

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 2
Number

Abril-Junio 2005
April-June

Artículo:

Estimación de la variabilidad genética en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en cautiverio

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Estimación de la variabilidad genética en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en cautiverio

Assessment of the genetic variability in the captive population of Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*)

Víctor Manuel Salomón Soto* José Luis Contreras Montiel** Pablo Damián Matzumura **
Carlos Gustavo Vásquez Peláez***

Abstract

The genetic variability of the Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*) was estimated and compared among individuals of a wild population and a captive one in Chapultepec Zoo by means of the RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA). A total of 31 DNA *loci* were amplified, observing that both populations showed genetic differences in 8 *loci* ($P < 0.05$). The wild population presented a higher amount of genetic variability when compared to the captive population. Of the 31 amplified *loci*, 12 have become fixed in both populations, and 10 are not statistically significant between populations; it was also observed that in the captive population six *loci* were lost, two have lost 88% of their variability and one *locus* presented a higher amount of variability than the wild population.

Key words: POLYMORPHISM, RAPD, VOLCANO RABBIT, ENDEMIC SPECIES, CHAPULTEPEC ZOO, BIOLOGY.

Resumen

Se estimó y comparó la variabilidad genética del Teporingo (*Romerolagus diazi*) entre individuos de una población silvestre y otra en cautiverio existente en el Zoológico de Chapultepec, a través del método amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés). Se amplificaron 31 *loci* del ADN y se observó que las dos poblaciones presentan diferencias genéticas en ocho *loci* ($P < 0.05$), la población silvestre presentó mayor variabilidad genética que la de cautiverio. De los 31 *loci* amplificados, 12 se han fijado en ambas poblaciones, diez no son estadísticamente significativos entre poblaciones, mientras que en los individuos en cautiverio, seis *loci* se han perdido; dos han perdido 88% de su variabilidad y un *locus* presentó mayor variabilidad en relación con la población silvestre.

Palabras clave: POLIMORFISMO, RAPD, TEPORINGO, ESPECIES ENDÉMICAS, ZOOLÓGICO DE CHAPULTEPEC, BIOLOGÍA.

Recibido el 24 de mayo de 2004 y aceptado el 5 de octubre de 2004.

*Laboratorio de Zoología, Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, 80010, Culiacán, Sinaloa, México. Correo electrónico: vsalomon@uas.uasnet.mx

**Departamento Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y Sociales, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Correo electrónico: jlcm@xanum.uam.mx

***Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Correo electrónico: carlosgv@servidor.unam.mx

Introduction

Biodiversity, taken as the diversity of living organisms in an area or in the planet, can be subdivided into three levels:¹ diversity of species, that includes all the existing species on Earth; genetic diversity, which includes the genetic variation of species in geographically isolated populations and among individuals of a simple population; and community diversity, which includes the variation in habitats and ecosystems of a region, which is in rapid decline as a direct or indirect consequence of human activities such as destruction or fragmentation of habitats and ecosystems, introduction of new species, overexploitation of natural resources and pollution.^{1,2} As a consequence, there are plant and animal species that require studies for their management and protection.³

An alternative for recovering some species at risk of extinction is *ex situ* conservation, either in zoos or in wild animal reproduction centers. Nevertheless, there are studies where it has been shown that the degree of consanguinity increases rapidly in animals bred in zoos and therefore the reduction in their genetic variability,⁴ attributed mainly to the small number of founding individuals and endogamic crosses during several generations.⁵

At present, the measurement of genetic variability at the genomic level is possible through molecular biology techniques, which have advantages over isoenzyme analysis because they can detect genomic and mitochondrial DNA polymorphisms. One of these techniques, based on PCR (*Polymerase Chain Reaction*) is the RAPD analysis (*Random Amplified Polymorphic DNA*), which detects short DNA sequences of unknown nucleotide composition by using short oligonucleotide sequences (of ten base pairs) as primers. This procedure has been widely used for quantifying genetic diversity in a large number of species of plants,^{6,7} insects,⁸ artiodactyls,⁹ large felines,¹⁰ rodents,¹¹ birds,¹² amphibians,¹³ and fish.¹⁴

The zacatuche, teporingo or volcano rabbit (*Romerolagus diazi*), species endemic to the transverse neovolcanic axis in Mexico,^{15,16} has seen its survival reduced within its habitat due to different causes such as reduction in their distribution area and the fragmentation of its habitat, among others.¹⁷

Although there has been interest in the reproduction of the species both in laboratory conditions and semi-captivity,^{18,19} at this time the only known reproductive nucleus is located in Chapultepec Zoo in Mexico City, which originates from a small number of founders²⁰ in a random breeding structure during 20 generations.

Given this situation, the objective of this study was

Introducción

La biodiversidad, tomada como la diversidad de seres vivos en un área o en el planeta, se puede subdividir en tres niveles:¹ la diversidad de especie, que incluye todas las especies existentes en la Tierra; la diversidad genética, la cual incluye la variación genética de las especies de poblaciones separada geográficamente y entre individuos de una simple población; y la diversidad de comunidades, que incluye la variación en los hábitat y ecosistemas de una región, la cual está disminuyendo rápidamente como consecuencia directa o indirecta de las acciones humanas, como la destrucción o fragmentación de los hábitat y ecosistemas, la introducción de especies, la sobreexplotación de los recursos naturales y la contaminación.^{1,2} Como consecuencia, existen especies de animales y plantas que requieren estudios para su manejo y protección.³

Una alternativa para la recuperación de algunas especies en peligro de extinción es la conservación *ex situ*, ya sea en zoológicos o centros de reproducción de fauna silvestre. Sin embargo, existen estudios en los cuales se ha mostrado que en los animales criados en zoológicos se aumenta rápidamente su grado de consanguinidad y, por ende, la reducción en su variabilidad genética,⁴ atribuida principalmente al pequeño número de fundadores, y al cruzamiento endogámico por varias generaciones.⁵

Actualmente, la medición de la variación a nivel del ADN es posible a través de técnicas de biología molecular, que presentan ventajas sobre el análisis de isoenzimas, debido a que pueden detectar polimorfismos en ADN codificante y ADN mitocondrial. Una de estas técnicas, basada en PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) es el RAPD (*random amplified polymorphic DNA* o amplificación al azar de ADN polimórfico), que detecta ADN del cual no se conoce la secuencia de nucleótidos, a través de secuencias cortas de oligonucleótidos (de diez pares de bases) y que se emplean como cebadores. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de la diversidad genética en gran número de especies vegetales,^{6,7} insectos,⁸ artiodáctilos,⁹ grandes felinos,¹⁰ roedores,¹¹ aves,¹² anfibios¹³ y peces.¹⁴

El zacatuche, teporingo o conejo de los volcanes (*Romerolagus diazi*) especie endémica del eje neovolcánico transversal en México,^{15,16} cuya sobrevivencia se ha visto mermada en su hábitat debido a diferentes causas como la reducción del área de distribución y la fragmentación de su hábitat, entre otras.¹⁷

Aunque ha existido interés en la reproducción de la especie en condiciones de laboratorio y semicautiverio,^{18,19} actualmente el único núcleo en cautiverio

to estimate the loss of genetic variability in a captive population in relation to the wild population of *Romerolagus diazi* through the use of a RAPD analysis.

Material and methods

Samples were obtained from two populations of *Romerolagus diazi*: one in the wild and the other one in captivity. Nine wild individuals came from the Parres region in Mexico City (sample collection permit from the INE, Code DOO 750.-26/8/97) and 13 individuals from the captive colony in Chapultepec Zoo. A 1 cm² sample of ear tissue was taken from all individuals, and these were stored in cryogenic tubes and were preserved in liquid nitrogen for posterior DNA extraction. During sample collection the individuals were handled the least time possible in order to avoid any stress, which could cause their death. The average handling time per animal was five minutes with a survival rate of 100%. DNA was extracted from the ear tissue according to the method by Aljanabi and Martinez;²¹ Table 1 shows the oligonucleotides selected for amplifying DNA from *Romerolagus diazi* with the RAPD-PCR technique.

DNA concentration was determined through spectrophotometer (260 nm), their purity was obtained through the relation 260 nm/280 nm, and their integrity by separating 1.5 µg of DNA by 0.8% agarose gel electrophoresis. Genomic DNA was diluted to a final

conocido se encuentra en el Zoológico de Chapultepec de la ciudad de México, el cual desciende de un número reducido de fundadores²⁰ en cruzamiento al azar por 20 generaciones.

Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la pérdida de la variabilidad genética en una población en cautiverio con relación a la población silvestre de *Romerolagus diazi* mediante la utilización del método RAPD.

Material y métodos

Se obtuvieron muestras en dos poblaciones de *Romerolagus diazi*: una silvestre y otra en cautiverio. Nueve individuos silvestres fueron de la región de Parres, D.F. (permiso del INE para recolectar, Clave: DOO 750.-26/8/97) y 13 individuos de la colonia en cautiverio del Zoológico de Chapultepec. A todos los ejemplares se les tomó una muestra de tejido de oreja de 1 cm², las cuales se almacenaron en criotubos y se preservaron en nitrógeno líquido para posteriormente extraer el ADN. Durante la toma de la muestra se manipuló a los ejemplares el menor tiempo posible con el fin de evitar el estrés que pudiera ocasionarles la muerte. El tiempo promedio de manejo por animal fue de cinco minutos con una sobrevivencia de 100%. El ADN de tejido de oreja se extrajo de acuerdo con el método de Aljanabi y Martínez,²¹ el Cuadro 1 muestra los oligonucleótidos seleccionados para la ampli-

Cuadro 1

CEBADORES (OLIGONUCLEOTIDOS) DEL KIT E (OPERON, INC) SU SECUENCIA Y EL PORCENTAJE DE G + C DE CADA UNO, UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *R. diazi*.

PRIMERS (OLIGONUCLEOTIDES) FROM KIT E (OPERON, INC.) THEIR SEQUENCE AND THE G + C PERCENTAGE OF EACH ONE, USED IN THE AMPLIFICATION OF DNA FROM *R. diazi*

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

*Primers selected for the amplification of DNA from *Romerolagus diazi* with the RAPD-PCR technique.

Cuadro 2
 PORCENTAJE DE POLIMORFISMO (# DE *LOCI* POLIMÓRFICOS) POR CEBADOR PARA CADA POBLACIÓN, SUBTOTAL Y EL TOTAL PARA LAS DOS POBLACIONES
 POLYMORPHISM PERCENTAGE (# OF POLYMORPHIC *LOCI*) PER PRIMER FOR EACH POPULATION, THEIR SUBTOTAL AND TOTAL FOR BOTH POPULATIONS

% polymorphism (# of individuals)			
<i>Primer</i>	# loci	<i>Chapultepec</i>	<i>Pelado Volcano</i>
OPE-01	5	40 (2)	40 (2)
OPE-06	8	38 (3)	25 (2)
OPE-19	13	62 (8)	69 (9)
OPE-20	5	0 (0)	20 (1)
Subtotal	31	42 (13)	45 (14)
Total	31	68 (21)	

Cuadro 3
 PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD POR *LOCI* EN LA COLONIA EN CAUTIVERIO DE CHAPULTEPEC CON RELACIÓN A LA POBLACIÓN SILVESTRE CALCULADA A PARTIR DE DATOS RAPD
 HETEROZYGOSITY LOSS IN EACH *LOCI* IN THE CAPTIVE COLONY IN CHAPULTEPEC ZOO IN RELATION TO THE WILD POPULATION CALCULATED FROM RAPD DATA

<i>Locus</i>	<i>Wild</i>		<i>Captive</i>	
	<i>Frequency (q)</i>	<i>Heterozygosis</i>	<i>Frequency (q)</i>	<i>Heterozygosis</i>
<i>Locus 5*</i>	0.5246	0.4688	1.0000	0.0000
<i>Locus 18*</i>	0.6287	0.4669	0.9615	0.0740
<i>Locus 19*</i>	0.6287	0.4669	0.9615	0.0740
<i>Locus 21*</i>	0.5246	0.4988	1.0000	0.0000
<i>Locus 22*</i>	0.7981	0.3223	1.0000	0.0000
<i>Locus 23*</i>	0.7981	0.3223	1.0000	0.0000
<i>Locus 24*</i>	0.7981	0.3223	1.0000	0.0000
<i>Locus 29</i>	0.8706	0.2253	1.0000	0.0000

P < 0.05

concentration of 100 ng/μl and was used directly for RAPD-PCR analysis.

The information was analyzed using the TFPGA software (*Tool for Population Genetic Analysis* ver. 1.3)²² and POPGENE (*Population Genetic Analysis* ver. 1.32), the comparison between populations was carried out through a chi square exact test.²³

In the analysis of the RAPD markers we considered that each marker represents a Mendelian type *locus* where the visible marker is a dominant allele²⁴ in Hardy-Weinberg equilibrium,²⁵ and that the different *loci* do not migrate in the same position on the gel,²⁵ therefore the banding pattern that is obtained

ficación del ADN de *Romerolagus diazi* con la técnica RAPD-PCR.

La concentración del ADN se determinó por espectrofotometría (260 nm) y su pureza se obtuvo mediante la relación 260 nm/280 nm y su integridad, separando 1.5 μg de ADN por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. El ADN genómico se diluyó a concentración final de 100 ng/μl y fue utilizado directamente para el análisis por RAPD-PCR.

La información se analizó utilizando los programas TFPGA (*Tool for Population Genetic Analysis*, 1.3)²² y POPGENE (*Population Genetic Analysis*, ver 1.32),

for one individual can be compared against that of other individuals.

The expected behavior of the heterozygote frequencies in the captive population of Chapultepec Zoo considered as effective population size that of the base or founding population (one male and four females)²⁰ $N_e = [(4(N_m)(N_h))/(N_m + N_h)]$, where N_e is the effective population size, N_m and N_h are the number of reproductive males and females respectively, while the consanguinity coefficient at "t" generation is estimated as $F_t = 1 - [1 - (1/2 N_e)]^t$ where N_e is as described above and t is the time or generation of interest, and the expected heterozygotes those individuals in the wild population under the condition that they are in Hardy-Weinberg equilibrium.^{26,27}

Results

The OPE-01 oligonucleotide amplified five bands, of which three (those with the smaller molecular weight) were found only in wild individuals, two bands of approximately 1.6 Kb and 1.2 Kb common to both populations. Oligonucleotide OPE-06 amplified a total of eight bands present in both populations; OPE-19 amplified a total of 13 bands, of which a band of 2.3 Kb was specific to captive individuals, while OPE-20 amplified a total of five bands of which a band of approximately 0.9 Kb was specific to wild individuals and the remaining four bands of 1.4, 1.0, 0.8 and 0.7 Kb were present in all individuals of both populations.

In total, four primers used in the RAPD-PCR reaction amplified 31 bands, where oligonucleotide OPE-19 was the one that amplified the greater number of bands (13), representing approximately 41% of the bands observed. A total of 32% (10) of the bands amplified were unique to one of the populations; where 3% (1) was specific to the captive population of Chapultepec Zoo and 29% (9) were specific to wild individuals.

Of the total *loci* amplified, 68% (21) of them are polymorphic and 32% (10) are represented by monomorphic bands. The polymorphism percentage was calculated based on a 99% criterion, meaning that when the most common allele has a frequency below 0.99. It was observed that the captive population has a slightly lower polymorphism percentage in comparison to the wild population, 42 points and 45 points respectively. The total polymorphism percentage for all *loci* in both populations was 68 points (Table 2). Furthermore, the average heterozygosity in the captive population was different (0.1501) from that of the wild population (0.1718). The genetic identity and distance between these two populations were 0.8552 and 0.1564, respectively.

la comparación entre las poblaciones mediante la prueba exacta de Ji cuadrada.²³

En el análisis de los marcadores de RADP se consideró que cada marcador representa un *locus* mendeliano en el cual el marcador visible es un alelo dominante²⁴ y está en equilibrio de Hardy-Weinberg,²⁵ y que los marcadores de *loci* diferentes no migran en la misma posición sobre el gel,²⁵ por lo que el patrón de bandas que se obtiene de un individuo puede ser comparado contra otros individuos.

El comportamiento esperado de las frecuencias de heterocigotos en la población en cautiverio del Zoológico de Chapultepec consideró un tamaño efectivo de la población base o fundadora (un macho y cuatro hembras)²⁰ $N_e = [(4(N_m)(N_h))/(N_m + N_h)]$, donde N_e es el número efectivo de la población, N_m y N_h es el número de machos y hembras reproductores, mientras que el coeficiente de consanguinidad en la generación "t" se estima como $F_t = 1 - [1 - (1/2 N_e)]^t$, donde N_e se describió previamente y t es el tiempo o generación de interés, siendo los heterocigóticos esperados los individuos observados en la población silvestre bajo el supuesto que se está en equilibrio de Hardy-Weinberg.^{26,27}

Resultados

El oligonucleico OPE-01 amplificó cinco bandas, de las cuales tres (las de menor peso molecular) se encontraron solamente en los individuos silvestres, siendo dos bandas de aproximadamente 1.6 Kb y 1.2 Kb comunes en ambas poblaciones. El OPE-06 amplificó un total de ocho bandas presentes en las dos poblaciones; el OPE-19 amplificó un total de 13 bandas, de las cuales una banda de 2.3 Kb fue específica para los ejemplares en cautiverio, mientras que el OPE-20 amplificó cinco bandas en total, de las cuales una banda de aproximadamente de 0.9 Kb fue específica para individuos silvestres, las cuatro bandas restantes de 1.4, 1.0, 0.8 y 0.7 Kb se presentaron en ambas poblaciones y en todos los individuos.

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

Del total de *loci* amplificados, 68% (21) que se detectó son polimórficos y 32% (10) están representados por bandas monomórficas. El porcentaje de polimorfismo se calculó con base en un criterio del 99%;

The molecular analysis showed that of the total genetic variation observed between the two populations of *Romerolagus diazi*, about 46% can be attributed to differences between populations, while close to 54% of the total genetic variation is within the populations.

Of the total *loci* observed in this study, 39% have been fixed in both populations where *loci* 3 and 4 have been fixed on the dominant allele in the wild population, while in the Chapultepec population they have been fixed towards the recessive allele; the other ten have been fixed towards the dominant allele in both populations. Another 10 *loci* (1, 2, 6, 11, 14, 15, 16, 17, 20 and 26) did not show a significant difference between both populations. A total of 23% of the *loci* (5, 18, 19, 21, 22, 23 and 24) are statistically different between populations ($P < 0.05$) and 3% (*locus* 29) showed differences at $P < 0.14$. These eight *loci* represent 57% of the 14 polymorphic *loci* present in the wild population, six of which have been fixed towards the recessive allele in the Chapultepec population. In these *loci* 100% of the genetic variability was lost, in comparison with the heterozygotes observed in the individuals of the wild population (Table 3). Two of these *loci* (18 and 19) have lost approximately 88% of their genetic variability in relation to the heterozygote situation observed in the wild population. *Locus* 13 was the only one with statistical significance ($P < 0.01$) that showed a higher heterozygote frequency in Chapultepec ($q^2 = 0.7981$ and $2pq = 0.4304$) when compared to the wild population ($q^2 = 0.3135$ y $2pq = 0.3223$).

Discussion

The variation of the RAPD pattern was detected by four of the primers used, although individually they differ in the number of bands that they amplify. We observed that the OPE-19 oligonucleotide was the one that revealed the greatest genetic variability of the four that were selected for carrying out this study and it detected, as expected, a greater variability in the wild population. Both OPE-01 and OPE-20 amplified the same number of bands and a 50% difference in variability was observed; OPE-01 showed a greater variability when compared to OPE-20, but it was similar in both populations. Nevertheless, even when OPE-20 was the one that revealed a lower variability, this was greater in the wild population when compared to the captive population, which suggests genetic drift. When comparing the genetic variability between OPE-01 and OPE-06 we observed that even though OPE-01 amplified a smaller number of bands, the variability percentage is greater than OPE-06, which shows a greater variability in the Chapultepec

es decir, cuando el alelo más común tiene una frecuencia menor de 0.99. Se observó que la población en cautiverio tiene un porcentaje ligeramente menor de polimorfismo con respecto a la población silvestre, 42 points y 45 points, respectivamente, el porcentaje de polimorfismo total de todos los *loci* y en ambas poblaciones fue de 68 puntos (Cuadro 2). Asimismo, el promedio heterocigótico en la población confinada fue diferente (0.1501) respecto de la población silvestre (0.1718). La identidad y distancia genética observada entre estas dos poblaciones fueron: 0.8552 y 0.1564, respectivamente.

El análisis molecular mostró que del total de la variación genética encontrada entre las dos poblaciones de *Romerolagus diazi*, aproximadamente 46% es atribuible a diferencias entre poblaciones, mientras que cerca de 54% del total de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones.

Del total de *loci* observados en este estudio, 39% se han fijado en ambas poblaciones, donde los *loci* 3 y 4 se han fijado hacia el alelo dominante en la población silvestre mientras que en la población de Chapultepec se han fijado hacia el alelo recesivo, los diez restantes se han fijado hacia el alelo dominante en ambas poblaciones. Diez *loci* más (1, 2, 6, 11, 14, 15, 16, 17, 20, 26) no presentaron diferencia significativa entre ambas poblaciones. El 23% de los *loci* (5, 18, 19, 21, 22, 23, 24) son significativamente diferentes entre poblaciones ($P < 0.05$) y 3% (*locus* 29) mostró diferencias a $P < 0.14$. Estos ocho *loci* representan 57% de los 14 *loci* polimórficos presentes en la población silvestre, seis de los cuales se han fijado hacia el alelo recesivo en la población de Chapultepec; en estos *loci* se perdió 100% de la variabilidad genética, en comparación con los heterocigotos observados en los individuos de la población silvestre (Cuadro 3). Dos de estos *loci* (18 y 19) han perdido aproximadamente 88% de la variabilidad genética con respecto a la circunstancia heterocigótica observada en la población silvestre. El *locus* 13 fue el único con significancia estadística ($P < 0.01$) que presentó mayor frecuencia de heterocigotos en Chapultepec ($q^2 = 0.7981$ y $2pq = 0.4304$), en comparación con la población silvestre ($q^2 = 0.3135$ y $2pq = 0.3223$).

Discusión

La variación del patrón RAPD fue detectada por cuatro de los cebadores utilizados, aunque en forma individual difieren en el número de bandas que amplifican. Se observó que el oligonucleótido OPE-19 fue el que más variabilidad genética reveló de los cuatro seleccionados para la realización de este estudio, detectando mayor variabilidad en la población silvestre, como era de esperarse. El OPE-01 y

population, contrary to what was expected. Nevertheless, when taking into consideration all of the *loci* observed, we found a significant difference ($P < 0.05$) between the two populations.

The results of this study differ from what was expected because when considering the Chapultepec population, with an extreme consanguinity coefficient ($F = 0.96$) and calculated from five founding individuals (one male and four females), four of the *loci* should conserve at least 2% of the genetic variability and four should conserve 1% of the heterozygotes in relation to the wild population. This indicates that in the Chapultepec population there is a heterozygote deficiency in six of the *loci*.

The results reveal that some alleles of the wild population have been lost in the Chapultepec colony, with the average heterozygosity approximately 2.17% greater in the wild population.

Referencias

1. Primack RB. Essentials of conservation biology. Sunderland, MA: Sinauer, C. 1993.
2. Meffe GK, Carroll CR. Principles of Conservation Biology. Sunderland, MA: Sinauer. 1994.
3. Garner KJ, Ryder OA. Some applications of PCR to studies in wildlife genetics. Symp Zool Soc Lond 1992;64: 167-181.
4. Laikre L. Hereditary defects and conservation genetic management of captive populations. Zoo Biol 1999;18: 81-99
5. Stewart AJ, Hutchings MJ. Conservation of populations. In: F. Spellerberg editor, Conservation Biology, Singapore, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. 1997;123-140
6. Bauert MR, Kälén M, Baltisberger M, Edwards PJ. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. Mol Ecol 1998; 7: 1519-1527.
7. Huff DR, Quinn JA, Higgins B, Palazzo AJ. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem (*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash) populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. Mol Ecol 1998; 7: 1591-1597.
8. Nagaraja GM, Nagaraju J. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primer. Electrophoresis, 1995;16: 1633 - 1638.
9. Kostia S, Palo J, Varvio S. ADN sequences of RAPD fragments in artiodactyls. Genome, 1996;39: 456-458.
10. Shankaranarayanan P, Banerjee M, Kacker RK, Aggarwal RK, Singh L. Genetic variation in Asiatic lions and Indian tigers. Electrophoresis, 1997;18: 1693-1700.
11. Gordon AD, Lattier LD, Silbiger NR, Torsella J, Wolff OJ, Smith KM. Determination of genetic diversity and paternity in the Gray-Tailed vole (*Microtus canicaudus*) by RAPD-PCR. J Mammal 1998;79:604-611.
12. Dhar AK, Pokras MA, García DK, Evers DC, Gordon ZJ, Alcivar-warren A. Analysis of genetic diversity in common loon *Gavia immer* using RAPD and mitochondrial RFLP techniques. Mol Ecol 1997;6: 581-586.
13. Kimberling ND, Ferreira AR, Shuster SM, Keim P. RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog population in the south-western USA. Mol Ecol 1996;5:521-529.
14. Gomes C, Dales GRB, Oxenford HA. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flying fish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. Mol Ecol 1998;7: 1519-1527.
15. Cervantes FA, Lorenzo C, Hoffmann RS. *Romerolagus diazi*. Mamm Species 1990; 360:1-7.
16. Bell DJ, Hoth J, Velazquez A, Romero FJ, Leon L, Aranda M. A survey of the distribution of the Volcano rabbit *Romerolagus diazi*: an endangered Mexican endemic. Dodo, J. Jersey Wild Preserv Trust 1985;22:42-48.
17. Velazquez A. Man-made and ecological habitat fragmentation: study case of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). Z Säugetierkunde 1993;58:54- 61. Matsuzaki T, Kamiya M, Suzuki HT, Velázquez A.

18. Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. En: Velázquez A, Romero FJ, López-Paniagua J, editores Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. México. DF UNAM y Fondo de Cultura Económica 1996: 51-66.
19. Sauter CB. Conducta materna del conejo zacatuche en cautiverio. En: Velázquez A, Romero FJ, López-Paniagua J editores. Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. México. DF: UNAM y Fondo de Cultura Económica 1996: 67-72.
20. Hoth J, Granados H. A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, Mexico City. Int Zoo Yb 1987;26:261-265.
21. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic ADN for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res 1997; 25:4692-4693.
22. Miller MP. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.
23. Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation. Evolution 1995; 49: 1280-1283
24. Williams KGJ, Kubelink AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. ADN polymorphisms amplified by primer are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990;18: 6531-6535.
25. Lynch M, Milligan GB. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol Ecol 1994; 3:91-99.
26. Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer assoc, 1997.
27. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic of individuals. Genetics 1978; 89:583-590.