuados, especialmente para especies protegidas o en estatus de peligro de extinción. Sin embargo, la colección de material genético en fauna silvestre representa con frecuencia un reto logístico, particularmente en este grupo de organismos acuáticos (Green *et al.*, 2007).

La toma de biopsias de piel y grasa mediante dardos lanzados con ballestas y diseñados para este fin (Lambertsen, 1987), ha sido el método más frecuentemente utilizado para la recolección de piel y grasa cutánea como fuente de tejido para análisis genéticos y otros tipos de análisis moleculares. Sin embargo, este tipo de biopsias han sido consideradas inapropiadas para individuos jóvenes o pequeños (Clapham & Mattila, 1993), además de que pueden causar alteraciones en el comportamiento natural y sesgar las observaciones en estudios etológicos. No obstante, gracias a las técnicas empleadas en la biología molecular tales como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), han permitido el análisis de diferentes tipos de muestras biológicas obtenidas mediante protocolos no invasivos y en

pequeñas cantidades, razón por la que se ha incrementado su uso en diversas aplicaciones con respecto a los protocolos semi-invasivos en estudios de conservación de especies, particularmente en estudios etológicos que buscan la menor interacción con los sujetos de estudio.

Un muestreo no invasivo es aquel con el que se obtiene material biológico sin la necesidad de capturar, manipular o incluso observar a los individuos investigados (Taberlet *et al.*, 1999). El muestreo no invasivo ha permitido conducir estudios genéticos de diversas especies animales en su hábitat natural, reemplazando la obtención de muestras semi-invasivas como son las biopsias o toma de sangre. Desafortunadamente los muestreos no invasivos tienen ciertas restricciones debido a que comúnmente se obtienen cantidades limitadas de ADN y comprometidas en cuanto a su calidad, degradado y presencia de contaminantes en el extracto (Taberlet *et al.*, 1999; Broquet *et al.*, 2006). Aunque el análisis puede mejorar mediante la recolección de muestras biológicas (i.e. pelo, plumas, heces o piel) justo después de que el animal los deja atrás (Taberlet *et al.*, 1999).

La ballena azul (*Balaenoptera musculus*) se convirtió en el principal objetivo de la industria ballenera a principios del siglo XX. Al menos 9,000 individuos fueron cazados en el Océano Pacífico Norte, principalmente fueron capturadas a lo largo de la península de Baja California, México, en el sur de las islas Aleutianas y al oeste de la península de Kamchatka (Stafford *et al.*, 2001). Aunque en la actualidad la caza de ballenas ha cesado, la mayor parte de las poblaciones de ballena azul en el mundo aún no se han recuperado (Torres-Florez *et al.*, 2014), por lo que la especie aún está catalogada como especie “en peligro de extinción” en la Lista Roja de especies amenazadas de la UICN (Reilly *et al.*, 2008).

El Pacífico Nororiental alberga la población de ballenas azules mejor recuperada después de la caza ballenera ocurrida entre 1905 y 1971 (Monnahan *et al.*, 2014) con una actual abundancia estimada de 2,000 ballenas azules (Calambokidis y Barlow, 2004). Esta es el remanente poblacional más grande de la

especie a nivel mundial. Su presencia en aguas mexicanas es estacional (Noviembre y Julio) coincidiendo con los cambios de estación en la productividad primaria entre el Golfo de California durante el invierno. El Golfo de California es una región de alimentación, reproducción y crianza de esta especie (Gendron, 2002).

Siguiendo los lineamientos del Programa de Acción para la Conservación de Especies ballena azul (PACE) de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) se ha enfocado la investigación de esta especie hacia el comportamiento y el uso del hábitat, así como a la interacción con las embarcaciones de observación ecoturística. Lo anterior se ha logrado mediante el seguimiento de individuos focales por periodos prolongados (horas), lo que restringe el uso de muestreos que sean invasivos. En consecuencia, el presente trabajo explora fuentes alternativas para la obtención de material genético a partir de protocolos de muestreo no invasivos tales como la piel descamada, las heces y los soplos para identificación de individuos.

2. ANTECEDENTES

Los estudios genéticos de especies silvestres por medio de marcadores moleculares son numerosos y han demostrado que el material genético obtenido a partir de muestras biológicas no invasivas ha resultado adecuado en especies de hábitats terrestres (Gerloff *et al.*, 1995; Gagneux *et al.*, 1997; Bellemain *et al.*, 2005). La recolección de las muestras es relativamente fácil y oportunista, como en el caso de heces de varias especies de cánidos (Paxinos *et al.*, 1997), león de montaña (Ernest *et al.*, 2000), lince (Palomares *et al.*, 2002), aves (Idaghdour *et al.*, 2003) y muchas otras especies (Gerloff *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 2000; Lathuilliere *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001).

En el ambiente acuático, particularmente para especies marinas, las muestras de materia fecal han sido utilizadas como fuente de información, tanto a

nivel individual como poblacional, para una gran variedad de aplicaciones. Particularmente en los cetáceos, las heces han permitido estudiar el estado reproductivo (Rolland *et al.*, 2005), niveles de estrés (Houser *et al.*, 2011), composición de la dieta (Jimenez-Pinedo, 2010) así como cargas parasitarias (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Reboredo-Fernández *et al.*, 2015).

Análisis genéticos realizados a partir de muestras no invasivas en diversas especies de cetáceos mysticetos y odontocetos han permitido usar marcadores moleculares de microsatélites para revelar la estructura genética y la identidad de las poblaciones de delfín manchado (Green *et al.*, 2007), el dugón (Tikel *et al.*, 1996), la ballena franca (Gillett *et al.*, 2008), y otras especies (Gladden *et al.*, 1999; Maiers *et al.*, 1996; Adams & Rosel, 2006; Attard, 2010; Quintela *et al.*, 2014; Torres-Florez, 2014).

Si bien el análisis genético de heces recolectadas en los ambientes terrestres se ha convertido en método bien establecido (Paxinos *et al.*, 1997; Taberlet *et al.*, 1997; Palomares *et al.*, 2002), los estudios genéticos del ADN en heces de cetáceos aún son escasos debido a que es más complejo encontrar heces en el mar. A pesar de ello se han desarrollado protocolos de muestreo y extracción de ADN a partir de heces en un medio de ambiente marino. A partir de ello se han demostrado que las heces son una apropiada fuente de ADN para analizar a poblaciones; permitiendo la identificación de especies e individuos (Green *et al.*, 2007) y la comparación de su rendimiento y eficiencia con respecto a las de los perfiles genéticos obtenidos a partir de biopsias (Gillett, 2008).

La piel descamada también ha sido usada como como fuente de ADN para análisis genéticos de poblaciones (Amos *et al.*, 1992; Valsecchi *et al.*, 1998). Como en todos los mamíferos existe una tasa de recambio celular constante en el epitelio, continuamente mueren células y al mismo tiempo hay una producción de células nuevas (Welsch & Sobotta, 2009). En el caso de ballena azul se demostró que todos los individuos descaman y que es probable que las temperaturas superficiales del

mar promueven mayor tasa de descamación (Gendron & Mesnick, 2001) así como efectos de la radiación solar en la piel (Morales-Guerrero, 2016)

Una relativamente nueva estrategia para obtener información genética de mamíferos marinos es mediante la toma de muestras de soplos. Este tipo de muestra contiene secreciones de las vías respiratorias entre otros fluidos biológicos con los que se pueden responder gran cantidad de aspectos biológicos y salud de los individuos. Este novedoso muestreo no invasivo ha sido utilizado para realizar diversos análisis en cetáceos. Se han logrado examinar hormonas reproductivas con análisis del estado hormonal mediante la cuantificación y presencia de las mismas (Hogg *et al.* 2009). Otros estudios han evaluado la salud de diferentes especies de cetáceos mediante técnicas moleculares para la detección de bacterias respiratorias, con la finalidad de monitorear las fluctuaciones de las bacterias y como indicadores de los cambios en la salud de las ballenas (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010; Raverty *et al.* 2017).

El estudio genético a partir de soplos se ha realizado hasta el momento en delfines en cautiverio, tomando las muestras con tubos estériles colocados sobre los orificios nasales, este estudio logró obtener perfiles genéticos a partir de microsatélites, realizando una comparación con muestras de biopsias lograron demostrar que este tipo de muestras contiene células provenientes de los pulmones de las cuáles es posible obtener suficiente material genético de buena calidad para realizar estos análisis genéticos (Frère *et al.*, 2010).

Por la naturaleza de estos tipos de muestra (heces, piel descamada y soplos) es de esperar que la cantidad y calidad del ADN sea pobre; a consecuencia de la degradación que estas muestras presentan. Al estar fragmentado, es necesario implementar estrategias que aumenten el éxito de la amplificación del ADN y eleven la calidad del material genético para ayudar a mejorar los análisis a partir del muestreo no invasivo (Guerrero de la Rosa *et al.*, en revisión.; Bonin *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que el tipo de fijador, las condiciones en las que se mantiene después de fijado (preferentemente congelado en condiciones oscuras) y el tiempo de fijación pueden influir en la degradación del ADN (Pusch *et al.*, 1998; Imyanitov *et al.*, 2001). Las técnicas de restauración del ADN fueron propuestas para restaurar tejidos embebidos en parafina con ADN antiguo implementando procesos pre-PCR con la ayuda de la polimerasa para restaurar los nicks o mellas generados por la degradación y la ruptura del ADN. Las rupturas del ADN se presentan aleatoriamente en una hebra, la acción de la polimerasa restaura los espacios después de la rehibridación del ADN con la ayuda de la cadena complementaria como plantilla. La utilidad de este proceso es la obtención de cadenas integra que permitirán la amplificación de fragmentos más largos (Pusch *et al.*, 1998).

El estudio más reciente que probó la metodología de restauración de ADN en muestras de heces se realizó con el cachalote (*Physeter macrocephalus*). En este estudio se usaron diferentes marcadores moleculares (entre ellos el sistema ZFX/ZFY) para la identificación del sexo. Se demostró que es posible aumentar la calidad del ADN y mejorar el éxito de la PCR después de la reconstitución de las cadenas de ADN degradadas (Guerrero de la Rosa *et al.*, *en rev*). Esta técnica alternativa se exploró en el presente estudio para obtener cadenas más largas de ADN y poder incrementar el éxito de la amplificación por PCR.

Los estudios genéticos realizados con biopsias de la ballena azul del Golfo de California han explorado la estructura e identidad genética de la población, tanto con marcadores mitocondriales (haplotipos de la región control) como con marcadores nucleares (microsatélites). Asimismo se han evaluado la influencia del nivel de parentesco en los distintos niveles de asociación temporal y espacial (Enríquez-Paredes, 2005; Costa-Urrutia *et al.*, 2013). En conjunto, estos estudios de biopsias han demostrado la existencia de una sola unidad poblacional a pesar de su amplia distribución. Sin embargo, existe evidencia que sugiere una estructura genética a escala fina, consecuencia de agregaciones sociales no aleatorias y una

alta fidelidad a áreas específicas dentro del golfo, particularmente de las de hembras con cría. Recientemente se ha inferido que las agregaciones de ballena azul del Golfo de California presentan un tamaño efectivo poblacional “genéticamente saludable”, reafirmando la función ecológica del Golfo de California como un hábitat de crianza y preservación genética de la especie (Victoria-Cota, 2010; Costa-Urrutia *et al.*, 2013). Todos los estudios realizados hasta el 2017 con marcadores microsatélites en las ballenas azules que el Golfo de California han empleado muestras obtenidas con métodos semi-invasivos (biopsias), lo que provee una línea de base para la comparación de los resultados a partir de muestras no-invasivas (heces, piel descamada y soplos) con calidad de ADN presumiblemente menor.

Aún con esta información, únicamente se tiene muestreado aproximadamente la mitad de los individuos que se conocen por foto-identificación en el Golfo de California. Por esta razón es necesario obtener la información genética del resto de los individuos. En este estudio probamos diferentes tipos de muestreos no invasivos (heces, piel descamada y soplos) de ballenas azules para incrementar la información genética de los individuos y su identificación a partir de marcadores moleculares.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar la eficiencia de distintos tipos de muestras no invasivas (heces, piel descamada y soplos) en la identificación molecular del sexo, obtención del haplotipo materno y genotipificación en individuos de ballena azul del Golfo de California.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la cantidad y calidad del ADN de los diferentes tipos de muestras no invasivas.

- Genotipificar las muestras por medio de marcadores microsátélites
- Identificar el sexo y asignar los haplotipos maternos de los individuos.
- Evaluar la eficiencia de los métodos no invasivos por medio de la comparación de resultados previos realizados a partir de piel de biopsias de los mismos individuos.
- Comparar la eficiencia de las muestras no invasivas con respecto a resultados previos obtenidos con muestras semi-invasivas de esta población

4. JUSTIFICACIÓN

El muestreo no invasivo permite obtener información sobre el comportamiento de individuos focales, así como de los individuos con quienes se asocian, minimizando la interacción del observador. Actualmente se cuenta con un historial de recapturas fotográficas de los individuos que abarca desde 1988 a la fecha. El Laboratorio de Ecología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) ha identificado los linajes maternos mitocondriales, genotipificado y sexado molecularmente a numerosos individuos en esta base de datos. Contar con un tipo de muestra no invasiva que permita la identificación individual confiable y 100% reproducible mediante el uso de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares complementaría la información obtenida a partir de biopsias de piel y garantizaría la casi nula interacción con los sujetos de estudio, requisito indispensable para estudios de tipo etológico. Determinar la identidad individual en la ballena azul mediante muestras no invasivas tiene relevantes implicaciones en estudios de carácter poblacional y ecológico. Esto es particularmente relevante en estudios con un componente etológico (interacciones específicas). Se espera que si la eficiencia de las muestras no invasivas es adecuada, en posteriores estudios se pueda ampliar el conocimiento sobre los individuos de la población del Pacífico

noreste que habitan temporalmente el Parque Nacional de Bahía de Loreto. Entender el comportamiento de los individuos puede ayudar a la conservación en esta zona de crianza donde actualmente se llevan a cabo actividades de ecoturismo. Esto motivó un estudio etológico desde el 2009 que fue posible dado la extensa base de datos del historial de individuos identificados.

5. METODOLOGÍA

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación a largo plazo que se desarrolla en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) coordinado por la Dra. Diane Gendron desde 1988. El proyecto investiga las ballenas azules de la población del Pacífico Nororiental que realizan su migración anual al suroeste del Golfo de California. Esta zona ha sido reconocida como una zona de alimentación, reproducción y crianza de la ballena azul (Gendron, 2002). La temporada de estudio comprende de enero y abril de cada año cuando se obtienen muestras de piel descamada, heces, soplos y algunas biopsias, particularmente en la región Suroeste del Golfo de California, entre Bahía de La Paz y el Parque Nacional Bahía de Loreto (Fig. 1). Esta región es la principal zona donde se realiza el proyecto y donde se obtuvo la mayor parte de las muestras empleadas en el presente trabajo.

5.1 TRABAJO DE CAMPO

EL trabajo en campo se realizó a bordo de embarcaciones menores (pangas) utilizando el protocolo del Laboratorio de Cetáceos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN). Durante los intervalos en los que la ballena se mantiene en superficie, cada individuo fue fotografiado de ambos flancos para su posterior integración al historial de avistamientos y catálogo de foto-identificación de CICIMAR-IPN. Estos registros clasifican e identifican los individuos mediante la

forma de su aleta dorsal y los patrones de pigmentación corporal, siguiendo los criterios descritos por Gendron & Ugalde de la Cruz (2012).

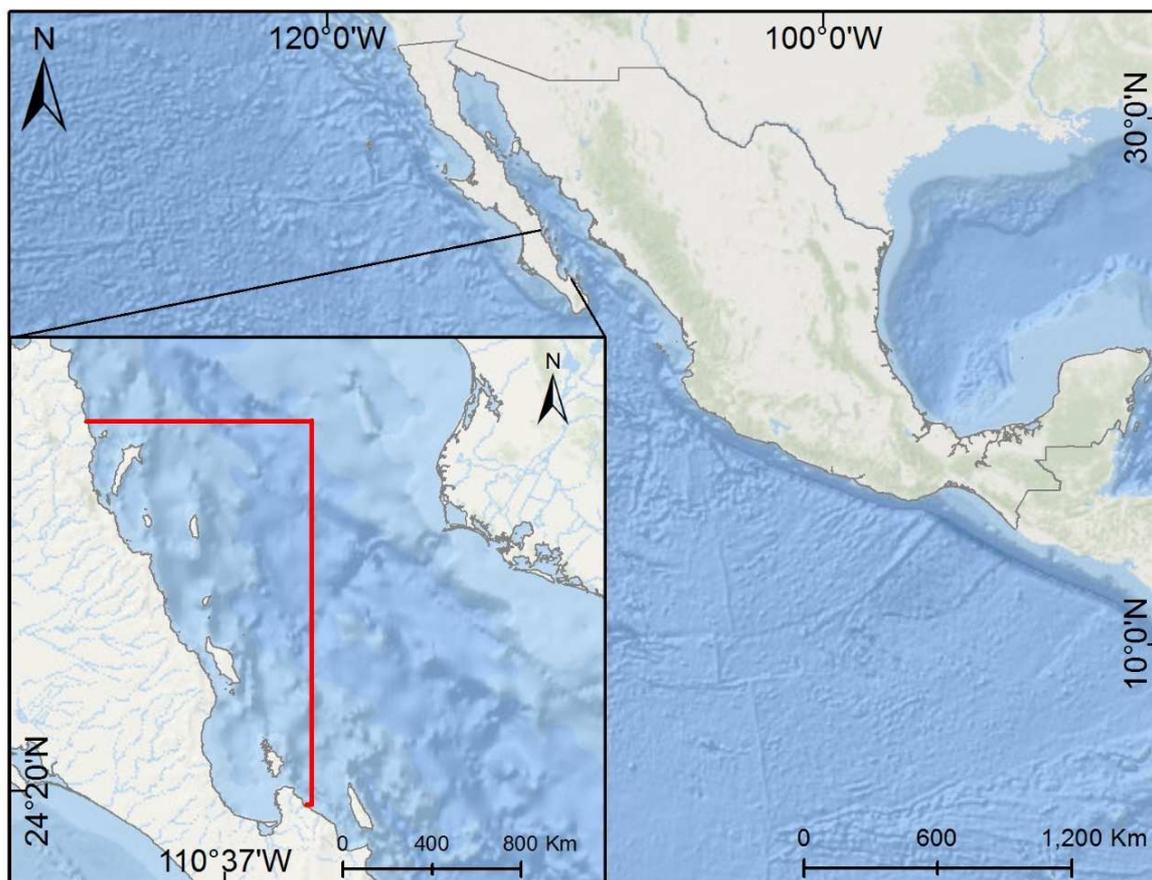


Figura 1. Área de muestreo. Región suroeste del Golfo de California que comprende desde el Parque Nacional Bahía de Loreto hasta la Bahía de La Paz.

La recolección de muestras de heces de ballena azul se realizó conforme al protocolo descrito por Flores-Cascante & Gendron (2012), tomando fragmentos del material fecal en la “huella” que queda en la superficie marina inmediatamente después de que el organismo realiza una inmersión prolongada. Procurando drenar la mayor cantidad de agua de mar, las heces fueron preservadas y almacenadas de dos formas: una parte en recipientes de plástico de 500 mL fueron preservados con etanol al 96% y otra directamente en crioviales de 5 mL transportados en una

hielera con bloques de gel congelado para al final del día congelarlas a -20°C en un refrigerador (Tabla 1).

Las muestras de soplos de ballena azul fueron obtenidas con la ayuda de cajas Petri pequeñas adaptadas a la parte inferior de un Drone Phantom 2. (Fig. 2). Una vez que la ballena sale a la superficie, el dron es dirigido hacia sus fosas nasales, aproximadamente a una distancia de 5 m de altura, recolectando de esta forma mucosa nasal expulsada durante la exhalación, misma que fue preservada en RNAlater®.



Figura 2. Muestreo de Soplos. Drone phantom 2 con cajas de Petri adaptadas en la parte inferior adheridas a tubos de goma (Flecha).

Las muestras de piel descamada se recolectaron utilizando una red manual de acuario en la superficie del mar como se describe en Gendron & Mesnick (2001), almacenándolas y preservándolas en tres protocolos distintos: en crioviales a -20°C , a temperatura ambiente con dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% en NaCl 5 M y en etanol al 96% (Tabla 1).

Tabla 1. Número de muestras utilizadas y sus diferentes categorías de la forma en la que se preservaron.

Muestras	Tipo de preservación	No. de muestras
Soplos	RNAlater	8
Heces	Congelación	13
	Etanol 96% (2016)	13
	Etanol 96% (2008-2015)	20
Piel descamada	Congelación	16
	DMSO	16
	Etanol 96%	16
Biopsias	Congelación	16
	DMSO	14
	Etanol 96%	17
Total		149

De las 13 muestras de heces congeladas y en etanol al 96% pertenecían a 6 ballenas por lo que dentro de estas categorías se presentaron 2 o más replicas por individuo.

Finalmente se agregó un grupo de biopsias recolectadas mediante una flecha modificada con una punta cilíndrica hueca de acero inoxidable de 7 mm de diámetro y 40 mm de largo enroscada en el extremo. Esta flecha se dispara con una ballesta para extraer la porción de piel y grasa del costado de la ballena mediante el protocolo descrito en Barrett-Lennard *et al.* (1996).

5.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

Para las muestras de heces se probaron tres métodos de extracción de ADN con la finalidad de evaluar con cuál de ellos se puede obtener la mayor cantidad y mejor calidad de material genético. Un primer método fue el de extracción universal

con sales descrita por Aljanabi & Martinez (1997) utilizada para las muestras de piel descamada y biopsias descritas más adelante. El segundo método empleado fue con el kit comercial QIAGEN DNeasy Blood & Tissue y finalmente, como tercera opción, se utilizó el kit comercial específico para heces QIAGEN QIAAMP DNA Stool mini kit. A este último protocolo se añadió un paso que consistió en precipitar y lavar el ADN en isopropanol al 99%, y etanol al 96% respectivamente, finalmente el precipitado fue secado en una centrífuga de vacío y resuspendido en 15 μ L del buffer AE incluido en el kit.

La extracción del ADN de los soplos fue realizada usando TRIzol Reagent (Invitrogen) bajo las especificaciones del fabricante. Mediante la adición de cloroformo haciendo que la muestra se separe en dos fases (acuosa y orgánica), recuperando así la fase acuosa donde se encuentra el ADN para finalmente recuperándolo mediante centrifugaciones.

La extracción de piel descamada y de biopsias de piel se realizó colocando en un portaobjetos entre 30 y 50 mg de tejido, cortándolo finamente con ayuda de una navaja para proceder a la digestión con Proteinasa K y la subsecuente precipitación de proteínas con sales (Aljanabi & Martinez, 1997) (Anexo 1). Las muestras de piel descamada se analizaron por espectrofotometría empleando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para evaluar la cantidad y la pureza de las extracciones de ADN,. Por último, la concentración de ADN se estandarizó alrededor de los 25 ng/ μ L.

5.3 RESTAURACIÓN DEL ADN

El método de restauración se basa en que la degradación del ADN está asociada a rupturas aleatorias de algunas de las cadenas. La acción de la polimerasa restaura los cortes después de la rehibridación del ADN, utilizando la otra hebra como molde. Debido a la posición aleatoria de los sitios de ruptura, la reconstrucción del fragmento provee secuencias lo suficientemente largas para una

amplificación exitosa (Imyanitov *et al.*, 2001; Bonin *et al.*, 2003;). Para este procedimiento se tomaron aproximadamente 100 ng del ADN de las muestras originales y se restauró conforme lo propuesto por Bonin *et al.* (2003; Anexo 2).

Con el objetivo de obtener cadenas de ADN más largas, las muestras tratadas con la restauración también fueron sometidas a un paso de ligación en una solución que incluyó 18 µl del ADN restaurado, 2 µl del buffer 10X ligasa y 200U de T4 ADN ligasa para un volumen final de 21 µl. Cada reacción se incubó 1 h intercalando ciclos de temperatura de 10°C y 25°C c/u (Guerrero de la Rosa *et al.*, en rev.). La restauración y ligación se llevó a cabo exclusivamente en muestras de heces.

5.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL Y EL SISTEMA ZFX-ZFY DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

Para determinar el haplotipo de cada muestra se utilizó un fragmento de ADN mitocondrial de aproximadamente 540 pares de bases correspondiente al dominio hipervariable I de la región control mitocondrial (dHv1-RC-mt). Para su amplificación se utilizó el procedimiento y los cebadores descritos en Enríquez-Paredes (2005) (Anexo 3). El sexo de cada individuo se determinó aproximadamente con 40 ng/µl de ADN usando amplificaciones por PCR con cebadores cuyas secuencias blanco se localizan en los cromosomas sexuales (Schenider-Gädicke *et al.*, 1989; Bérubé & Palsbøll, 1996). La amplificación para ambos marcadores (región control y sistema ZFY-ZFX) se realizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) bajo las mismas condiciones descritas por Victoria-Cota (2010) (Anexo 3).

5.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATELITES

Se seleccionaron 8 microsatélites polimórficos y específicos de misticetos previamente evaluados en la ballena azul (Victoria-Cota, 2010; Costa-Urrutia *et al.*, 2013): DirFCB017 (Buchanan *et al.*, 1996); Ev037 (Valsecchi & Amos, 1996);

AC045, AC082 y CA234 (Berubé *et al.*, 2005), AC087, GATA098 y GATA417 (Palsbøll *et al.*, 1999) Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron con las mismas concentraciones y bajo las condiciones descritas por Victoria-Cota (2010), usando cuatro combinaciones (Anexo 4).

5.6 REAMPLIFICACIÓN

Observamos que la amplificación de los marcadores moleculares en las primeras pruebas de amplificación mostraba una señal baja en la electroforesis por geles de agarosa. Es por ello que para obtener una amplificación de los productos de PCR se realizó una reamplificación. Este procedimiento consistió en una doble amplificación, es decir, justo después de la primera amplificación se realizó una nueva reacción de PCR con el mismo marcador molecular de la primera amplificación. Esta vez se agregó 1 o 2 µl del producto de PCR proveniente de la primera amplificación. Posteriormente se amplificó nuevamente en el termociclador bajo las mismas condiciones de la primera amplificación. De esta forma el ADN que se había amplificado vuelve a amplificarse, generando mayor número de copias de las cadenas, dando una señal visible en los geles de agarosa. Este procedimiento se realizó para todas las muestras de piel, heces y soplos y con los tres marcadores moleculares.

5.7 CONTROL DE CALIDAD Y GENOTIPADO

La mezcla de reacción se preparó por separado para cada grupo de muestras para disminuir los errores de pipeteo y agilizar el proceso de preparación de las muestras. Se usaron grupos de tiras de 8 tubos o placas de 96 pozos para sistematizar el proceso de amplificación, incluyendo un control positivo y uno o dos controles negativos en cada ronda de amplificación. Esto con el objeto de garantizar la adecuada preparación de la mezcla y detectar problemas de contaminación en los reactivos.

Para evaluar el éxito de la amplificación se realizaron electroforesis con geles de agarosa a diferentes concentraciones, cantidad de la muestra y el tiempo que se corrió el gel dependiendo el tipo de marcador que se utilizó la cantidad de la muestra varió (Tabla 3).

Tabla 2.- Condiciones para el control de calidad en geles de agarosa para cada marcador molecular

Marcador molecular	Gel de Agarosa	Bromuro de etidio (5µg/µl)	Cantidad de muestra µl	Tiempo (minutos)
Región control (ADNmtd)	1.5%	0.5	5	40
Sexo (Sistema ZFX-ZFY)	3%	0.5	20	60
Microsatélites	2%	0.5	6.5	30

Las placas con los productos de PCR para los microsatélites fueron enviadas a un laboratorio comercial (Seqxcel, Inc), para realizar el análisis de fragmentos que consiste en separar los productos de PCR según su peso molecular a través de una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems). Los tamaños de los alelos se evaluaron con un marcador de peso molecular (GeneScan™ 600® LIZ, Applied Biosystems) agregado a cada muestra durante la electroforesis.

La asignación del tamaño de los alelos y la construcción del genotipo multilocus de cada muestra se realizó con la ayuda del programa GeneMarker V1.71 (SoftGenetics LLC). Con este programa se leyeron los archivos digitales de los electroferogramas que son gráficos con los resultados del análisis de la electroforesis capilar en los que se registra la intensidad de la señal fluorescente para cada alelo y se estima el tamaño de estos (Holland & Parson, 2011).

Las muestras de región control del ADN mitocondrial se limpiaron mediante un sistema de columnas de purificación Concert™ (Gibco-BRL Rapid PCR

Purificación System) y se mandaron secuenciar por medio de una reacción cíclica en un termociclador bajo las mismas condiciones descritas por Enríquez-Paredes (2005). Se realizó una electroforesis capilar en secuenciadores automáticos ABI Prism® 377 (Vertical Gel Automated DNA Sequencer) y finalmente editar las secuencias mediante el programa Sequencher™ 3.0.1, o bien el programa ChromasPro 1.15 (Technelysium Pty Ltd20) (Enríquez-Paredes, 2005).

5.8 ÉXITO EN LA AMPLIFICACIÓN Y EL GENOTÍPADO

Una vez obtenidos los resultados de los análisis de fragmentos, se realizó una base de datos con cada una de las muestras y los 8 microsatélites, en donde se fue registrando los alelos que se observaron en el electroferograma. El éxito en la amplificación se determinó calculando el porcentaje de las muestras que sí amplificaron, mientras que el éxito en la asignación de los genotipos se estimó comparando los datos obtenidos con las bases de datos de genotipos obtenidos a partir de biopsias. De esta forma se compararon; si los alelos coincidían se contaba como éxito, si alguno o ninguno de los alelos coincidían, se contaron como error.

5.9. IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS

Se compararon los resultados obtenidos de las muestras no invasivas (heces, piel y soplos) con la base de datos de cada individuo de ballena azul foto-identificado del CICIMAR con la información generada a partir de marcadores genéticos de sexado molecular y las secuencias de la región control mitocondrial o haplotipos maternos (Enríquez-Paredes, 2005). Además se cuenta con el genotipo multilocus basado en conjunto de 21 loci microsatélites (Victoria-Cota, 2010; Costa-Urrutia *et al.*, 2013). Con esta información se pudo comparar la eficiencia de las muestras no invasivas para la identificación molecular de los individuos de ballena azul.

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó una prueba F de Fisher para evaluar si existía diferencia entre las concentraciones de ADN de las muestras restauradas de heces y una prueba no paramétrica de Kolmogorov Smirnov para observar si existen diferencias en la asignación del genotipo entre cada tipo de preservación por tipo de muestras con la ayuda del programa estadístico Matlab. Usando un nivel de significancia al 95% ($\alpha=0.05$)

Para evaluar y comparar la eficiencia (E) de diferentes tipos de muestra no invasiva, se utilizó un índice que mide la probabilidad conjunta de que una muestra amplifique, reamplifique y sea reproducible mediante la siguiente fórmula:

$$E = (A + (R-A)) * Re$$

Donde **A** = porcentaje de muestras que amplificaron el marcador molecular en cuestión, **R** = porcentaje de muestras en las que logró obtenerse un amplificación al usar como template el primer producto de amplificación; **Re** = es el porcentaje de las muestras en las que existió coincidencia con los genotipos previamente empleados de una muestra semi-invasiva (biopsia) (A= Amplificación, R: Reamplificación y Re: Reproducibilidad).

6. RESULTADOS

6.1 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA MUESTRAS DE HECES

Para la extracción del ADN de las muestras de heces se probaron tres protocolos distintos con la finalidad de probar diferentes métodos de extracción como la extracción por sales (misma que se utilizó para las biopsias) y la extracción con dos kits comerciales de la misma marca de Qiagen Qiaamp, uno para tejido y sangre y el otro específico para heces. También se utilizó un grupo de 8 biopsias

que sirvieron para la comparación en las concentraciones de los diferentes tipos de muestra. El kit para heces resultó ser la mejor opción para extraer el ADN ya que fue el que mayor concentración de ADN se obtuvo (37.90 ng/μl) mientras que el kit para tejido y sangre y la extracción por sales resultaron en concentraciones menores (18.84 ng/ μl y 0.5 ng/μl respectivamente). El kit específico para heces contiene un reactivo llamado inhibitex que elimina gran cantidad de inhibidores de la PCR que las muestras de heces generalmente contienen y esto ayudó a mejorar la calidad del ADN en cuanto a la pureza. Sin embargo, esta concentración aún fue sumamente baja si se compara con la concentración que normalmente se obtiene con muestras de biopsias, ya que estas presentaron una concentración de 813.54 ng/μl (Fig. 3).

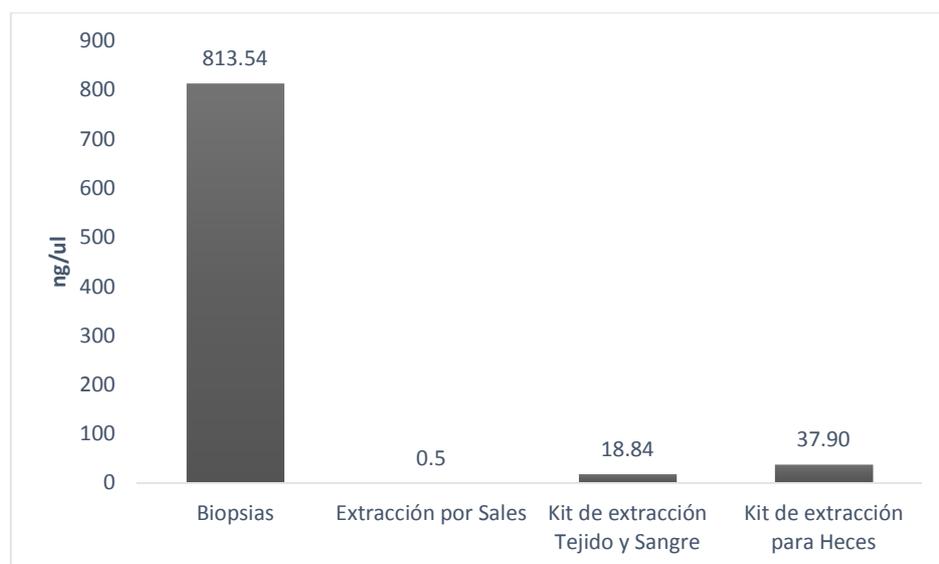


Figura 3. Concentraciones de ADN de las muestras de heces con los diferentes métodos de extracción, con un grupo de 8 biopsias para comparar las diferencias en la cantidad de material genético con muestra semi-invasiva y no invasiva. Extracción por sales (n= 3), kit de tejido y sangre (n=10) y kit específico para heces (QIAGEN) (n=13).

Con el ADN extraído de los tres diferentes protocolos se realizó la amplificación de la región control y el sistema ZFX-ZFY. El resultado de las amplificaciones dio una buena señal para las biopsias para la región control como

para el sexo (como era esperado). En contraste, el ADN proveniente de las heces obtuvo una baja señal y únicamente con el kit específico para heces (QIAGEN). A partir de esta prueba todas las extracciones para heces se realizaron a partir del kit específico QIAGEN.

6.2 RESTAURACIÓN Y LIGACIÓN DEL ADN

El método de restauración y ligación se probó únicamente en 6 muestras de heces. El promedio de concentración de ADN no restaurado fue de 35.12 ng/μl (intervalo: 22.83-45.07 ng/μl). Después de realizar la restauración para incrementar el éxito de la de la amplificación de fragmentos más largos (microsatelites) se obtuvo un incremento significativo de concentración de ADN ($p < 0.05$) con un promedio de 514.88 ng/μl (503.41 – 571.27 ng/μl). El promedio del ADN restaurado fue un orden de magnitud mayor que las muestras originales no restauradas. Un tratamiento pre-PCR se les realizó a las muestras (ligación) por medio de la T4 ADN ligasa para unir las cadenas, donde se observó un incremento casi del doble de concentración que las muestras restauradas (924.49 ng/μl; 571.24 – 1277.75 ng/μl) (Fig. 4).

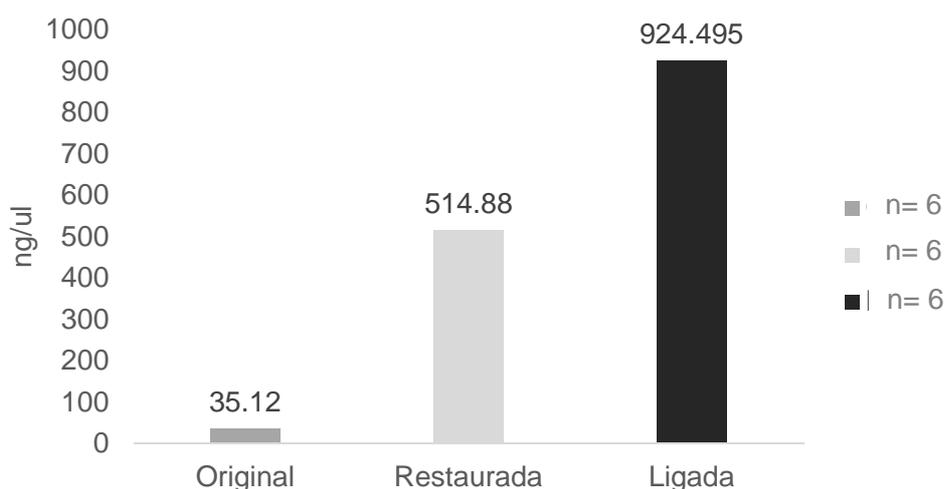


Figura 4. Concentración de ADN de las muestras de heces con los diferentes tratamientos de restauración y la ligación.

A pesar del notable incremento en la concentración del ADN asociado a la restauración y a la ligación, las pruebas de amplificación realizadas con estas muestras resultaron negativas para los dos microsátélites seleccionados (Msat023 y Msat057). El mismo resultado negativo se obtuvo al probar diferentes concentraciones finales de ADN en la reacción y al intentar la reamplificación de este conjunto de muestras, por lo que se descartó su uso en pruebas subsecuentes.

6.3 EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD Y LA CALIDAD DEL ADN

La razón de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, que se usa como un indicador de la pureza del ADN se presenta en la Figura 5. Una razón de entre 1.8 y 2.2 generalmente se acepta como una buena calidad, mientras que valores inferiores indican la presencia de proteína o algún otro contaminante. Al comparar la pureza del ADN obtenido de las distintas tipos de muestras, puede apreciarse que las de piel descamada preservadas en DMSO, congelación y en etanol al 96% fueron las que presentaron los valores más bajos de los tres grupos de muestras no invasivas.

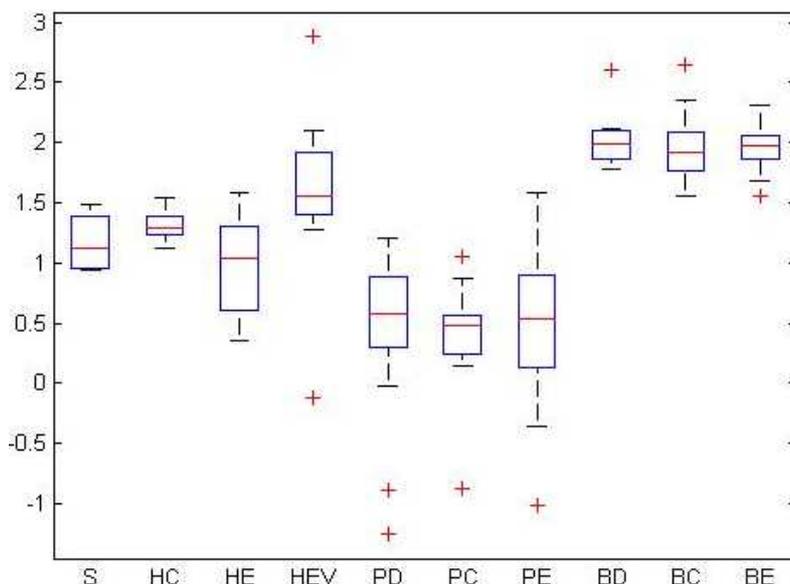


Figura 5. Calidad del ADN en los cuatro grupos de muestras y sus diferentes preservación, S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada

congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%

Para el caso de los soplos y los tres métodos de preservación de las muestras de heces se obtuvieron valores relativamente más altos. Sin embargo, aún no obtuvieron una calidad adecuada en el ADN. En el grupo de las heces preservadas en etanol al 96% del 2008-2015 algunas muestras presentaron valores de buena calidad de ADN (entre 1.8-2.2). Así como los tres tipos de muestras no invasivas mostraron una baja calidad, también presentaron una cantidad de ADN considerablemente menor con respecto al grupo de biopsias, las cuales exhibieron concentraciones de ADN que oscilaron entre 1350 ng/μL y 3375 ng/μL (Fig. 6).

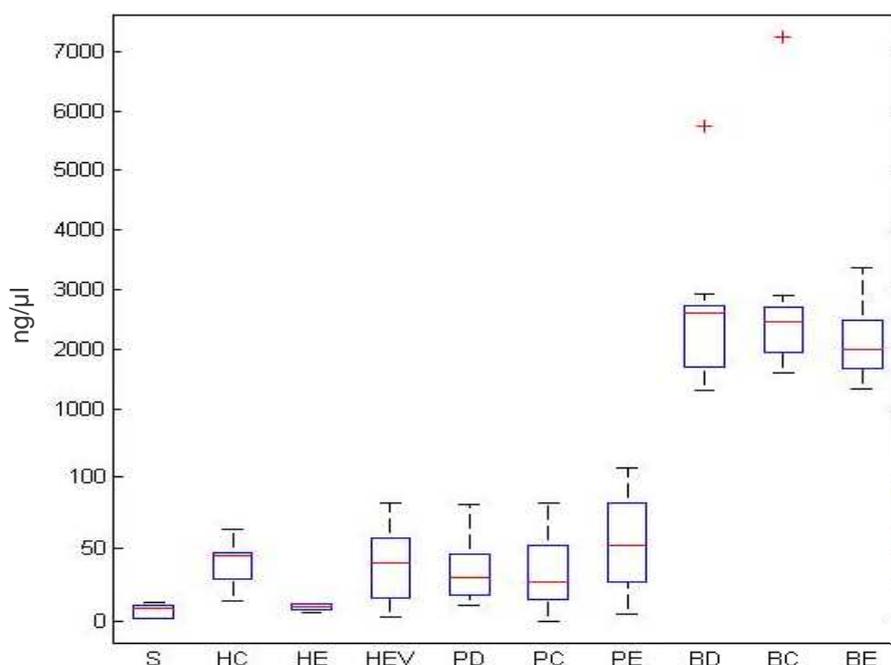


Figura 6 Cantidad del ADN en ng/μl en los cuatro grupos de muestras y sus diferentes categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%

6.4 ÉXITO EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA

El éxito en la amplificación de los marcadores moleculares para cada tipo de muestras y preservación mostró que el haplotipo mitocondrial fue el marcador molecular con mayor porcentaje de amplificación (>50%), excepto en el grupo de muestras de soplos que solo amplificó un 12.5% de ellas). La identificación del sexo obtuvo valores entre el 40% y 60% en la mayoría de las categorías, con un porcentaje de amplificación del 100% para las heces congeladas (2016). En contraste, las muestras de soplos no obtuvieron ninguna amplificación.

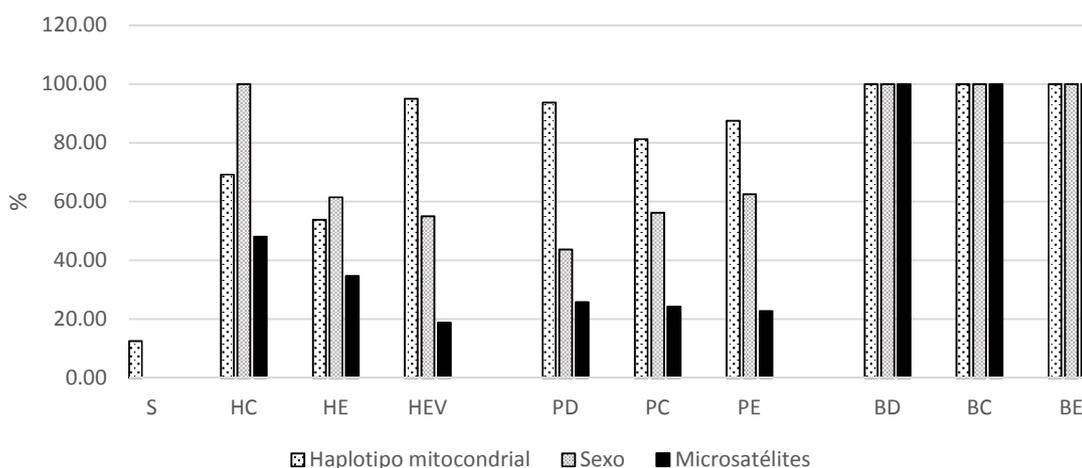


Figura 7. Porcentaje de éxito en la amplificación de los cuatro grupos de muestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%

Los microsatélites obtuvieron los porcentajes más bajos de amplificación (20-48%). Nuevamente, las heces congeladas presentaron el porcentaje más alto de todas las categorías con un 48% de amplificación.

6.5 ÉXITO EN LA REAMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA.

La reamplificación en la identificación del sexo y en microsatélites obtuvo un incremento notable en todas las categorías de los métodos no invasivos (Fig. 8), con valores entre el 60% y 80%, nuevamente las heces congeladas son las que mayor porcentaje obtuvieron. Los porcentajes de reamplificación en los microsatélites también se vieron aumentados con valores entre el 39% y 80%. Nuevamente los soplos fueron el grupo con menor porcentaje con un 3.12%.

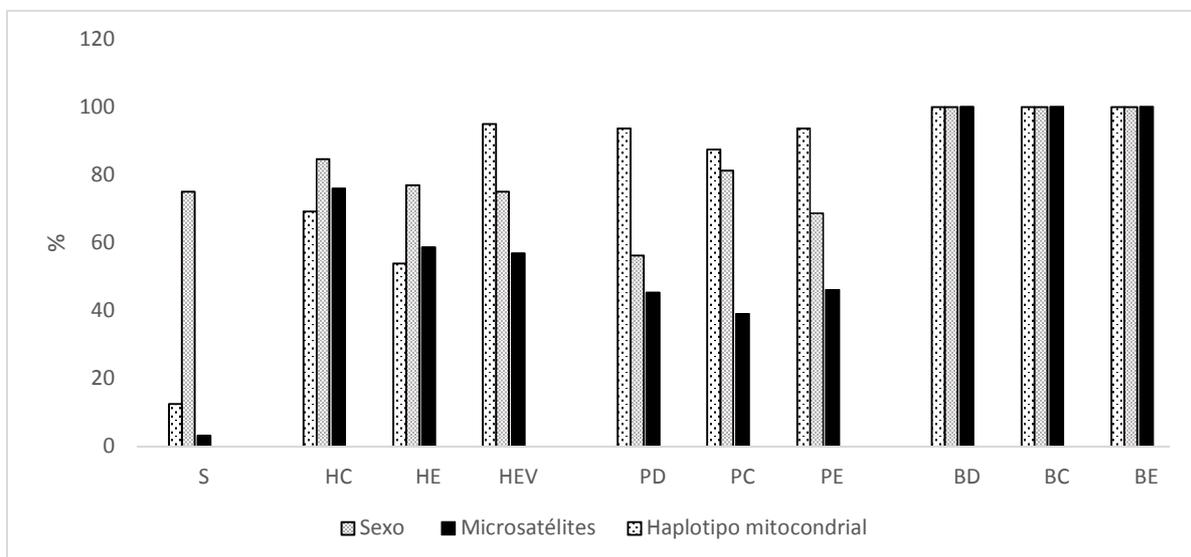


Figura 8. Porcentaje de éxito en reamplificación en los cuatro grupos de muestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%

6.6 REPRODUCIBILIDAD DE LOS DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA CATEGORÍA

A pesar de que la reamplificación incrementó los porcentajes, se detectaron incongruencias o ambigüedades al determinar los haplotipos con base a los resultados obtenidos a partir de las biopsias. En algunas muestras, los alelos no coincidieron con los reportados previamente a partir de biopsias. En el caso de los

haplotipos mitocondriales de las muestras de heces, a pesar de haber obtenido porcentajes > 80% en la reamplificación, < 40% de las muestras coincidieron con el haplotipo correcto.

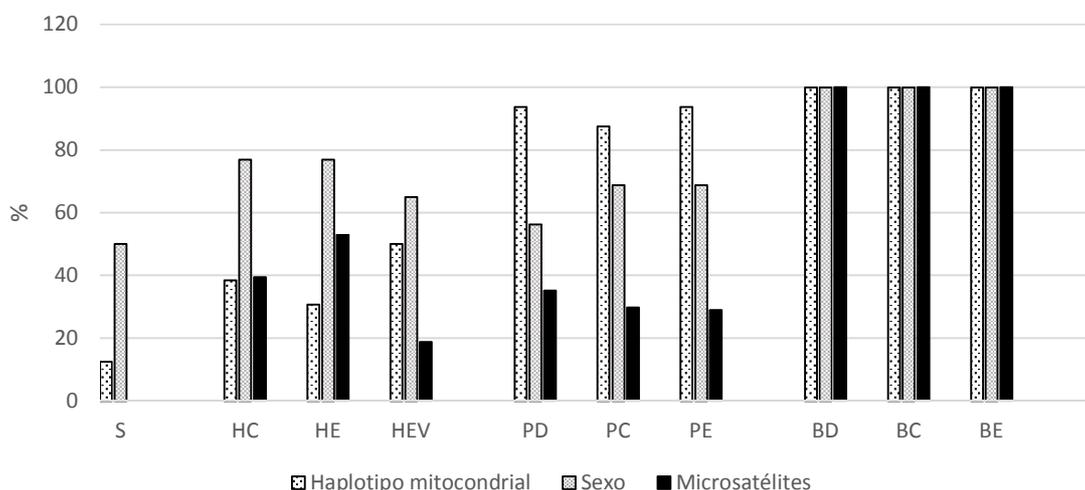


Figura 9. Porcentajes de éxito en la reproducibilidad en los cuatro grupos de muestras y sus categorías. S: Soplos, HC: Heces congeladas, HE: Heces en etanol 96% del 2016, HEV: Heces en etanol al 96% del 2008-2015, PD: Piel descamada en DMSO, PC: Piel descamada congelada, PE: Piel descamada en etanol al 96%, BD: Biopsias en DMSO, BC: Biopsias congeladas y BE: Biopsias en etanol al 96%

La reproducibilidad de la identificación del sexo en las muestras de heces representó los porcentajes más altos con más del 75% en heces congeladas y en heces en etanol al 96% (2016). Para los microsatélites, los porcentajes de reproducibilidad fueron los más bajos, presentando más incongruencias en los alelos obtenidos. La piel descamada obtuvo porcentajes del 20 al 35%, igualmente las heces obtuvieron porcentajes de entre el 20 y 50%, siendo los soplos y las heces en etanol al 96% del 2008-2015 la categoría con el menor porcentaje (S: 0%, HEV: 18.75%).

Se encontraron errores en todas las muestras de heces con algunos alelos de los microsatélites para un mismo individuo. Ocho muestras de las 13 muestras de heces congeladas y 3 muestras de 13 muestras fijadas en etanol al 96% (2016) mostraron 5 y 8 errores en los alelos de los 8 microsatélites respectivamente. En el

caso de las muestras de piel descamada, 12 muestras de un total de 16 presentaron de 6 a 8 errores de los 8 microsatélites en todos los métodos de preservación.

6.7 EFICIENCIA GLOBAL DEL USO DE LAS DIFERENTES CATEGORÍAS

Para evaluar la eficiencia global de los diferentes tipos de muestreo no invasivo y los métodos de preservación, se empleó un índice que considera la frecuencia de éxito en la amplificación y el porcentaje de muestras con resultados reproducibles, con lo que se calcula una probabilidad acumulada de que se obtengan resultados confiables (Tabla 4). En el caso del haplotipo mitocondrial, las heces obtuvieron los porcentajes más bajos con un 17% de las heces en etanol al 96% reciente (2016) y un 27 y 33% para las otras dos categorías. La piel descamada presentó los valores más altos para este marcador molecular, con un 88% tanto para las muestras en DMSO y las muestras en etanol al 96%. La identificación del sexo fue más alta (65%) en las heces congeladas, en contraste, la piel descamada en DMSO obtuvo un menor índice de probabilidad (32%). Los índices de probabilidad para los microsatélites fueron muy bajos (menor a 31%) en todas las categorías de muestras no invasivas. Las heces congeladas y en etanol al 96% tuvieron el mayor índice con 30% y 31% de probabilidad.

En el caso de las muestras de soplos el haplotipo mitocondrial y los microsatélites tuvieron un índice de probabilidad de 0%. Aunque algunas muestras amplificaron la reproducibilidad fue nula, únicamente se obtuvo un 38% de probabilidad para la identificación del sexo. Sin embargo, como se había mencionado previamente la intensidad de las bandas en los geles de agarosa fue sumamente baja y se dificultó observarlas para identificar sin ambigüedad el sexo de los individuos.

A nivel comparativo, el grupo de biopsias en sus tres categorías de preservación obtuvo siempre un 100% de probabilidad. Las muestras de biopsias

no presentan complicaciones al amplificar y su reproducibilidad fue siempre del 100%.

Tabla 3.- Porcentajes de probabilidad global de amplificación, reamplificación y reproducibilidad para todas las categorías de muestras y los tres marcadores moleculares.

Tejido	Haplotipo Mitocondrial	Identificación del Sexo	Microsatélites
Soplos	0%	38%	0%
Heces Congeladas	27%	65%	30%
Heces Etanol 96% 2016	17%	59%	31%
Heces Etanol 96% 2008-2015	33%	49%	11%
Piel descamada DMSO	88%	32%	16%
Piel descamada congelada	77%	56%	12%
Piel descamada alcohol 96%	88%	47%	13%
Biopsia DMSO	100%	100%	100%
Biopsia congelada	100%	100%	100%
Biopsia alcohol 96%	100%	100%	100%

7. DISCUSIÓN

7.1 CANTIDAD Y CALIDAD DE ADN

Las muestras no invasivas tuvieron distintos problemas para obtener una concentración o calidad de ADN adecuadas para su amplificación sin errores dependiendo del tipo de muestra. Los resultados coinciden con otros estudios basados en otros organismos (Taberlet *et al.*, 1999; Waits & Paetkau, 2005), aun así, se sigue buscando fuentes alternativas de muestras para el análisis genético que requieren la menor interacción posible con los organismos. Parte importante de este proceso es evaluar la eficiencia de estas alternativas antes de implementarlas de manera sistemática.

Los resultados del presente estudio demostraron que los tres tipos de muestras no invasivas evaluadas en ballena azul presentaron una calidad y cantidad de ADN relativamente baja en comparación con las biopsias de piel obtenidas con ballesta (método semi-invasivo).

La piel descamada tuvo la calidad más baja en sus tres formas de preservación y a su vez presentó bajas cantidades de ADN. Este tipo de muestras está conformado por células derivadas de la capa externa de la epidermis que eventualmente muere y se desprenden del organismo. La mayoría de las células en esta capa están queratinizadas y muertas y por lo tanto no presentan núcleos, particularmente en la ballena azul (Gendron y Mesnick, 2001). Por otra parte, se observó que los pedazos de piel descamada que las ballenas desprendieron variaron de 0.02 a 50 cm², por lo que no siempre contábamos con suficiente cantidad de tejido para obtener una concentración adecuada de ADN, incluso en una de las muestras no se detectó cantidad de ADN.

Otro aspecto a considerar con la piel descamada se relaciona a los melanocitos. En ocasiones la piel descamada era altamente pigmentada. Estos fragmentos presentaron valores aún más bajos tanto en la concentración del ADN, incluso valores mucho más bajos en la calidad del ADN (-1.25 a -1.58; Anexo 5)

Se conoce que las ballenas azules presentan daños celular en la piel por exposición a rayos UV causando estrés genotóxico y lesiones microscópicas (Martinez-Levasseur *et al.*, 2011; 2013) y que la apoptosis es el proceso fisiológico eficaz para eliminar estas células, mismas que además presentan niveles más altos de melanocitos (Bowman *et al.*, 2013). Similar a los seres humanos, la piel de la ballena azul tiene la capacidad de hiperpigmentarse como un mecanismo de respuesta a la exposición a los rayos UV, promoviendo un recambio epidérmico y la apoptosis, disminuyendo así los daños que la radiación UV pueda ocasionar (Morales-Guerrero, 2016). Lo anterior podría explicar el por qué algunas muestras

de piel con mayor pigmentación presentaron los valores más bajos de concentración de ADN, así como también lo demuestra Enríquez-Paredes (2005).

Las heces presentaron concentraciones de ADN entre 2.3 a 81.6 ng/μl. Aunque se han reportado que concentraciones de 30ng (Costa-Urrutia *et al.*, 2013) a 100ng de ADN (Torres-Florez *et al.*, 2014) es suficiente para una reacción de PCR. Es importante mencionar que el ADN que se obtuvo de las heces no era proveniente únicamente de la ballena, ya que una proporción considerable del ADN proviene de las presas que consume la ballena azul, como lo es el eufásido, *Nyctiphanes simplex*, que es el componente principal de la dieta de esta especie durante el periodo invernal (Jimenez-Pinedo, 2010), el mismo periodo en el que las muestras fueron recolectadas.

En concordancia con otros estudios realizados en ballenas francas donde encontraron que sólo el 1% del ADN extraído de las heces pertenecía a la ballena (Gillett *et al.*, 2008), siendo el resto de la muestra compuesta de ADN de las presas, bacterias y otros organismos. Por esta razón las cantidades de ADN contenidas en las heces de las ballenas son sumamente bajas y de igual manera la amplificación de las muestras es complicada y poco eficiente.

Se conoce que el ADN que se obtiene de las heces de los individuos proviene de las células que se desprenden del epitelio intestinal, como lo demuestran en los estudios realizados en animales terrestres donde logran obtener cantidades de ADN suficientes para amplificar con éxito los marcadores moleculares (Gerloff *et al.*, 1995; Gagneux *et al.*, 1997; Bellemain *et al.*, 2005; Ball *et al.*, 2007). La diferencia con las heces de ballenas posiblemente se deba a que las heces son recolectadas en superficie terrestre, por lo que las células epiteliales del lumen intestinal que pudieran estarse desprendiendo de la mucosa del tracto digestivo se conservan en la capa externa de las heces (Ball *et al.*, 2007; Valière *et al.*, 2006). De hecho, en un estudio realizado con heces de reno (*Rangifer tarandus*) se encontraron mayores

concentraciones de ADN en muestras que presentaban una capa mucosa externa comparado con las muestras que no la tenían (Ball *et al.*, 2007).

Las heces de las ballenas defecadas en la superficie del mar posiblemente carezcan de esta capa debido a que el contacto con el agua podría disolver o dispersar estas células, reduciendo así la posibilidad de obtener una buena concentración de ADN de los individuos. Es posible que los primeros lóbulos de heces que el individuo deposita presenten mayor número de células por lo que la submuestra recolectada podría influir en las cantidades de ADN del individuo que se obtengan. Se requiere de más estudios para demostrarlo.

Las muestras de soplos mostraron las concentraciones de ADN más bajas detectadas en el presente estudio, y al igual que las demás muestras, también presentaron una calidad baja del ADN. Existe poca información acerca de este método de muestreo para análisis genéticos, aunque se ha demostrado que la recolecta de soplo para análisis genético de patógenos fue exitosa (Acevedo-Whitehouse *et al.* 2010). Adicionalmente nuevos estudios demuestran que este tipo de muestras son eficientes para obtener información del microbioma en orcas (*Orcinus orca*) (Raverty *et al.* 2017). Un estudio de delfines en cautiverio obtuvo una alta eficiencia en sus amplificaciones, como lo haría la sangre, obteniendo concentraciones y perfiles genéticos confiables incluso sin problemas de errores en los alelos (Frère *et al.*, 2010). En este estudio, la preservación fue inmediatamente después de la toma de la muestra a -80°C y la extracción del ADN se llevó a cabo poco tiempo después del muestreo (Frère *et al.*, 2010), lo que sin duda aumenta la eficiencia al reducir la degradación del ADN. Por otro lado, los soplos pueden ser una buena fuente de información siempre y cuando se obtenga una cantidad suficiente de material y se siga un protocolo adecuado para su preservación y análisis.

De manera general, todos los tipos de muestras no invasivas tuvieron una baja calidad y cantidad del ADN que puede causar errores principalmente en la

amplificación inespecífica de las cadenas (González, 2005). El ADN puede encontrarse altamente diluido en la muestra y en buffer después de la extracción del ADN, ocasionando que la reacción de PCR en una muestra, sólo se tome un alelo siendo el individuo heterocigoto. Al ser alelos de mayor tamaño también podrían tener problemas al amplificar, ya que se mencionó que el ADN se encontraba degradado, lo que impide una amplificación de la secuencia completa (Gerloff *et al.*, 1995).

7.2 EFICIENCIA EN AMPLIFICACION Y REAMPLIFICACION

Estudios previos realizados con mamíferos de ambientes terrestres obtuvieron porcentajes de éxito en amplificaciones de marcadores nucleares y mitocondriales mayores al 80% en heces (Palomares *et al.*, 2002) e incluso en pinípedos se reportan porcentajes del 85% en las amplificaciones del ADN de heces (Reed *et al.*, 1997). Sin embargo, para obtener estos porcentajes de amplificación, en el presente estudio, fue necesaria la re-amplificación, con la que pudimos obtener más del 80% para la identificación del sexo y el haplotipo mitocondrial, pero para los microsatélites, nuestros porcentajes de éxito fueron < 75%.

Las heces congeladas y en etanol al 96% recientes (2016) tuvieron los porcentajes de re-amplificación más altos en los tres marcadores moleculares. La preservación de las muestras influye en el éxito la calidad y concentración del ADN. Esto podría explicar el bajo éxito en amplificación para nuestros resultados.

El etanol ha sido y sigue siendo el método de preservación más usado para muestras biológicas (García *et al.*, 2006), incluyendo las heces (Palomares *et al.* 2002). Varios autores han demostrado que el etanol es el mejor preservador obteniendo ADN con calidad suficiente para la amplificación de marcadores moleculares y con un rendimiento similar al de las muestras congeladas (García *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2002).

En el presente estudio no se encontró una diferencia significativa entre las muestras de heces congeladas y preservadas en etanol al 96% recientes (recolectadas durante la temporada 2016) debido a que ambos métodos de preservación conservan la integridad del ADN inhibiendo la actividad de las nucleasas. Sin embargo, las muestras recolectadas durante las temporadas del 2008 al 2015, pese a que se fijaron en etanol al 96%, fueron las que presentaron los porcentajes más bajos en la amplificación, reamplificación y reproducibilidad para la mayoría de los marcadores moleculares. Por lo anterior, el tiempo de preservación de las muestras es un factor relevante en la calidad del material genético. Una posible razón es que los recipientes no hubiesen sido sellados correctamente, con la consecuente evaporación del alcohol y la pérdida de las propiedades para la adecuada deshidratación del tejido en la muestra.

Para reducir el error al asignar un genotipo o para aumentar el éxito en la amplificación de las muestras, una gran cantidad de trabajos realizan por lo menos 3 amplificaciones de cada marcador molecular por cada muestra con el fin de asegurar que el genotipo que se obtiene es el adecuado (Gerloff *et al.*, 1995; Taberlet *et al.*, 1999; Gillett *et al.*, 2008).

Los porcentajes de éxito que obtuvimos fueron considerablemente más bajos que los reportados en investigaciones realizadas con otros mamíferos donde reportan éxito de amplificación de 52–95% para microsatélites e identificación del sexo y un 100% para el marcador de ADN mitocondrial. De hecho, la mayoría de estos estudios lograron elevados porcentajes gracias a que realizaron hasta siete amplificaciones y reportando un consenso del genotipo obtenido (Frasier & Gillett, 2010; Gillett *et al.*, 2008) y en otros casos repitiendo de dos a tres veces cada una de las amplificaciones (Bellemain *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2007; Palomares *et al.*, 2002). En el presente trabajo no fue posible realizar múltiples amplificaciones. Como se mencionó anteriormente, la cantidad de tejido en piel descamada era mínimo en algunas muestras, con muy baja cantidad de muestra recolectada de los soplos de ballena. A pesar de la gran cantidad de muestras de heces, la extracción se realizó

con un máximo 200 ng de muestra que es la cantidad que especifica el kit utilizado para la extracción que posteriormente se reduce a 15µl del extracto de ADN. Esta cantidad solo se pudo distribuir en 1µl para cada uno de los 8 microsatélites, 1µl para el haplotipo mitocondrial y 2µl para la identificación del sexo, quedando solo 4 µl que sirvieron para repetir algunas de las muestras que fallaron en la amplificación. Si por el contrario, la cantidad del ADN y su calidad hubieran sido altas, posiblemente se hubiera podido utilizar menor cantidad de muestra de ADN para cada reacción. Si se requiere de mayor cantidad de ADN o reducir los errores en los genotipos obtenidos, será necesario obtener más tejido para el caso de la piel descamada, e invertir en kits de extracción de heces para concentrar las cantidades de ADN.

7.3 REPRODUCIBILIDAD Y EFICIENCIA GLOBAL

De las diferentes fuentes de material genético evaluadas, las muestras de piel descamada preservada en DMSO fue la que exhibió el mayor porcentaje de eficiencia global tanto del haplotipo mitocondrial como en los microsatélites. En la presente tesis se concluye que este tejido y método de preservación es la mejor opción de muestras alternativas. El DMSO se ha utilizado en la mayoría de estudios realizados de piel descamada en cetáceos (Amos *et al.*, 1992; Clapham *et al.*, 1993; Gendron & Mesnik 2001; Valsecchi & Amos 1996). No obstante, es importante notar que la identificación del sexo mostró mejores porcentajes en la piel descamada congelada (56%).

En general de los tres marcadores moleculares, la región control que determina el haplotipo mitocondrial es el que obtuvo los porcentajes más altos (88%) para todas las categorías de muestras no invasivas (piel descamada preservada en DMSO o etanol). Se sabe que cada célula contiene los dos tipos de ADN, mitocondrial y nuclear, sin embargo por cada célula existen entre 10 a 2500 copias de cada gen mitocondrial (González, 2005), por solo dos copias del gen nuclear (Birky *et al.*, 1989). Esto permite que la eficiencia de los marcadores mitocondriales

sea mayor debido a que existe mayor probabilidad de que alguna de las copias este completa permitiendo que el marcador molecular se una al ADN y el producto se amplifique correctamente, a pesar de que el ADN este degradado.

En contraste, las muestras de heces presentaron valores más altos en el porcentaje global en la identificación del sexo, y en segundo lugar el haplotipo mitocondrial. Esto contrasta con los análisis realizados con ballena franca (Adams & Rosel, 2006; Frasier & Gillett, 2010) y defines (Green *et al.*, 2007). En estos estudios, se demuestran que el haplotipo mitocondrial es el marcador que con mayor facilidad amplifica por lo explicado anteriormente. Es posible que nuestros resultados indiquen que la identificación del sexo sea el marcador con el mayor porcentaje de eficiencia global debido a que se realiza la reamplificación, y al incrementar el número de cadenas amplificadas.

Otro tipo de errores que pueden ocurrir con este tipo de muestras es la asignación de la muestra a un individuo al momento de la recolecta, en particular esto sucede en muestras de heces o de piel descamada. Las muestras se recolectan desde la huella formada por el individuo que se sumerge. Cuando se trata de un solo individuo, la probabilidad de equivocarse de muestra es nula, en cambio existen ocasiones en las que nos encontramos con 2 o más individuos, ya sean madres con crías o adultos. Al recolectar una muestra en seguimiento de 2 individuos existe el riesgo de asignarla al individuo incorrecto. Esto afectaría los resultados, ya que si bien la muestra puede amplificar y mostrar un genotipo, la información no concuerda si el individuo es el incorrecto disminuyendo considerablemente los porcentajes de reproducibilidad.

7.4 CONSIDERACIONES GENERALES

Los soplos fueron las muestras más ineficientes para los tres marcadores moleculares. Los análisis de muestras de soplos aún sigue siendo probados para estudios del área de la genética y ha demostrado ser eficiente para el análisis de la

microbiota respiratoria (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2010, Raverty *et al.*, 2017). No se debe descartar aún este método ya que es aún probable que la cantidad de muestras que se obtuvieron por individuo fueron muy bajas. Las muestras analizadas fueron recolectadas durante 2016, como primer intento usando un dron. De hecho las muestras recolectadas durante 2017 aparentemente contienen ADN suficiente para amplificar bacterias y virus (com.pers. Dominguez Abril 2017). Así mismo la preservación en RNAlater pudo no haber sido la más adecuada para nuestro objetivo. Es necesario realizar más pruebas y buscar nuevas formas de preservar y extraer el ADN en este tipo de muestras antes de descartar por completo su uso para análisis genéticos.

A pesar de no haber obtenido porcentajes de éxito favorables para una buena identificación de los individuos, este tipo de muestras sigue teniendo una utilidad para determinar otros aspectos biológicos de la especie, como en el caso de las heces con las que se hacen estudios de hormonas, cargas parasitarias y escatología molecular entre otros. A su vez, la piel descamada podría llegar a ser una segunda alternativa (después de las biopsias) para determinar el haplotipo materno.

En este trabajo evaluó y comparó la eficiencia de ambos métodos (semi-invasivos y no invasivos) por lo que los datos de los alelos, sexos y haplotipos aquí obtenidos no se han utilizado aún para complementar la base de datos de genotipos obtenidos de biopsias, ya que la gran cantidad de errores en los mismos alelos y la ambigüedad con el sexo y haplotipo no nos permite tener un resultado confiable de cada individuo. Para ello se requiere mayor esfuerzo en cuanto a recursos para obtener mayor éxito. En el caso de la piel descamada los costos serían el doble o triple si se requieren de varias amplificaciones para corroborar los genotipos. Para determinar el haplotipo de una sola muestra se requieren aproximadamente de \$13 dólares, en el caso de la piel descamada o los soplos. Las heces requieren de mayor costo por la necesidad de utilizar el kit de extracción para heces, una sola muestra

cuesta alrededor de \$21 dólares y realizar una amplificación extra incrementa hasta un 22% el costo inicial.

De manera general, las muestras no invasivas son útiles pero la obtención de información sobre el individuo se complica. Posiblemente en un futuro se mejorarán las técnicas para obtener material genético confiable e incrementando las posibilidades de mayores éxitos a bajo costo. Por otra parte, es recomendable obtener una mayor cantidad de tejido para incrementar el número de análisis y ensayos que se requieren.

Es de notar que se han evaluado los efectos en el comportamiento que las ballenas presentan ante la toma de biopsia y se demostró que de forma generalizada causan un mínimo efecto en su comportamiento y en la mayoría de los casos ninguno (Brown *et al.*, 1991; Clapham & Mattila, 1993). Dependiendo del caso, sería poco razonable invertir tiempo, esfuerzo y recursos extra sabiendo que los resultados no serían confiables, mientras que con las biopsias se obtiene resultados completos y sin la necesidad de realizar reamplificaciones. Si lo importante es documentar el comportamiento de los individuos y es necesaria la toma de biopsias, existe la posibilidad de tomar la biopsia al final del día cuando ya se obtuvieron los datos sobre su comportamiento.

8. CONCLUSIÓN

La información genética provenientes de la piel descamada, heces y soplos de ballena azul analizados fue insuficiente y requiere de un mayor esfuerzo de tiempo y recursos económicos para obtenerla.

La piel descamada preservada en DMSO representa la mejor opción de los muestreos no-invasivos para obtener ADN de los individuos de ballenas azules.

Los mayores porcentajes globales de éxito en las amplificaciones y reproducibilidad para el haplotipo mitocondrial se obtuvieron en piel descamada preservada en DMSO.

Los mejores porcentajes de éxito en la identificación del sexo y los micrósatélites se obtuvieron en muestras de heces congeladas y en etanol al 96% (reciente).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Whitehouse, K., A. Rocha-Gosselin, & D. Gendron. 2010. A Novel Non-Invasive Tool for Disease Surveillance of Free-Ranging Whales and Its Relevance to Conservation Programs. *Animal Conservation* 13(2): 217–25.18.
- Adams-Lara, D. & P. E. Rosel. 2006. Population Differentiation of the Atlantic Spotted Dolphin (*Stenella Frontalis*) in the Western North Atlantic, Including the Gulf of Mexico. *Marine Biology* 148: 671–81.
- Alberts, B. & D. Bray. 2006. Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana. Pp 328.
- Aljanabi, S M, & I Martinez. 1997. Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic acids research* 25(22): 4692–93.
- Amos, W., H. Whitehead, M. J. Ferrari, D. A. Glockner-Ferrari, R. Payne & J. Gordon. 1992. Restrictable DNA from sougled cetacean skin; its potential for use in population analysis. *Marine Mammal Science*, 8(3), 275–283.
- Attard, C. R., L. B. Beheregaray, C. Jenner, P. Gill, M. Jenner, M. Morrice & L. Möller. 2010. Genetic diversity and structure of blue whales (*Balaenoptera musculus*) in Australian feeding aggregations. *Conservation Genetics*, 11(6), 2437-2441.
- Ball, M. C., R. Pither, M. Manseau, J. Clark, S. D. Petersen, S. Kingston & P. Wilson. 2007. Characterization of target nuclear DNA from faeces reduces technical issues associated with the assumptions of low-quality and quantity template. *Conservation Genetics*, 8(3), 577–586.
- Barrett-Lennard, L. G., T. G. Smith, & M. E. Graeme. 1996. A Cetacean Biopsy System Using Lightweight Pneumatic Darts, and Its Effect on the Behavior of Killer Whales. *Marine Mammal Science* 12(1): 14–27.
- Bellemain, E., J. Swenson, D. Tallmon, S. Brunberg & P. Taberlet. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter collected feces: Four methods for grown bears. *Conservation Biology*, 19(1), 150–161.
- Bérubé M & P. Palsbøll. 1996. Identification of Sex in Cetaceans by Multiplexing with

- Three ZFX and ZFY Specific Primers. *Molecular Ecology* 5: 283–87.
- Berubé, M. R., M. B. Skaug, H. Jorgensen & J. Robbins. 2005. Polymorphic microsatellite loci isolated from humpback whale, *Megaptera novaeangliae* and fin whale, *Balaenoptera physalus*. *Conserv Genet* 6: 631–636.
- Birky, C., P. Fuerst, & T. Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 121:613–627.
- Bonin, S., F. Petrera, B. Niccolini & G. Stanta. 2003. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Molecular Pathology*, 56, 184–186.
- Bradley B. J., C. Boesch & L. Vigilant. 2000. Identification and redesign of human microsatellite markers for genotyping wild chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) and gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) DNA from faeces. *Conservation Genetics*, 1, 289–292.
- Broquet, T., N. Ménard & E. Petit. 2006. Noninvasive Population Genetics: A Review of Sample Source, Diet, Fragment Length and Microsatellite Motif Effects on Amplification Success and Genotyping Error Rates. *Conservation Genetics* 8(1): 249–60.
- Brown M. W., S. D. Kraus, D. E. Gaskin. 1991. Reaction of North Atlantic right whales (*Eubalena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. *Report to the International Whaling Commission*. Special Issue 13: 81-90.
- Buchanan, F., M. Friesen, R. Littleohn & J. Clayton. 1996. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology*, 5, 571–575.
- Calambokidis J. & J. Barlow. 2004. Abundance of Blue and Humpback Whales in the Eastern North Pacific Estimated By Capture-Recapture and Line-Transect Methods. *Marine Mammal Science*, 20 (1) 63–85.
- Clapham, P. J. & D.K. Mattila. 1993. Reactions of humpback whales to skin biopsy sampling on a West Indies breeding ground. *Marine Mammal Science*, 9(4), 382–391.

- Costa-Urrutia, P., S. Sanvito, N. Victoria-Cota, L. Enríquez-Paredes & D. Gendron. 2013. Fine-Scale Population Structure of Blue Whale Wintering Aggregations in the Gulf of California. *PLoS ONE*, 8(3), 1–10.
- Enríquez-Paredes, L. 2005. Identidad Genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada B. C. 198 pp.
- Ernest, H. B., M. C. Penedo, B. P. May, M. Syvanen & 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(4), 433–441.
- Flores-Cascante, L., & D. Gendron. 2012. Application of McMaster's technique in live blue whales. *The Veterinary Record*, 171(9), 220.
- Frère, C. H., E. Krzyszczuk, E. M. Patterson, Hunter, S., Ginsburg, A., & J. Mann. 2010. Thar she blows! A novel method for DNA collection from cetacean blow. *PLoS ONE*, 5(8), 1–5.
- Gagneux, P., C. Boesch & D. S. Woodruff. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6(9), 861–868.
- García, P., F. Benavente, A. Melo, I. Roa & J. Roa. 2006. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Revista Española de Patología*, 39(3), 175–179.
- Gendron, D. 2002. Ecología Poblacional de la ballena azul, *Balaenoptera musculus* de la Península de Baja California. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada, Baja California México. 105pp, En: Enríquez-Paredes, L. M. 2005. Identidad genética de la población de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: agregaciones mexicanas. Tesis de Doctorado. UABC. Ensenada, Baja California, México. 198 p.
- Gendron, D., & S. L. Mesnick. 2001. Sloughed skin: A method for the systematic collection of tissue samples from Baja California blue whales. *The Journal of Cetacean Research and Management*, 3(1):77-79.

- Gendron, D., & Ugalde De la Cruz, A. 2012. A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. *The Journal of Cetacean Research and Management*, 12(1), 79–84.
- Gerloff, U., C. Schlotterer, K. Rassmann, I. Rambold, G. Hohmann, B. Fruth & D. Tautz. 1995. Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 4(4), 515–518.
- Gillett, R. M., B. N. White & R. M. Rolland. 2008. Quantification and genetic profiling of DNA isolated from free-floating feces of the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). *Marine Mammal Science*, 24(2), 341–355.
- Gladden, B., P. F. Brodie & J. W. Clayton. 1999. Mitochondrial DNA used to identify an extralimital beluga whale (*Delphinapterus leucas*) from Nova Scotia as originating from the St. Lawrence population. *Marine Mammal Science* 15:556–558.
- González, S. 2005. Métodos De Muestreo No Invasivo Para El Diagnóstico Non-Green Invasive Sampling Methods To Monitor. *Agrociencia*, IX, 545–550.
- Green, M. L., D. L. Herzing & J. D. Baldwin. 2007. Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Molecular Ecology Notes*, 7, 1287–1292.
- Green, M. L., D. L. Herzing & J. D. Baldwin. 2007. Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Molecular Ecology Notes*, 7, 1287–1292.
- Guerrero de la Rosa, F., D. Gendron, F. Arellano-Carbajal & K. Acevedo-Whitehouse. En Rev. Restoration of degraded fecal DNA: Limitations and applications for wildlife studies Manuscript. *Molecular Ecology*.
- Hoelzel, A R., J. M. Hancock & G. A. Dover. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular biology and evolution*, 8(4) 475–493.
- Hogg, C. J., T. L. Rogers. A. Shorter, K. Barton, P.J. Miller & D. Nowacek. 2009. Determination of steroid hormones in whale blow: It is possible. *Marine Mammal Science*, 25(3), 605–6

- Holland, M. M. & W. Parson. 2011. GeneMarker â HID : A Reliable Software Tool for the Analysis of Forensic STR Data. *Forensic Sciences*, 56(1), 29–35.
- Houser, D. S., Wasser, S., Cockrem, J. F., Kellar, N., & Romano, T. (2011). Variability of Hormonal Stress Markers Collected from a Managed Dolphin Population. National Marine Mammal Foundation San Diego CA.
- Idaghdour, Y., D. Broderick & A. Korrida. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetics*, 4(6), 789–792.
- Imyanitov, E. N., M. Y. Grigoriev. V. M. Gorodinskaya, E. S. Kuligina, K. M. Pozhariski, A. V. Togo & K. P. Hanson. 2001. Partial restoration of degraded DNA from archival paraffin-embedded tissues. *BioTechniques*, 31(5), 1000–1002.
- Jáuregui-Rincón, J., N. A. Chávez-Vela, & J. N. Jáuregui-Rincón. 2006. *Glosario de biotecnología*. No. Sirsi.
- Jimenez-Pinedo, N.C. 2010. Hábitos Alimentarios y Relación Interespecífica entre la Ballena Azul (*Balaenoptera Musculus*) y la Ballena de Aleta (*B. Physalus*) en el suroeste del Golfo de California . Tesis de Maestria, CICIMAR-IPN, 84 pp.
- Lambertsen, R. H. 1987. A Biopsy System for Large Whales and Its Use for Cytogenetics. *Journal of Mammalogy*, 68(2): 443–45.
- Lathuilliere M, N. Menard, A. Gautier-Hion & B. Crouau-Roy. 2001. Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analyses of blood and fecal samples in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *American Journal of Primatology*, 55, 151–158.
- López Vázquez, C. 2007. Optimización del diagnóstico, caracterización molecular y análisis de virulencia del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 195 p.
- Maiers, L. D., M. K. Friesen, A. V. Wiens, & J. W. Clayton. 1996. Use of microsatellites in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) population genetic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 21 15: 17p.

- Maldonado-Jiménez, E. 2002. *Biología molecular en Medicina*. Editorial Limusa. 223 p.
- Martinez-Levasseur, L. M., D. Gendron, R. J. Knell & K. Acevedo-Whitehouse. 2013. Control and target gene selection for studies on UV-induced genotoxicity in whales. *BMC Research Notes*, 6, 264.
- Martinez-Levasseur, L. M., D. Gendron, R. J. Knell, E. A. O'Toole, M. Singh & K. Acevedo-Whitehouse. 2011. Acute sun damage and photoprotective responses in whales. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1711), 1581–1586.
- Monnahan C. C., T. A. Branch, K. M. Stafford, Y. V. Ivashchenko, & E. M. Oleson. 2014. Estimating historical eastern North Pacific blue whale catches using spatial calling patterns. *PLoS One*, 9 (6).
- Morales Guerrero, B. 2016. Mecanismos conductuales y celulares de cetáceos como estrategia de protección contra la radiación UV. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 190 pp.
- Morin P. A., K. E. Chambers, C. Boesch & L. Vigilant. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10, 1835–1844.
- Murphy, M. A., L. P. Waits, K. C. Kendall, S. K. Wasser, J. A. Hibgee & R. Bogden. 2002. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Wildlife Society Bulletin*, 3(4), 435–440.
- Oliva-Virgili, R., & J. M. Vidal-Taboada. 2006. Genoma Humano Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. *Ube*. 45-47p.
- Osatinsky, R. 2007. ¿Qué es la electroforesis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica*. 71 (2). 60-66.
- Palomares, F., J. A. Godoy, A. Piriz, S. J. O'Brien & W. E. Johnson. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: Design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11(10), 2171–2182.

- Palsboll P. J. M., Berube & H. Jorgensen. 1999. Multiple Levels of Single-Strand Slippage at Cetacean Tri- and Tetranucleotide Repeat Microsatellite Loci. *Genetics* 151: 285–296.
- Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls & R. Fleischer. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology*, 6(5), 483–6.
- Puerta, C. J., & C. P. Ureña. 2005. *Prácticas de biología molecular*. Ed. Pontificia Universidad Javeriana. 105 p.
- Pusch, C. M., I. Giddings & M. Scholz. 1998. Repair of Degraded Duplex DNA from Prehistoric Samples Using *Escherichia Coli* DNA Polymerase I and T4 DNA Ligase. *Nucleic Acids Research* 26(3): 857–59.
- Quintela, M., H. J. Skaug, N. Øien, T. Haug, B. B. Seliusen, H. K. Solvang & K. Glover. 2014. Investigating population genetic structure in a highly mobile marine organism: the minke whale *Balaenoptera acutorostrata acutorostrata* in the North East Atlantic. *PloS one*, 9(9).
- Raña, P. 2008. Desarrollo de nuevas técnicas para el análisis genético en la fibrosis quística: aplicación al cribado neonatal. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 21-23 p.
- Raverty, S. A., L. D. Rhodes, E. Zabek, A. Eshghi, C. E. Cameron, M. B. Hanson & J. P. Schroeder. 2017. Respiratory Microbiome of Endangered Southern Resident Killer Whales and Microbiota of Surrounding Sea Surface Microlayer in the Eastern North Pacific. *Scientific Reports*, 7(1), 394.
- Reboredo-Fernández, A., E. Ares-Mazás, J. A. Martínez-Cedeira, R. Romero-Suances, S. M. Cacciò & H. Gómez-Couso. 2015. Giardia and Cryptosporidium in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitology research*, 114(2), 693-698.
- Reed, J Z, D. J. Tollit, P. Thompson & W. Amos. 1997. Molecular Scatology: The Use of Molecular Genetic Analysis to Assign Species, Sex and Individual Identity to Seal Faeces. *Molecular ecology* 6(3): 225–34.
- Reilly, S.B., J. L. Bannister, P. B. Best, M. Brown, Jr. R. Brownell, D. S. Butterworth, P.J. Clapham, J. Cooke, G. P. Donovan, J. Urbán, & A.N. Zerbini. 2008.

- Balaenoptera musculus. In: IUCN (eds). IUCN Red List of Threatened Species. [Available at: <http://www.iucn.redlist.org>].
- Rolland, R. M., K. E. Hunt, S. D. Kraus & S. K. Wasser. 2005. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. *General and comparative endocrinology*, 142(3), 308-317.
- Schneider-Gadicke, A., P. Beer-Romero, L.G. Brown, G. Mardon, S.W. Luoh y D.C. Page. 1989. Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene. *Nature* 342 (6250): 708-711.
- Stafford, K.M., S.L. Nieu Kirk & C.G. Fox. 2001. Geographic and seasonal variation of blue whale calls in the North Pacific. *Journal of Cetacean Research and Management*, 3(1), pp.65–76.
- Taberlet P., J. J. Camarra & S. Griffin. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 869–876.
- Taberlet, P. G. & L. P. Waits. 1999. Noninvasive Genetic Sampling: Look before You Leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14(8): 323–27.
- Teijón-Rivera, J. M. & A. Garrido-Pertierra. 2006. Fundamentos de bioquímica estructural.(Vol. 1). Editorial Tébar. 444 p.
- Tikel, D., D. Blair & H. D. Marsh. 1996. Marine Mammal Faeces as a Source of DNA. *Molecular ecology* 5(3): 456–57.
- Torres-Florez J. P., R. Hucke-Gaete, H. Rosenbaum & C.C. Figueroa. 2014. High genetic diversity in a small population: the case of Chilean blue whales. *Ecology and Evolution*, 4: 1398–1412.
- Torres-Florez, J. P., R. Hucke-Gaete, R. LeDuc, A. Lang, B. Taylor, L. Pimper & C. C. Figueroa. 2014. Blue whale population structure along the eastern South Pacific Ocean: evidence of more than one population. *Molecular Ecology*, 23, 5988–6010.
- Valière, N., C. Bonenfant, C. Toïgo, G. Luikart, J. M. Gaillard & F. Klein. 2006. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics*, 8(1), 69–78.

- Valsecchi, E., & W. Amos. 1996. Microsatellite Markers for the Study of Cetacean Populations. 151–56.
- Valsecchi, E., D. Glockner-Ferrari, M. Ferrari & W. Amos. 1998. Molecular Analysis of the Efficiency of Sloughed Skin Sampling in Whale Population Genetics. *Molecular Ecology* 7(10): 1419–22.
- Victoria-Cota N. L. 2010. Parentesco entre ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) con distintos patrones de asociación en el Golfo de California, México (Tesis maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California.
- Waits, L, & D. Paetkau. 2005. Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. *Journal of Wildlife Management* 69(4): 1419–33.
- Welsch, U., & Sobotta J. 2009. Histología. 2^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 639 p.

ANEXOS

ANEXO 1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE PIEL DESCAMADA Y BIOPSIAS POR EL PROTOCOLO DE SALES-PROTEINASA K.

La extracción de piel descamada y de biopsias de piel se realizó colocando en un portaobjetos entre 30 y 50 mg de tejido, cortándolo finamente con ayuda de una navaja para homogenizar el tejido y se agregaron 400µl de una solución amortiguadora de sales (Tris-HCL 5.0 mM pH 8.0; 400mM de NaCl y EDTA 1 mM). Posteriormente se añadió 40 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y 8 µl de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL. Los tubos en donde se preparó la mezcla fueron sellados e incubados durante una hora a 55°C.

Cuando la digestión finalizó se añadió 300µl de NaCl 6M para después agitar en el vortex y seguido de una centrifugación por 30 min a 10,000 X g. Se recuperaron entre 600 a 700µl del sobrenadante y agregaron 650µl de isopropanol al 99% y enseguida se agitó y dejó incubar a -40°C, generalmente se puede observar el ADN en el fondo del tubo, finalmente se centrifugó la muestra por 5 min y se dejó secando en una centrifuga de vacío a 55°C por 15 min. La muestra se almacenó a 4°C.

ANEXO 2. RESTAURACIÓN DEL ADN

Para restaurar el ADN de las muestras de heces, se tomaron entre 50 a 100ng/µl de ADN original al cuál se le añadió 100µl del mix de reparación (Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 2% y 200 µM de cada dNTP) dejando incubar por una hora a 55°C. Se añadió 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y se volvió a incubar por 20 min a 72°C. En caso de no utilizarlas al instante se almacenaron a -20°C.

Antes de realizar la amplificación se realiza un paso previo tomando 5µl de muestra y desnaturalizando a 95°C por 5 minutos, inmediatamente poner en hielo para finalmente realizar la PCR (Bonin *et al.*, 2003).

ANEXO 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL HAPLOTIPO MITOCONDRIAL (REGIÓN CONTROL) Y EL SEXO (ZFX/ZFY)

El haplotipo mitocondrial se obtuvo con un fragmento del ADN mitocondrial de 540 pares de bases, este fragmento corresponde a una región hipervariable 1 de la región control del ADN mitocondrial (dHv1-RC-mt). Para su amplificación se utilizaron dos cebadores específicos Tro (5'-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3') y Dxx (5'-CCTGAAGTAAGAAACCAGATG-3') (Enríquez-Paredes 2005).

El sexo de cada individuo se determinará aproximadamente con 40 ng/µl de ADN usando amplificaciones por PCR con cebadores cuyas secuencias blanco se localizan en los cromosomas sexuales. El método que se utilizará para identificar las moléculas del sexo amplifica sobre una secuencia homóloga de entre 328 pb (ZFX) y 254 pb (ZFY) denominada zinc finger X/Y situada en los cromosomas sexuales (ZFX/ZFY) (Schenider-Gädicke *et al.* 1989), y un cebador interno reconocerá y amplificará sobre una secuencia específica al cromosoma Y. Para su amplificación se utilizan tres cebadores ZFX (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3'), ZFY (5'-CACTTATGGGGGTAGTCCTTT-3') y ZFY (5'-ATTACATGTCGTTTCAAATCA-3') (Bérubé M y Palsbøll P, 1996)

La amplificación para ambos marcadores (región control y sistema ZFY-ZFX) se realizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a partir de 1 µl de ADN (aproximadamente 40 ng/µl) para la región control y 2 µl para el sexo. La mezcla de reacción se compone de una solución amortiguadora con Tris-HCl 22 mM (pH 8.4), cloruro de potasio (KCl) 55mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 3.0 mM, además una mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0.22 mM, 280 picomoles de cada cebador y 1.1 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen TM; Victoria-Cota N, 2010).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient, con el mismo perfil de temperatura para ambos marcadores que consisten en la desnaturalización inicial de 4 min a 94°C seguido de 35 ciclos de amplificación con 45 s de desnaturalización a 95°C, 45 s de alineación a 52°C y 60 s de extensión de la cadena a 72° C. Finalmente, un ciclo de 7 min a 70° C de extensión (Programa MHCSEXID). Para cada grupo de muestras que se procesaban se incluían uno o dos controles negativos del extracto, esto con la finalidad de descartar contaminación en los reactivos utilizados para la extracción del ADN.

ANEXO 4. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient, con buffer B1.5 con una mezcla de reacción de una concentración final de 0.22 mM de Tris, 55 mM de KCl, 0.22mM de dNTP's y 1.56 mM de MgCl y 0.25 U de Taq DNA Polimerasa recombinante (Invitrogen™) y a partir de 1µl del extracto de ADN de cada muestra (aproximadamente 40ng/µl de ADN). Uno de los cebadores (forward) de cada locus se marcó con un fluorocromo diferente (6-FAM®-azul, VIC®-verde y NED®-negro; Applied Biosystems) esto para la detección en el secuenciador automático.

Se utilizó un perfil de amplificación (MSAT1737), con 2 min de desnaturalización inicial a 94°C seguido siete repeticiones de un ciclo de 1 min a 96°C, 1 min (T°C1) y 1 min a 72°C para desnaturalización, para alineación un conjunto de 25 repeticiones de un ciclo de 1 min a 90°C, 1 min (T°C2) y 1 min a 72°C, para finalizar con una extensión de 5 min a 70°C.

Tabla 4. Marcadores microsatélites, cebadores y tamaño en pares de bases (pb)

MsatLab	Locus	Cebadores	Tamaño (pb)
M017	DirFCB017	5'-TCAGCCTCTATAACGTCCTGAGC-3' 5'-ATGGGGACTGCCTATATTAGTCAG-3'	220-240
M037	Ev037	5'-AGCTTGATTTGGAAGTCATGA-3' 5'-TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC-3'	178-224
M045	AC045	5'-AGCAGCCCAACACATTCAAGA-3' 5'-TGACCACTCACCTTCACACTTC-3'	187-199
M082	AC082	5'-ATTAGTCCTGTTTCTCTGGAG-3' 5'-CAGATGTTCTGTGAGTACTTG-3'	123
M087	AC087	5'-ACCAGGGTGGGTTCTTAAACTA-3' 5'-GCTTCAGAAGCAATGATGGA-3'	160-180
M098	GATA098	5'-TGTACCCTGGATGGATAGATT-3' 5'-TCACCTTATTTTGTCTGTCTG-3'	100-124
M234	CA234	5'-TGGATCCTCTACCTACCTTAG-3' 5'-CAACCTTATTCTTGACCTCAT-3'	187-219
M417	GATA417	5'-CTGAGATAGCAGTTACAT-3' 5'-TCTGCTCAGGAAATTTCAAG-3'	251-271

Por cada reacción de PCR se añadió una combinación de un par de microsatélites con diferentes fluorocromos y de diferentes tamaños, de esta forma solo se ocupó para cada dos microsatélites la misma cantidad de ADN que se ocuparía para uno solo, por lo que solo se realizaron 4 combinaciones diferentes con los 8 microsatélites (Tabla 5).

Tabla 5. Combinación que se utilizó para los microsatélites, cada combinación con fluorocromo diferente (Ned:Negro;Fam:Azul;Vic:Verde)

Combinación	Microsatélite	Fluorocromo	Microsatelite	Fluorocromo
1	417	Ned	098	Fam
2	037	Fam	082	Ned
3	087	Vic	234	Fam
4	017	Vic	045	Ned

ANEXO 5. CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DE CADA GRUPO DE MUESTRAS NO INVASIVAS.

Tabla 6. Concentración y calidad del ADN por cada muestra en sus diferentes formas de preservación.

Muestra	Concentración ADN	Calidad ADN	Heces Etanol 96% 2016	ng/ul	~ 1.8 - 2.2
Heces Congeladas	ng/ul	~ 1.8 - 2.2	151	9.76	0.47
150	14.44	1.54	152	12.01	1.04
151	36.25	1.165	153	6.19	1.28
152	45.07	1.125	154	11.51	1.58
153	47.41	1.245	155	9.56	1.30
154	22.83	1.35	156 ^a	11.41	1.57
155	45.44	1.33	156 ^b	8.32	0.59
156	26	1.225	157	8.77	0.74
157	33.06	1.445	158	9.23	1.31
158	47.8	1.375	159	12.05	1.18
159	30.05	1.515	160	5.90	0.36
160	45.57	1.29	161	12.16	0.92
161	52.51	1.295	162	7.44	0.61
162	63.24	1.27			

Heces Etanol 96% 2008-2015	ng/ul	~ 1.8 - 2.2	Piel descamada DMSO	ng/ul	~ 1.8 - 2.2
69	13.3	1.56	1	11.00	0.91
70	18.4	2.105	2	14.93	-0.89
71	16.3	1.345	3	15.00	1.20
77	50.4	1.465	4	18.00	0.58
83	8.9	2.88	5	18.00	0.36
87	16.3	1.955	6	21.00	0.58
88	49.5	1.42	7	27.00	0.85
90	2.3	-0.115	8	28.50	0.45
93	78.7	1.76	9	31.24	-0.03
95	61.2	1.88	10	34.12	0.84
97	63.6	1.895	11	42.54	0.64
98	51.1	2.045	12	45.07	1.20
99	19.5	1.36	13	48.00	-1.25
100	81.6	1.71	14	48.55	0.23
108	63.1	1.955	15	58.50	0.55
117	32.3	1.28	16	81.00	0.92
118	48.4	1.485	Piel descamada congelada	ng/ul	~ 1.8 - 2.2
121	15.2	1.39	1	0.00	0.23
134	32.5	1.43	2	0.00	0.14
141	54.6	1.565	3	13.50	0.54
Soplos	ng/ul	~ 1.8 - 2.2	4	15.00	0.50
14	2.00	1.49	5	15.00	0.14
16	1.70	1.32	6	18.00	0.25
20	10.33	0.94	7	22.54	0.87
25	7.77	1.29	8	25.03	0.56
25	13.23	0.97	9	30.01	0.36
29	1.33	1.45	10	33.43	0.56
28	9.37	0.96	11	45.00	0.52
32	11.57	0.95	12	48.00	-0.87
			13	56.34	0.45
			14	64.79	1.05
			15	75.08	0.32
			16	81.69	0.84

Piel descamada alcohol 96%	ng/ul	~ 1.8 - 2.2	Biopsia congelada	ng/ul	~ 1.8 - 2.2
1	5.00	0.28	1	1607.14	2.05
2	16.50	0.65	2	1654.41	1.56
3	21.00	0.45	3	1836.73	2.10
4	22.50	0.69	4	1950.00	2.65
5	31.50	1.10	5	1970.59	2.14
6	32.10	0.02	6	1992.19	1.78
7	37.50	0.75	7	2341.35	1.69
8	45.00	1.58	8	2457.45	2.01
9	60.00	0.12	9	2492.65	1.60
10	65.14	1.30	10	2512.50	1.89
11	75.08	0.62	11	2581.73	1.79
12	78.00	0.14	12	2602.94	1.96
13	85.05	0.36	13	2816.49	2.35
14	100.38	-1.02	14	2877.55	1.81
15	105.00	-0.36	15	2906.25	1.75
16	106.04	1.04	16	7232.14	2.07
Biopsia DMSO	ng/ul	~ 1.8 - 2.2	Biopsia alcohol 96%	ng/ul	~ 1.8 - 2.2
1	1323.53	2.10	1	1350.00	1.90
2	1575.00	1.78	2	1514.42	2.31
3	1640.63	1.98	3	1523.44	1.89
4	1698.11	1.87	4	1575.00	2.10
5	2025.00	2.10	5	1730.77	1.75
6	2393.62	1.99	6	1990.20	2.05
7	2554.69	1.85	7	1990.20	1.89
8	2689.90	2.10	8	1992.19	1.68
9	2700.00	2.05	9	1992.19	2.20
10	2700.00	2.11	10	2112.75	2.04
11	2739.80	2.60	11	2295.92	1.87
12	2859.38	1.86	12	2365.38	1.56
13	2936.17	1.86	13	2382.35	1.86
14	5739.80	1.88	14	2850.00	1.97
			15	3046.88	1.98
			16	3150.00	2.16
			17	3375.00	2.04

ANEXO 6. TOTAL DE PORCENTAJES DE LOS TRES MARCADORES MOLECULARES PARA CADA TIPO DE MUESTRA

Tabla 7. Porcentajes de amplificación (A), reamplificación (R) y reproducibilidad (Re) de los tres marcadores moleculares (Haplotipo mitocondrial, identificación del sexo y los 8 microsatélites) para cada grupo de muestras no invasivas.

Tejido		Heces Congeladas	Heces Etanol 96% 2016	Heces Etanol 96% 2008-2015	Soplos	Piel descamada DMSO	Piel descamada congelada	Piel descamada etanol 96%	Biopsia DMSO	Biopsia congelada	Biopsia alcohol 96%
Haplotipo mitocondrial	A	69.23%	53.85%	95.00%	12.50%	93.75%	81.25%	87.50%	100%	100%	100%
	R	69.23%	53.85%	95.00%	12.50%	93.75%	81.25%	87.50%	100%	100%	100%
	Re	38.46%	30.77%	50.00%	12.50%	93.75%	87.50%	93.75%	100%	100%	100%
Identificación del Sexo	A	100%	61.54%	55.00%	0.00%	43.75%	56.25%	62.50%	100%	100%	100%
	R	84.62%	76.92%	75.00%	75.00%	56.25%	81.25%	68.75%	100%	100%	100%
	Re	76.92%	76.92%	65.00%	50.00%	56.25%	68.75%	68.75%	100%	100%	100%
Msat017	A	69.23%	46.15%	15.00%	0.00%	25.00%	25.00%	25.00%	100%	100%	100%
	R	53.85%	53.85%	50.00%	0.00%	31.25%	37.50%	43.75%	100%	100%	100%
	Re	38.46%	69.23%	40.00%	0.00%	25.00%	31.25%	25.00%	100%	100%	100%
Msat037	A	46.15%	61.54%	20.00%	0.00%	25.00%	25.00%	25.00%	100%	100%	100%
	R	84.62%	84.62%	65.00%	12.50%	50.00%	37.50%	50.00%	100%	100%	100%
	Re	61.54%	61.54%	30.00%	0.00%	31.25%	31.25%	25.00%	100%	100%	100%
Msat045	A	69.23%	46.15%	15.00%	0.00%	25.00%	25.00%	18.75%	100%	100%	100%
	R	53.85%	53.85%	40.00%	0.00%	43.75%	37.50%	43.75%	100%	100%	100%
	Re	30.77%	84.62%	10.00%	0.00%	37.50%	25.00%	31.25%	100%	100%	100%
Msat082	A	46.15%	61.54%	20.00%	0.00%	31.25%	25.00%	12.50%	100%	100%	100%
	R	92.31%	92.31%	60.00%	12.50%	50.00%	37.50%	37.50%	100%	100%	100%
	Re	69.23%	61.54%	25.00%	0.00%	43.75%	31.25%	18.75%	100%	100%	100%
Msat087	A	69.23%	30.77%	15.00%	0.00%	25.00%	25.00%	25.00%	100%	100%	100%
	R	92.31%	69.23%	80.00%	0.00%	43.75%	37.50%	56.25%	100%	100%	100%
	Re	61.54%	53.85%	20.00%	0.00%	25.00%	31.25%	37.50%	100%	100%	100%
Msat098	A	7.69%	0.00%	25.00%	0.00%	25.00%	25.00%	25.00%	100%	100%	100%

	R	92.31%	76.92%	70.00%	0.00%	50.00%	43.75%	43.75%	100%	100%	100%
	R e	7.69%	38.46%	0.00%	0.00%	37.50%	37.50%	31.25%	100%	100%	100%
Msat234	A	69.23%	30.77%	15.00%	0.00%	25.00%	18.75%	25.00%	100%	100%	100%
	R	76.92%	38.46%	60.00%	0.00%	43.75%	43.75%	50.00%	100%	100%	100%
	R e	46.15%	53.85%	10.00%	0.00%	37.50%	25.00%	31.25%	100%	100%	100%
Msat417	A	7.69%	0.00%	25.00%	0.00%	25.00%	25.00%	25.00%	100%	100%	100%
	R	61.54%	0.00%	30.00%	0.00%	50.00%	37.50%	43.75%	100%	100%	100%
	R e	0.00%	0.00%	15.00%	0.00%	43.75%	25.00%	31.25%	100%	100%	100%