

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CARNE
GOURMET SEGÚN ESPECIE MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y
SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL.
FASE I: AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ADN MITOCONDRIAL

EDGAR JAVIER RINCON BARON
LUCIO NAVARRO ESCALANTE

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA

2004

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CARNE
GOURMET SEGÚN ESPECIE MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y
SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL.
FASE I: AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ADN MITOCONDRIAL

EDGAR JAVIER RINCON BARON
LUCIO NAVARRO ESCALANTE

Proyecto de Grado

Dirección
Jorge Hernández Torres, PhD.

Codirector
Clara Inés Vargas, Msc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA

2004

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi Familia, ya que fueron artífices incondicionales para su culminación. En especial a mi sobrina María Juliana Célis Barón, quien me enseñó que la vida es necesario vivirla con la máxima intensidad. Nunca la olvidaré.

Edgar Javier Rincón Barón

Este trabajo esta dedicado a mi hijo Juan Sebastián, quien ha sido el motor de mi dedicación, y a mis Padres y mi Hermano quienes se convirtieron en un apoyo constante de mi esfuerzo.

Lucio Navarro Escalante

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Director Jorge Hernández Torres y Codirectora Clara Inés Vargas por su invaluable apoyo y dedicatoria durante nuestro trabajo.

Al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) por facilitarnos un espacio y colaborarnos en el desarrollo del proyecto.

A todos los profesores de la Escuela de Biología* que nos impartieron la sabiduría necesaria para culminar esta obra.

A todos nuestros amigos que nos aguantaron y nos dieron aliento en los momentos difíciles.

A la Secretaría de Salud de Santander por creer en nuestra propuesta y trabajo, el cual financiaron. En especial al Doctor Carlos Augusto García y Omaira Sandoval funcionarios de la misma, por su valiosa colaboración.

* En especial al profesor Humberto García por su incondicional apoyo moral. **Edgar J. Rincón B.**

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 LA VARIACIÓN GENÉTICA COMO BASE PARA LA DIFERENCIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA	3
1.2 DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES CON BASE EN EL ADN MITOCONDRIAL	4
1.2.1 La mitocondria, central energética de la célula	4
1.2.2 La mitocondria, un organelo con sistema genético propio	5
1.2.3 El mtDNA: una fina herramienta para la identificación y clasificación de las especies	7
1.2.4 Genes del mtDNA para la identificación de especies: ¿Por qué el <i>cyt b</i> ?	9
2. METODOLOGÍA	14

2.1 ESTABLECIMIENTO DE LA BASE DE DATOS DEL GEN <i>cyt b</i>	14
2.2 SELECCIÓN DE LA REGIÓN DENTRO DEL GEN <i>cyt b</i> Y OLIGONUCLEÓTIDOS CONSERVADOS PARA AMPLIFICACIÓN	14
2.3 TOMA Y PRESERVACIÓN DE TEJIDOS ANIMALES FUERA DEL LABORATORIO	15
2.3.1 Toma de tejido para identificación de especies	15
2.3.2 Manejo de las muestras en el laboratorio	15
2.3.3 Etiquetado del material	15
2.4 METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DEL ADN total	17
2.4.1 Aislamiento de ADN de tejido muscular crudo	17
2.4.1.1 Método PCI	17
2.4.1.2 Protocolo de extracción en sangre del FBI	18
2.4.1.3 Método de extracción alcalina	19
2.4.2 Extracción de ADN con el Kit	20

2.4.3 Visualización de los aislamientos de ADN	20
2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	20
2.5.1 Digestión enzimática del amplificado.	21
3. RESULTADOS	23
3.1 ESTABLECIMIENTO DE LA BASE DE DATOS DEL GEN <i>cyt b</i>	23
3.2 SELECCIÓN DE LA REGIÓN EN EL GEN <i>cyt b</i> A AMPLIFICAR Y PRIMERS COMUNES PARA PCR	25
3.3 EXTRACCIÓN DE ADN	28
3.4 RENDIMIENTO DE ADN	30
3.5 AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA (PCR) DEL FRAGMENTO SELECCIONADO	31
3.5.1 Digestión enzimática	34
4. DISCUSIÓN	36
4.1 SELECCIÓN DEL MARCADOR GENÉTICO Y OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR	36

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN	37
4.3 AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA	39
5. CONCLUSIONES	42
6. RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Especies con secuencia del gen <i>cyt b</i> conocida.	23
Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificación del fragmento interno del gen <i>cyt b</i> .	28
Tabla 3. Cantidades de ADN total aislados de tejido muscular crudo y material cárnico procesado.	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema que representa la estructura de la mitocondria.	5
Figura 2. El genoma mitocondrial se encuentra en múltiples copias y su estructura es circular.	6
Figura 3. Esquema del genoma mitocondrial humano.	7
Figura 4. Esquema que representa la posición que ocupa la proteína citocromo <i>b</i> en la membrana interna de la mitocondria.	10
Figura 5. Secuencia de ADN y la proteína correspondiente del gen <i>cyt b</i> de res (<i>Bos taurus</i>).	10
Figura 6. Variabilidad de los aminoácidos en el citocromo <i>b</i> de mamíferos.	11
Figura 7. Fragmento del gen <i>cyt b</i> amplificado por los oligonucleótidos L14841 y H15149.	26
Figura 8. Alineamiento asistido por el programa ClustalW de un segmento del gen <i>cyt b</i> .	28
Figura 9. Resultados del aislamiento de ADN total en tejido muscular crudo y procesado.	29
Figura 10. La evaluación de la calidad amplificable del ADN aislado empleando el método PCI y las modificaciones hechas al protocolo original.	32
Figura 11. Amplificación por PCR del fragmento interno del gen <i>cyt b</i> (379 pb) en muestras de ADN genómico aislado en tejido muscular crudo y procesado.	33

Figura 12. Efectos de la temperatura de hibridización en la PCR.	34
Figura 13. Digestión enzimática del amplificado PCR	33

TITULO: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CARNE GOURMET SEGÚN ESPECIE MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL. FASE I: AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ADN MITOCONDRIAL

Edgar Javier Rincón Barón**
Lucio Navarro Escalante**

Palabras claves: ADN mitocondrial, Carne Gourmet, Amplificación Enzimática (PCR), Tipificación, *Citocromo b*.

RESUMEN

Se probaron y modificaron varios métodos para la extracción de ADN total, a partir de productos cárnicos frescos y procesados. El método más apropiado consiste en una maceración del tejido con hielo seco, para luego digerir con proteinasa K, posterior extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) y finalmente precipitación con etanol. A partir de 100 mg de tejido fresco se obtuvo un rendimiento promedio de 1.7 µg/µl de ADN total, mientras que para procesados los rendimientos fueron menores. A partir de las muestras de ADN, en 30 ciclos de PCR y con la utilización de oligonucleótidos conservados, dirigidos a un fragmento del gen citocromo *b* (*cyt b*), se obtuvo un máximo de 1300 ng de ADN del fragmento génico de interés por cada volumen de reacción de 100 µl. Estos rendimientos varían dependiendo de la fuente del tejido (fresco o procesado), así como su origen y el tiempo *post mortem*. El desarrollo de estos procedimientos rinde suficiente ADN vía PCR para utilizarlos en posteriores análisis, objeto de la fase II de este proyecto de investigación, que busca tipificar el origen animal de la muestra.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CINBIN. Jorge Hernández Torres. Clara Inés Vargas.

TITTLE. A PCR AND DNA SEQUENCING METHOD OF mtDNA TO IDENTIFY GOURMET MEAT ACCORDING TO SPECIES. PHASE I: ENZIMATIC AMPLIFICATION OF MITOCHONDRIAL DNA.

Edgar Javier Rincón Barón**
Lucio Navarro Escalante**

Key words: Mitochondrial DNA, Gourmet Meat, Enzimatic amplification (PCR), Tipification, Citochromo *b*.

ABSTRACT

A variety of methods were proved to extract total DNA from fresh and packaged meat products. The best method consists on tissue homogenization with dry ice and proteinase K digestion. After a phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, approximately 1.7µg/µl of total DNA was obtained from 100 mg of fresh meat. For packaged samples this was less. From DNA samples, a cytochrome *b* gene fragment was amplified by PCR using conserved primers chosen through data researches and alienation. It was produced between 250-1300ng of the target fragment. These efficiencies change depending on the tissue source (fresh or packaged), its origin and the *post mortem* time as well. The development of these processes gets enough DNA by PCR to be used in further studies such as the tipification of the animal sample origin.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CINBIN. Jorge Hernández Torres. Clara Inés Vargas.

INTRODUCCIÓN

La sustitución ilegal de la carne y derivados para el consumo humano es una realidad en Colombia. Por tratarse de una actividad clandestina, no se tienen cifras exactas del tipo y volumen de productos que se expenden diariamente en tiendas, mercados, carnicerías, etc. sin que las autoridades sanitarias, por razones de orden técnico, puedan realizar un control eficaz para aplicar los correctivos necesarios.

La ley estipula que la carne de expendio legal debe portar en la etiqueta su origen animal, en la mayoría de los casos este deber para con el consumidor no se cumple, principalmente porque los sitios de venta de carne reciben la mercancía en medianas porciones, la reducen y procesan rústicamente y la revenden al detalle. Es prácticamente imposible para las autoridades sanitarias, en particular la Secretaría de Salud de Santander, ejercer un control sobre los innumerables puntos de venta de carnes y derivados, sin un método eficaz para identificar especies de consumo ilegal.

En la actualidad, se dispone de una prueba de aplicación limitada que pondera el índice de refracción de la grasa presente en una muestra de tejido animal. Esta tecnología no se puede aplicar al control de calidad de los derivados cárnicos. Además, esta técnica solo permite identificar carne procedente de equinos, más no de otras especies de las cuales se sabe de su distribución e.g., perros, gatos, ratas, serpientes, iguanas, caimanes y un sinnúmero de animales en riesgo de extinción por su caza indiscriminada como el tapir, la babilla y el zaino.

En el artículo cuarto de la resolución número 00222 de 1990, se declaró apta para el consumo humano la carne de equino de cría en el territorio colombiano, existiendo únicamente dos mataderos autorizados en Buga y Valledupar.

No obstante, se tienen suficientes evidencias de que el mercado está ampliamente invadido de carne de dudosa procedencia, principalmente equina. Por esta razón, se hace indispensable desarrollar una prueba de laboratorio confiable que permita verificar la procedencia de la carne en productos que se venden bajo la etiqueta de carnes de res, cerdo, cabra, oveja, pollo y otras especies de consumo legal.

El presente proyecto de investigación propone el desarrollo de una metodología para la identificación según especie, de carne de consumo humano que se expende comercialmente. Con la metodología implementada, se podrán identificar muestras de carnes crudas así como procesadas. Esta tecnología ampliará radicalmente la cobertura en la tipificación de los derivados cárnicos y hace posible un control de calidad que hasta el momento no pueden realizar las autoridades sanitarias en Colombia y muy seguramente en Latinoamérica.

Esta primera fase del proyecto se propone estandarizar los métodos de muestreo, extracción y amplificación por PCR, del ADN de las especies susceptibles de expendio al público. Los resultados que a continuación se describen, serán el punto inicial para la estandarización de la técnica de identificación.

Para la culminación de los objetivos propuestos en la Fase I de este proyecto de investigación, se hace necesario el conocimiento a fondo y detallado de la estructura y evolución del ADN mitocondrial, por ello, haremos énfasis en el gen *cyt b*, el cual hemos escogido por el amplio conocimiento que se tiene de él.

1. ANTECEDENTES

1.1 LA VARIACIÓN GENÉTICA COMO BASE PARA LA DIFERENCIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA

En ninguna especie existen dos individuos genéticamente idénticos. La variación genética se halla presente en todos los organismos. Una especie común es polimórfica en alrededor de 30% de los genes y en promedio un individuo es heterocigoto en un 10% de sus genes. Debido a que según el código genético más de un triplete especifica un mismo aminoácido, los valores de variación proteica son netamente inferiores a los encontrados a nivel de secuencias de ADN. En esta molécula la heterocigosidad media es 0,006 o sea, 6 de 1000 pares de bases difieren en dos secuencias tomadas al azar de una población (Klug & Cummings, 1999).

La variación es un requisito indispensable para la evolución. De otra forma sería imposible el funcionamiento de mecanismos como la selección natural y por lo tanto, la adaptación de los organismos a nuevas condiciones ambientales. La evolución es un proceso por el que la variación dentro de las especies se transforma en variación entre especies. Por otro lado, la magnitud de la variación genética en una especie determinada es consecuencia de su historia evolutiva, en la cual la selección natural y la deriva genética son las fuerzas moduladoras de dicha variación.

Existen dos niveles de variación: si la variación es fenotípica, esta puede dividirse en morfológica, fisiológica y conductual. El otro nivel de variación es genotípico, i.e., a nivel de la secuencia misma de los genes.

Otra forma de clasificación de la variación es en cualitativa y cuantitativa. La variación cualitativa es el objeto de análisis de la genética mendeliana. Por otra parte, cualquier carácter fenotípico (morfológico, fisiológico, conductual) que toma distintos valores cuantificables en diferentes individuos y no sigue una patrón de herencia mendeliana simple, es un carácter cuantitativo.

La variación cuantitativa trata aspectos como: i) qué parte de la variación fenotípica de un carácter cuantitativo se debe a diferencias genéticas entre los individuos y qué parte a diferencias en el ambiente, ii) qué parte de la variación fenotípica puede ser seleccionada por un mejorador o por la selección natural. iii) cuántos genes o *loci* influyen sobre el carácter, cómo se distribuyen los *loci* por el genoma, qué efecto tienen los *loci* y como interactúan entre ellos.

Dos procesos moleculares son susceptibles de inducir variación genética: la mutación y la recombinación. La mutación genera variaciones puntuales mientras que la segunda proporciona nuevas combinaciones genéticas a la población, muchas de ellas con severas consecuencias, dependiendo de las regiones cromosómicas comprometidas. La migración y la introgresión entre especies son procesos que pueden inyectar nueva variación en las poblaciones y las especies. En los numerales siguientes veremos que el ADN mitocondrial está sujeto a una mayor variación interespecífica que el ADN nuclear y cómo aprovechar la magnitud de esta variación para identificar una especie.

1.2 DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES CON BASE EN EL ADN MITOCONDRIAL

1.2.1 La mitocondria, central energética de la célula. Las mitocondrias son organelos localizados en el citoplasma de todas las células eucarióticas y juegan un papel central en la generación de energía metabólica. Son las responsables de la sustracción de la mayor parte de la energía útil obtenida por la ruptura de carbohidratos y ácidos grasos, de los cuales se produce

ATP mediante la fosforilación oxidativa (Alberts et al., 1994; Cooper, 1997; Frey & Mannella, 2000).

Sobre la membrana interna se localiza la cadena transportadora de electrones (complejos I, II, III y IV), así como la ATPasa que utiliza el gradiente electroquímico para formar ATP. La membrana externa posee canales que facilitan el transporte de moléculas. Además, contiene enzimas que convierten los lípidos en sustratos para ciclos metabólicos dentro de la matriz (Fig. 1).

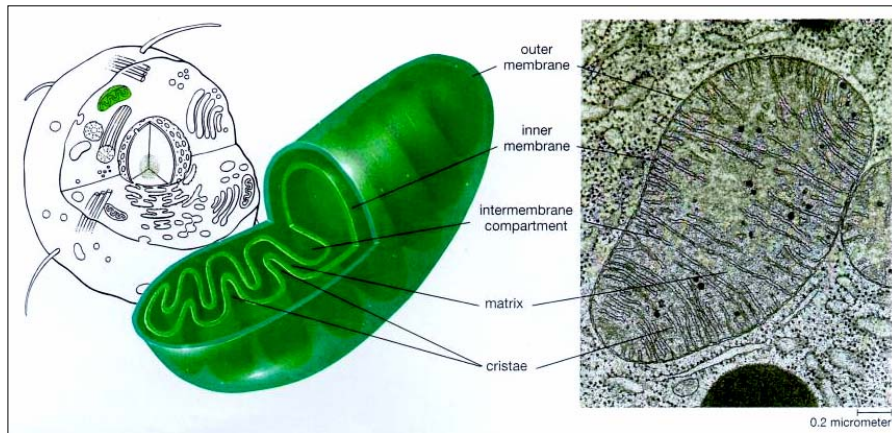


Fig. 1. Esquema que representa la estructura de la mitocondria (izquierda) y microfotografía electrónica (derecha). Dos membranas rodean la matriz interna y forman un espacio intermembranal (*intermembrane compartment*) donde ocurren el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. El número de mitocondrias por célula es variable, dependiendo de los requerimientos energéticos¹.

1.2.2 La mitocondria, un organelo con sistema genético propio. La mitocondria contiene un genoma propio que la convierte en un sistema genético semi-autónomo (Barrell et al., 1979;

¹ <http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/roanoke/mitochondria.jpg>

Gray et al., 1999). El origen de este material genético se explica a través de la teoría de la endosimbiosis y otros escenarios alternativos (Raven, 1970; Gray & Doolittle, 1982; Gray, 1989a, 1989b, 1992; Ballient et al., 1994; Gray & Spencer, 1996; Poyton & McEwen, 1996; Akhmanova et al., 1998; Anderson et al., 1998; Embley & Martin, 1998; Martin & Hermann, 1998; Martin & Müller, 1998; Mindell et al., 1998; Thorsnenn & Weber, 1996; Gray et al., 1999a, 1999b; Lang et al., 1999; Moreira et al., 2000; Palmer, 2000).

EL ADN mitocondrial o mtDNA está representado por una molécula de ADN en la mayoría de los casos circular (Fig. 2), presentándose múltiples copias por organelo. Los genes de eucariontes inferiores contenidos en el mtDNA pueden contener intrones. Este sistema genético codifica para proteínas indispensables de la cadena transportadora de electrones y la ATPasa (Collombet & Coutelle, 1998; Frey & Mannella, 2000).

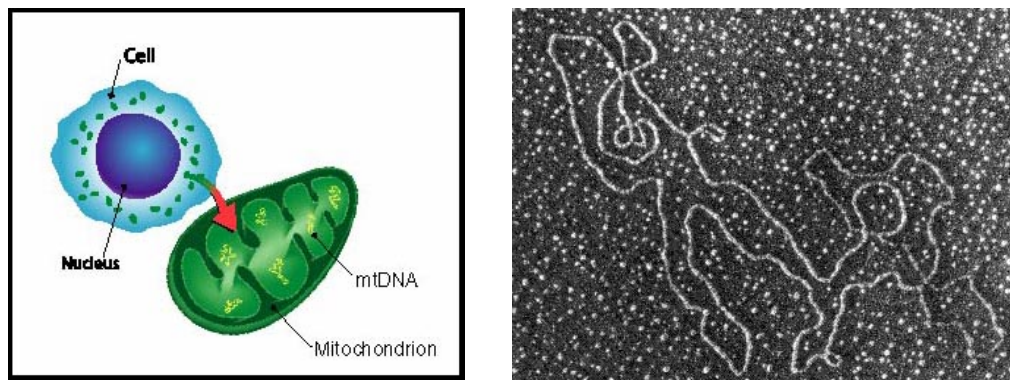


Fig. 2. El genoma mitocondrial se encuentra en múltiples copias (izquierda) y su estructura es circular como lo muestra la microfotografía de la derecha. Su tamaño es variable dependiendo de la especie a la que pertenece².

² http://www.mdausa.org/images/qpix/q9-5_Cell%20wmitochondrion.jpg
<http://bio.winona.msus.edu/berg/IMAGES/DNAmito.jpg>

El ADN mitocondrial animal es un ejemplo de extraordinaria economía dada la ausencia de regiones no codificantes (Bibb et al., 1981; Anderson et al., 1981 y 1982; Shadel & Clayton, 1997). Se han obtenido las secuencias completas del mtDNA de algunos animales (Bibb et al., 1981; Roe et al., 1981; Anderson et al., 1982), entre ellas el de humano (Anderson et al., 1981) (Fig. 3), las cuales son muy similares en tamaño y con muy pocas variaciones en su ordenamiento génico (Gray et al., 1999). Hasta la fecha, esta lista ha crecido vertiginosamente, habiéndose caracterizado genomas mitocondriales de más de 44 cordados y 23 no cordados (Gray & Lang, 1998; Boore, 1999).

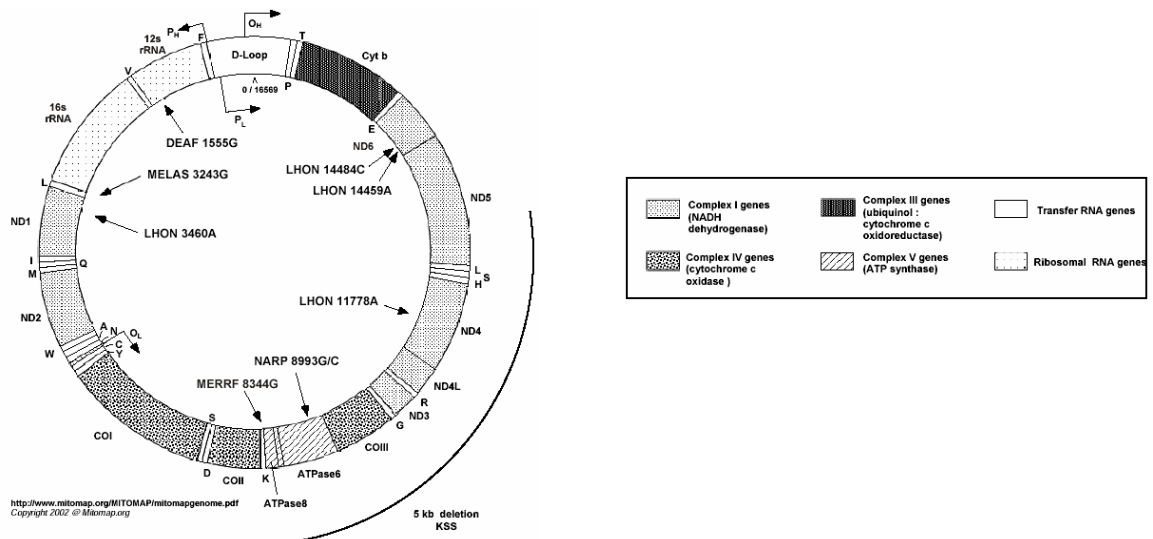


Fig. 3. Esquema del genoma mitocondrial humano, cuya secuencia fue publicada en su totalidad en 1981 (Anderson et al., 1981), la cual contiene 16.569 bp. Entre sus características sobresalientes se detectó la estrecha proximidad entre los genes. La última base de un gen se encuentra adyacente a la primera base del siguiente, presentándose traslapes y pérdida de tripletes o codones de terminación que al parecer son creados nuevamente por procesos de poliadenilación o *editing* del transcrito³.

³ <http://www.mitomap.org/>

1.2.3 El mtDNA: una fina herramienta para la identificación y clasificación de las especies.

El avance en las técnicas de secuenciación del ADN (Sanger et al., 1977 y 1985; Smith et al., 1986; Prober et al., 1987; Hunkapiller et al., 1991; Buchholz et al., 1999; Mahlknecht et al., 1999), rápidamente ha contribuido a la obtención de las secuencias completas de diferentes grupos de vertebrados, e.g., *Homo sapiens* (Anderson et al., 1981), *Rattus norvegicus* (Bibb et al., 1981), *Bos taurus* (Anderson et al., 1982) y *Xenopus laevis* (Roe et al., 1981), invertebrados (Wolstenholme et al., 1987), procordados (Boore, 1999), protozoos (Gray et al., 1998; Burger et al. 2000), algas (Gurge et al., 1999; Turmel et al., 2002a, 2002b), un buen número de briofitos, plantas superiores (Ward et al., 1981) y hongos. Por consiguiente, se ha profundizado el conocimiento sobre la organización del genoma de los organelos.

Los estudios filogenéticos evolutivos basados en el mtDNA han crecido rápidamente, entre otras razones porque i) el ADN mitocondrial es pequeño, ii) fácil de purificar, iii) ausencia de ADN no codificante y poca variación en el orden y contenido de los genes (Vawter & Brown, 1986). Estos estudios generalmente se han encaminado a clarificar y verificar relaciones filogenéticas, taxonómicas y genealógicas (Ferris et al., 1981; Edwards & Wilson, 1990; Mouchaty et al., 1995; Matthee & Robinson, 1997; Theimer & Keim, 1998; Clark et al., 2003; Steiner et al., 2003; Zink & Weckstein, 2003).

Por otra parte, el mtDNA ha facilitado el análisis de la estructura genética de las poblaciones (Hauswirth & Laipis, 1982; Pichler et al., 1998; Simonsen et al., 1998; Glenn et al., 2002; Li et al., 2003) así como el seguimiento del flujo ínter específico del mtDNA en la vida silvestre (Ferris et al., 1983). Un interesante enfoque es el uso de las regiones hipervariables HV1 y HV2 del D-Loop, para la identificación de humanos en la ciencia forense (Butler & Levin, 1998).

Bartlett & Davidson (1992) proporcionaron una utilidad práctica basada en la amplificación por PCR de secuencias del gen mitocondrial citocromo *b*, en una técnica llamada FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*). En tal procedimiento, utilizaron oligonucleótidos específicos que se unen a determinadas regiones de importancia funcional del gen *cyt b* de un gran número de vertebrados (Kocher et al., 1989). Posteriormente, procedieron a secuenciar el producto de la PCR y a determinar la especie a la cual pertenecían muestras de tejido de origen desconocido mediante el uso de un programa de comparación filogenético (PAUP). No obstante, en un trabajo posterior Russell & Carnegie (1994) rediseñaron el procedimiento utilizando otro programa basado en un algoritmo que compara secuencias y proyecta distancias evolutivas. Un programa basado en simples distancias es más apropiado que un programa basado en árboles, pues consume menos tiempo de cómputo, dado su enfoque no filogenético.

1.2.4 Genes del mtDNA para la identificación de especies: ¿por qué el *cyt b*? El citocromo *b* puede definirse como una proteína transportadora de electrones con un grupo *hemo* unido de manera no covalente a la apo-proteína. Una histidina provee el quinto ligando del grupo *hemo*. El citocromo *b* hace parte del complejo enzimático III de 8 polipéptidos (*cytochrome b-c1 complex*), inmerso en la membrana interna de la mitocondria, donde participa en procesos de óxido-reducción (Fig. 4).

El citocromo *b* es uno de los péptidos más estudiados de la mitocondria, no solamente a nivel estructural de la proteína, sino de la secuencia de ADN, de la cual se han registrado representantes de centenares de organismos. En la figura 5 se muestra la secuencia del gen *cyt b* de bovino (Anderson et al., 1982) con la respectiva secuencia de aminoácidos.

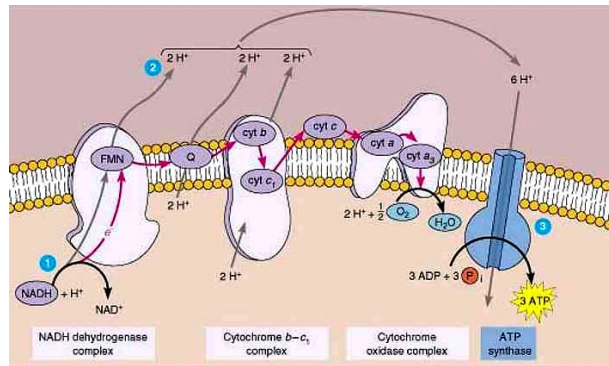


Fig. 4. Esquema que representa la posición que ocupa la proteína citocromo b en la membrana interna de la mitocondria. El complejo *b-c1* se encarga de oxidar la ubiquinona y transferir los electrones al citocromo c ⁴.

1	atg act aac att cga aag tcc cac cca cta ata aaa att gta aac aat gca ttc atc gac	60
1	M T N I R K S H P L M K I V N N A F I D	20
61	ctt cca gcc cca tca aac att tca tca tga tga aat ttc ggt tcc ctc ctg gga atc tgc	120
21	L P A P S N I S S W N F G S L L G I C	40
121	cta atc cta caa atc ctc aca ggc cta ttc cta gca ata cac tac aca tcc gac aca aca	180
41	L I L Q I L T G L F L A M H Y T S D T T	60
181	aca gca ttc tcc tct gtt acc cat atc tgc gca gac gtg aac tac ggc tga atc atc cga	240
61	T A F S S V T H I C R D V N Y G W I I R	80
241	tac ata cac gca aac gga gct tca atg ttt ttt atc tgc tta tat atg cac gta gga cga	300
81	Y M H A N G A S M F F I C L Y M H V G R	100
301	ggc tta tat tac ggg tct tac act ttt cta gaa aca tga aat att gga gta atc ctt ctg	360
101	G L Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L	120
361	ctc aca gta ata gcc aca gca ttt ata gga tac gtc cta cca tga gga caa ata tca ttc	420
121	L T V M A T A F M G Y V L P W G Q M S F	140
421	tga gga gca aca gtc atc acc aac ctc tta tca gca atc cca tac atc ggc aca aat tta	480
141	W G A T V I T N L L S A I P Y I G T N L	160
481	gtc gaa tga atc tga ggc gga ttc tca gta gac aaa gca acc ctt acc cga ttc ttc gct	540
161	V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A	180
541	ttc caat ttt atc ctt cca ttt atc ata gca att gcc ata gtc cac cta tta ttc ctc	600
181	F H F I L P F I I M A I A M V H L L F L	200
601	cac gaa aca ggc tcc aac aac cca aca gga att tcc tca gac gta gac aaa atc cca ttc	660
201	H E T G S N N P T G I S S D V D K I P F	220
661	cac ccc tac tat acc att aag gac atc tta ggg gcc ctc tta cta att cta gct cta ata	720
221	H P Y Y T I K D I L G A L L L I L A L M	240
721	cta cta gta cta ttc gca ccc gac ctc ctc gga gac cca gat aac tac acc cca gcc aat	780
241	L L V L F A P D L L G D P D N Y T P A N	260
781	cca ctc aac aca ccc cct cac atc aaa ccc gag tga tac ttc tta ttt gca tac gca atc	840
261	P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I	280
841	tta cga tca atc ccc aac aaa cta gga gga gta cta gcc cta gcc ttc tct atc cta att	900
281	L R S I P N K L G G V L A L A F S I L I	300
901	ctt gct cta atc ccc cta cta cac acc tcc aaa caa cga agc ata ata ttc cga cca ctc	960
301	L A L I P L L H T S K Q R S M M F R P L	320
961	agc caa tgc cta ttc tga gcc cta gta gca gac cta ctg aca ctc aca tga att gga gga	1020
321	S Q C L F W A L V A D L L T L T W I G G	340
1021	caa cca gtc gaa cac cca tat atc acc atc gga caa cta gca tct gtc cta tac ttt ctc	1080
341	Q P V E H P Y I T I G Q L A S V L Y F L	360
1081	ctc atc cta gtg cta ata cca acg gcc ggc aca atc gaa aac aaa tta cta aaa tga aga	1140
361	L I L V L M P T A G T I E N K L L K W *	380

Fig. 5. Secuencia de ADN y la proteína correspondiente del gen *cyt b* de res (*Bos taurus*). La proteína consta de 379 aminoácidos con un peso molecular de 42.590 Da y una mayoría de aminoácidos insolubles (27% solubilidad) típicos de proteínas intramembranales⁵.

⁴ <http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/handouts/etccomplexes.jpg>

⁵ Fuente: Genbank, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

La proteína citocromo *b* tiene regiones altamente conservadas que contrastan con otras que en el transcurso de la evolución han divergido significativamente (Irwin et al., 1991). Algunas regiones están bien conservadas no solamente a nivel de la secuencia de aminoácidos, sino de nucleótidos. Esto ha permitido diseñar oligonucleótidos universales que amplifican genes de citocromo *b* a pesar de los cambios evolutivos (Kocher et al., 1989) (Fig. 6).

El éxito del diseño de un método confiable de identificación de especies es la selección correcta de los genes que van a servir de punto de comparación.

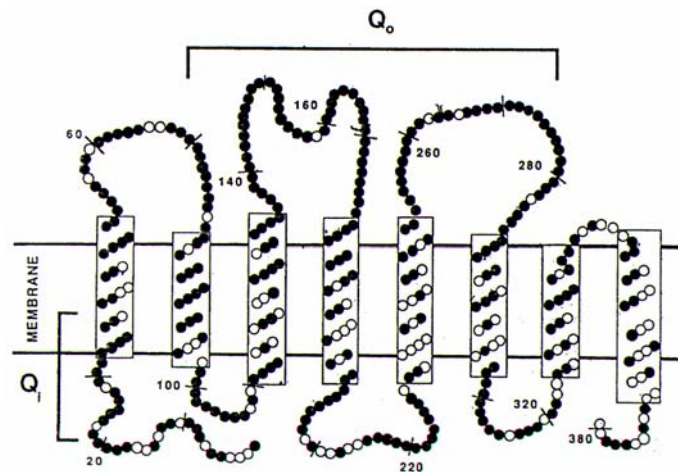


Fig. 6. Variabilidad de los aminoácidos en el citocromo *b* de mamíferos. Los círculos negros representan los residuos conservados mientras que los círculos blancos corresponden a residuos hipervariables. Q_1 y Q_0 son los centros redox (sitio activo). La superficie externa e interna de la membrana corresponden respectivamente, a las secciones superior e inferior⁶.

El gen del citocromo *b* (así como otros genes mitocondriales) presenta varias ventajas:

- Es uno de los genes mitocondriales más conocidos y mejor entendidos a nivel estructural y funcional.

⁶ Tomado de Irwin et al. (1991)

- Dentro de él se han encontrado características intrínsecas que lo convierten en una excelente herramienta en trabajos de biología molecular. El gen posee zonas muy conservadas relacionadas directamente con porciones de la proteína citocromo *b* localizadas en las partes interna y externa de la membrana interna (Irwin et al., 1991) (Fig. 6). Estas partes de la proteína corresponden a centros *redox* indispensables para su función. Por esto, cualquier alteración de su estructura por mutaciones en el gen, puede tener efectos letales.
- El gen citocromo *b* posee regiones muy variables que codifican para la porción transmembranal de la proteína. El hecho de poseer zonas dentro del mismo gen que evolucionan rápida y lentamente ha facilitado el manejo metodológico. Se pueden flanquear las regiones variables con un determinado *primer* dirigido a las secuencias conservadas para luego amplificar la secuencia adyacente (Kocher et al., 1989). De esta forma, es posible analizar las diferencias entre regiones de diferentes muestras e inferir una posible filiación con un taxón determinado.
- La presencia de múltiples copias por célula del genoma mitocondrial facilita su recuperación, amplificación y secuenciación a partir de pequeñas cantidades de muestras, en contraste con genes nucleares que poseen una única copia.
- Dada la circularidad del ADN mitocondrial, lo hace más resistente a condiciones extremas, en comparación con el ADN nuclear (Bartlett & Davidson, 1992). Por consiguiente, se tiene mayor probabilidad de éxito con muestras antiguas o extensamente procesadas.

- Finalmente, se han publicado secuencias de *primers* dirigidos a regiones conservadas del gen *cyt b* con las cuales se han obtenido excelentes amplificadas de una gran variedad de vertebrados (Kocher et al., 1989).

2. METODOLOGÍA

2.1 ESTABLECIMIENTO DE LA BASE DE DATOS DEL GEN *cyt b*

Las bases de datos EMBL, Genbank y DNA Data Bank of Japan fueron interrogadas mediante las siguientes estrategias:

- Búsqueda mediante el uso de palabras clave: Cytochrome *b*, *cyt b*, mitochondrial DNA, mtDNA y nombres específicos.
- Búsqueda de homologías con secuencias de *cyt b* de especies previamente encontradas con programas como Blast y FASTA.
- Búsqueda mediante números de acceso obtenidos en referencias bibliográficas.

2.2 SELECCIÓN DE LA REGIÓN DENTRO DEL GEN *cyt b* Y OLIGONUCLEÓTIDOS CONSERVADOS PARA AMPLIFICACIÓN

Se seleccionó la región dentro del gen a amplificar por PCR mediante alineamientos de secuencias del gen *cyt b*, asistidos por el programa ClustalW V 1.82 (Thompson et al., 1994, Higgins et al., 1996) y utilizando los análisis de variabilidad a lo largo del gen citocromo *b* en mamíferos, hechos por Irwin et al., (1991).

Con base en los alineamientos del gen *cyt b* y en diseños previos de oligonucleótidos conservados para amplificación y secuenciación del mismo (Kocher et al., 1989), se seleccionaron los oligonucleótidos para la amplificación de la región interna. A estos oligonucleótidos se agregaron sitios de restricción *Hind* III y *Pst* I para posterior clonación. Los oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente por Invitrogen™.

2.3 TOMA Y PRESERVACIÓN DE TEJIDOS ANIMALES FUERA DEL LABORATORIO

2.3.1 Toma de tejido para identificación de especies. Utilizando un bisturí estéril se cortaron aproximadamente 10 g de tejido fresco o procesado; la muestra se lavó con suero fisiológico o solución salina y se introdujo en una bolsa plástica estéril y hermética. Las muestras se etiquetaron y fueron conservadas en recipientes de poliestireno con hielo seco hasta llegar al laboratorio.

Para la toma de muestras de sangre se utilizaron *vacutiners* de 5 ml impregnados con EDTA; de igual manera se etiquetaron y se depositaron en hielo seco.

2.3.2 Manejo de las muestras en el laboratorio. Las muestras fueron almacenadas en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; en estas condiciones se pueden conservar por largos periodos de tiempo (seis meses). Se evitó la descongelación del material.

Se fijó un mapa en la puerta del congelador con la disposición de las muestras para facilitar su localización. Las muestras se clasificaron por taxones en cajas de poliestireno (icopor), para un fácil manejo de los especímenes. Además, el recipiente se identificó con el tipo de material biológico que contenía a través de un código de colores (véase el numeral 2.3.3).

2.3.3 Etiquetado del material. Se etiquetó todo el material para evitar cruce de referencias. Las bolsas se rotularon con marcadores indelebles que soportan la manipulación y proceso de preservación. Para evitar confusiones por pérdida de datos, dentro de la bolsa se introdujo una copia de la etiqueta hecha en papel pergamino.

Modelo de Etiqueta:

1		
Colector	Fecha	Categoría Taxonómica

Descripción:

Número de Colecta: Este debe coincidir con el de un catálogo permanente que incluye los datos relevantes a la toma de la muestra: sitio de colecta, fecha, colector, réplicas tomadas, estado de la muestra (fresca o procesada); si es fresca, cuánto tiempo ha transcurrido desde el sacrificio y un espacio para observaciones hechas por el colector.

Colector: Se escriben las iniciales de quien muestrea, las cuales debe coincidir con las registradas en el catálogo permanente (las iniciales deben estar acompañadas de la firma del colector).

Fecha: Se escribe con iniciales, e.g., 09-18-04.

Categoría Taxonómica: Corresponde a la procedencia animal del tejido. Debe incluir:

- Clase taxonómica: ave, reptil, anfibio, mamífero.
- Nombre científico: género y especie
- Nombre común o vulgar.

Los diferentes *taxa* se mantuvieron a -20 °C dentro de un mismo recipiente de poliestireno. Cada recipiente se marcó con un código de color que indicara la categoría taxonómica.

Rojo:	Mamíferos
Azul:	Aves
Amarillo:	Reptiles
Violeta:	Anfibios

También se etiquetaron los recipientes con un código de color:

Negro:	Procesado
Blanco:	Fresco.

2.4 METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DEL ADN TOTAL

2.4.1 Aislamiento de ADN.

2.4.1.1 Método PCI, fenol-cloroformo-álcool isoamílico (Hillis et al., 1996). Aproximadamente 100 mg del tejido congelado se cortaron en pequeñas porciones y se depositaron en un mortero estéril (autoclave) previamente enfriado con hielo seco. La muestra fue triturada, teniendo cuidado de no dejar descongelar, hasta cuando adquirió la textura de un polvo. Se permitió la evaporación de un poco de dióxido de carbono.

El triturado fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con buffer de lisis: 500 µl de buffer STE (*Sodium Tris-EDTA*); 25 µl de 10 mg/ml proteinasa K; 75 µl de 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Se mezcló e incubó por 2 h a 55 °C en baño con agitación. Fue necesario mezclar ocasionalmente para mantener el tejido en suspensión. Algunos tejidos necesitaron más tiempo para una digestión total sin que esto afectara la estabilidad del ADN.

Se agregó un volumen igual de una mezcla 25:24:1 de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, mezclando e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Si las fases se separaban, se mezclaba nuevamente. A continuación, se centrifugó por 10 min a 17300 g y se transfirió la fase superior acuosa a un tubo limpio, cuidadosamente para no arrastrar la interfase de desechos celulares.

Nuevamente se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico; mezclando e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó por 10 min a 17300 g y se transfirió la fase superior acuosa a un tubo limpio.

Se adicionó un volumen igual de una mezcla 24:1 de cloroformo-alcohol isoamílico y se incubó a temperatura ambiente por 2 min, mezclando cada min para prevenir la separación de las fases. Después de centrifugar por 3 min a 10000 g se transfirió la capa acuosa superior a un tubo limpio. La extracción con cloroformo-alcohol isoamílico fue repetida una vez más y se centrifugó por 3 min a 10000 g.

El ADN fue precipitado con 1/10 de volumen de 3 M NaAc (acetato de sodio) y 2.5 volúmenes de 100% etanol frío y enfriado a -20 °C durante 8-10 h. Se centrifugó por 10 min a 10000 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 70% etanol y al final se dejó evaporar las últimas trazas de etanol.

El *pellet* fue resuspendido en 250 µl de 1X TE (Tris-EDTA) con incubación a 55 °C durante 2-5 h para facilitar la resuspensión del ADN. Finalmente, se etiquetó el tubo (fecha, código y tipo de tejido) y se almacenó a -20 °C.

2.4.1.2 Protocolo de extracción de sangre del FBI (*Federal Bureau of Investigation*) (FBI, USA, 1993). 1 ml de sangre con anticoagulante fue mezclado con 0.8 ml de buffer 1X SSC y

centrifugado por 1 min a 11000 g. Se descartó 1 ml del sobrenadante y 1 ml de buffer 1X SSC (*Standard Saline-Citrate*) fue agregado. La mezcla se agito con *vortex* y se centrifugó por 1 min para remover todo el sobrenadante.

Se agregaron 375 µl de NaOAc, aplicando *vortex* brevemente para luego añadir 25 µl de 10% SDS y 5 µl de (20 µg/ml) proteinasa K. Se aplicó *vortex* brevemente e incubó por 1 h a 55 °C.

120 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico fueron agregados y luego se aplicó *vortex* por 30 s. Esta mezcla se centrifugó por 2 min a 11000 g.

Cuidadosamente, la fase acuosa fue removida a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se agregó 1 ml de 100% etanol frío y se incubó por 15 min a -20 °C. Se centrifugó por 2 min a 11000 g, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet*.

Se agregaron 180 µl de buffer TE, se aplicó *vortex* e incubó a 55 °C por 10 min. Posteriormente, el ADN se precipitó con 20 µl de 2 M acetato de sodio y 500 µl de 100% etanol frío, centrifugando por 1 min a 11000 g. El *pellet* fue lavado con 1 ml de 70% etanol y centrifugado por 1 min a 11000g. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 200 µl de buffer TE, incubando toda la noche a 55 °C.

2.4.1.3 Método de extracción alcalina (Rudbeck & Dissing, 1998). Se mezclaron 5 µl de sangre con 20 µl de 0.2 M NaOH y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se detuvo agregando 180 µl de 0.04 M Tris-HCL, pH 7.5.

Los métodos citados en los numerales 2.4.1.2 y 2.4.1.3 se aplicaron cuando se hicieron extracciones de ADN de sangre.

2.4.2 Extracción de ADN con el Kit DNeasy[®] Tissue (Qiagen, Maryland)

Muestras de carnes procesadas (salchicha, chorizo, atún enlatado, salchichón, carne cocida y mortadela) adquiridas en el mercado local, fueron empleadas en las extracciones de ADN total, utilizando el kit de extracción DNeasy[®] Tissue (Qiagen, Maryland), siguiendo el protocolo descrito en el manual del usuario. El método aprovecha las propiedades de unión del ADN a una membrana de sílica-gel para una purificación rápida y eficiente de ADN celular total, sin extracción orgánica o precipitación con etanol.

Las extracciones de ADN tanto en productos frescos como procesados se repitieron varias veces para asegurar su reproducibilidad.

2.4.3 Visualización de los aislamientos de ADN

Los resultados de las extracciones de ADN total fueron visualizados por electroforesis, depositando 8 µl de ADN sobre geles de 0.4% agarosa a 100 V. Finalmente, los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta con el sistema de fotodocumentación DigiDoc-It System (UVP[®]). Adicionalmente, diluciones 1/100 (v/v) de los extractos puros de ADN total fueron preparados para cuantificación por espectrofotometría. Para cada muestra fue medida su absorbancia a 260 nm empleando un equipo Spectronic Genesis 2 (Milton Roy[®]). Una solución que contiene 50 µg/ml de ADN de doble cadena tiene una absorbancia de 1 a 260 nm.

2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación del fragmento interno del gen citocromo *b*, las condiciones fueron las siguientes: aproximadamente 100 ng de ADN total (4 – 8 µl de extracto), 2.5 U de Taq DNA

polimerasa (Promega, Madison), 200 μ M de cada dNTP (Sigma), 0.5 μ M de cada uno de los primers L14841 y H15149, 1X buffer PCR (Promega), 1.8 mM $MgCl_2$ (Promega), en un volumen final de 100 μ l de reacción.

La desnaturalización completa se llevó a cabo a 94 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. El último ciclo fue seguido por un paso de extensión extra a 72 °C por 5 min. Las rutinas de amplificación fueron realizadas en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.). Las reacciones de PCR se repitieron varias veces para cada muestra con el fin de asegurar de su reproducibilidad.

La confiabilidad y eficiencia de las reacciones PCR fueron monitoreadas por un control negativo sin ADN molde. Con el fin de verificar el tamaño y la calidad del amplificado, 8 μ l del producto PCR fueron corridos sobre geles de 1.5% agarosa a 100 V y fotografiados bajo luz ultravioleta con un equipo DigiDoc-It System (UVP®).

2.5.1 Digestión enzimática del amplificado. Se tomaron, aproximadamente 340 ng de ADN amplificado procedentes de *Homo sapiens* se cortaron con la enzima *Ban* I, mientras que cerca de 200 ng de ADN amplificado de salchichón (elaborado con carne de res, cerdo y pollo, según la etiqueta) fueron digeridos con las enzimas *Ban* I, *Xba* I y *Bam*H I, en reacciones por separado.

Las condiciones para las digestiones enzimáticas fueron las siguientes: 5 U de la enzima, 0.1 μ g/ μ l de suero albúmina de bovino, 1X buffer de digestión para cada enzima, para un volumen final de 10 μ l por reacción. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C por 2 h.

Los productos de las digestiones fueron corridos en geles de 2% agarosa y las imágenes se documentaron en el sistema DigiDoc-It System (UVP).

3. RESULTADOS

3.1 ESTABLECIMIENTO DE LA BASE DE DATOS DEL GEN *cyt b*

Se obtuvieron secuencias de *cyt b* de 76 especies, habiéndose seleccionado aquellas que son comunes en Colombia y que son susceptibles de comercialización como carne cruda o procesada. También se tuvieron en cuenta especies exóticas que no se encuentran en el medio natural colombiano como camellos, llamas, búfalos, leones, tigres, elefantes, etc.

En la Tabla 1 se relacionan las 76 secuencias escogidas por su compatibilidad con los objetivos del presente proyecto y que constituyen nuestra base de datos de referencia para la identificación posterior de especies.

Tabla I. Especies con secuencia del gen *cyt b* conocida (no exhaustiva)

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR	Nº ACCESION*	ESTADO	Pb
<i>Aburria aburri</i>	Pava negra	AF165466	Parcial	1002
<i>Aix sponsa</i>	Pato carolino	AF059053	Parcial	1074
<i>Alligator mississippiensis</i>	Cocodrilo americano	Y13113	Completo	1159
<i>Alouatta palliata</i>	Mono aullador negro	AY065880	Parcial	800
<i>Alouatta seniculus</i>	Mono aullador colorado	AF289982	Parcial	1016
<i>Boa constrictor</i>	Boa	AF471036	Completo	1117
<i>Bos taurus</i>	Vaca	NC_001567	Completo	1140
<i>Bradypus variegatus</i>	Oso perezoso	AF232013	Parcial	648
<i>Bubulcus ibis</i>	Garcita del ganado	AF193823	Parcial	1041
<i>Caiman crocodilus</i>	Babilla	NC_002744	Completo	1150
<i>Cairina moschata</i>	Pato criollo	L08385	Completo	1143
<i>Cairina sp</i>	Pato	L07521	Parcial	281
<i>Canis familiaris</i>	Perro	X94920	Completo	1140
<i>Canis lupus</i>	Lobo	AY170103	Completo	1140
<i>Capra hircus</i>	Cabro, Chivo	AB004074	Completo	1140
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Tiburón pardo	L08032	Completo	1146
<i>Cathartes aura</i>	Gallinazo rey	AF082059	Parcial	512

<i>Cavia tschudii</i>	Cobayo	AF491747	Parcial	642
<i>Cebus albifrons</i>	Mono capuchino	NC_002763	Completo	1137
<i>Cebus capucinus</i>	Mono cara blanca	AY065907	Parcial	800
<i>Choloepus didactylus</i>	Perezoso de dos dedos	AF232012	Parcial	648
<i>Coendou prehensilis</i>	Puercoespín	AF411584	Parcial	1123
<i>Columba leucocephala</i>	Paloma cabeci-blanca	AF182689	Parcial	1045
<i>Coragyps atratus</i>	Chulo	U08946	Parcial	1009
<i>Coregonus lavaretus</i>	Salmón	AB034824	Desconocido	1141
<i>Crotalus durissus ruruima</i>	Cascabel	AY196656	Parcial	729
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	NC_001606	Completo	1141
<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo	NC_001821	Completo	1140
<i>Elephas maximus</i>	Elefante asiático	D50846	Completo	1137
<i>Equus asinus</i>	Burro, Asno	NC_001788	Completo	1140
<i>Equus caballus</i>	Caballo	D82932	Completo	1140
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Tortuga carey	AF385673	Parcial	875
<i>Eunectes murinus</i>	Anaconda	U69808	Completo	113
<i>Felis catus</i>	Gato	X82296	Completo	1140
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	AY235570	Completo	1143
<i>Geochelone denticulada</i>	Morrocoy	AF192941	Parcial	405
<i>Giraffa camelopardalis</i>	Jirafa	X56287	Completo	1140
<i>Gorilla gorilla</i>	Gorila	NC_001645	Completo	1141
<i>Homo sapiens</i>	Humano	AY195791	Completo	1135
<i>Icterus mesomelas</i>	Toche	AF089033	Parcial	890
<i>Icterus spurius</i>	Desconocido	AY212245	Parcial	925
<i>Iguana iguana</i>	Iguana común	NC_002793	Completo	1140
<i>Inia geoffrensis</i>	Delfín rosado	X92534	Completo	1140
<i>Jabiru mycteria</i>	Garzón soldado	U72770	Parcial	1057
<i>Loxodonta africana</i>	Elefante africano	AJ224821	Completo	1137
<i>Macropus giganteus</i>	Canguro gris	U87137	Completo	1146
<i>Meleagris gallopavo</i>	Pavo doméstico	L08381	Completo	1143
<i>Micropterus salmoides</i>	Trucha	AF479273	Completo	1245
<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado cola blanca	L48406	Parcial	401
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia Mozambique	X81565	Desconocido	1140
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	NC_001913	Completo	1139
<i>Pagrus pagrus</i>	Pargo piedra	AF240729	Parcial	1140
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpancé	NC_001643	Completo	1141
<i>Panthera leo</i>	León	AF384818	Completo	1140
<i>Panthera tigris</i>	Tigre	AF053051	Completo	1140
<i>Pecari tajacu</i>	Chanco de monte, Pecari	X56296	Completo	1140
<i>Phoenicopterus ruber</i>	Flamenco	U08940	Parcial	1009
<i>Procyon lotor</i>	Mapache (Colombiano)	X94930	Completo	1140
<i>Pteronura brasiliensis</i>	Perro de agua	AF057126	Completo	1140

<i>Puma concolor</i>	Puma de montaña	AF499775	Parcial	307
<i>Rana catesbeiana</i>	Rana toro, Rana coreana	AF205089	Completo	1143
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	NC_001665	Completo	1143
<i>Saguinus oedipus</i>	Mico tití	AF245086	Parcial	356
<i>Salvelinus alpinus</i>	Salmón	NC_000861	Completo	1141
<i>Sardinops melanostictus</i>	Sardina	AB032554	Desconocido	1141
<i>Stenella attenuata</i>	Delfín rosado	X92525	Completo	1140
<i>Struthio camelus</i>	Avestruz	NC_002785	Completo	1140
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo, Puerco	AY237534	Completo	1140
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Oso hormiguero	NC_004032	Completo	1140
<i>Tapirus terrestris</i>	Tapir, Danta de la costa	AF056030	Completo	1140
<i>Tayassu pecari</i>	Manao o pecarí	U66290	Parcial	1047
<i>Tremarctos ornatus</i>	Oso de anteojos	U23554	Completo	1140
<i>Trichechus manatus</i>	Manatí	D83050	Parcial	1005
<i>Ursus arctos</i>	Oso pardo norteamericano	NC_003427	Completo	1140
<i>Vultur gryphus</i>	Cóndor de los Andes	X86763	Desconocido	1026

* Genbank, EMBL Nucleotide Data Base, DNA Data Bank of Japan.

Adjunto al presente informe, se hallan grabadas en medio magnético las secuencias completas de todas las especies seleccionadas.

Las secuencias completas del gen *cyt b* de las siguientes especies comunes de Colombia y susceptibles de explotación como carne de consumo humano, no se encontraron en ninguna base de datos utilizando los criterios antes mencionados: *Agouti paca* (paca), *Agouti taczanowskii* (guagua), *Dasyprocta punctata* (ñequé) y *Tapirus bairdii* (danta del Chocó).

3.2 SELECCIÓN DE LA REGIÓN EN EL GEN *cyt b* A AMPLIFICAR Y OLIGONUCLEÓTIDOS COMUNES PARA PCR

Con el fin de cumplir con el objetivo principal, se debió seleccionar una región con suficientes posiciones nucleotídicas variables que pudieran proporcionar información para la identificación animal especie-específica. La mayoría de las posiciones variables a nivel aminoacídico en la

proteína citocromo *b* se hallan dentro de los segmentos transmembranales y los que se ubican hacia la cara interna de la membrana (Fig. 7). Varios autores han diseñado oligonucleótidos (*primers*) en estas regiones del gen; al igual que ellos, se encontró conveniente seleccionar este segmento para amplificación por PCR.

Se trata de un fragmento de 307 pb que codifica para una porción de 80 aminoácidos (Fig. 8) y que se amplifica con los *primers* L14841 y H15149, como lo sugieren Kocher et al., (1989), quienes los diseñaron y emplearon en un análisis de la dinámica evolutiva del ADN mitocondrial en animales.

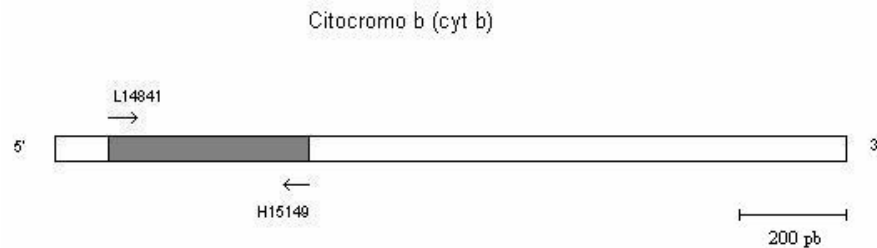


Fig. 7. Fragmento del gen *cyt b* amplificado por los primers L14841 y H15149 (en gris). El amplificado, incluyendo los oligonucleótidos, posee una longitud de 379 pb.

En nuestro caso, estos *primers* cumplieron con los criterios de selección determinados para el proyecto, después de realizar numerosos alineamientos del gen *cyt b* de diferentes especies animales (Fig. 8).

Bostaurus	GACCTCCAGCC	CCATCAAACATTT	CATCATGATGAAA	TTTCGGTTC	CCCTCCTGGGAATC	117
Caprahircus	GACCTCCAACCC	CATCAAACATCT	CATCATGATGAAA	CTTTGGATC	CCCTCCTAGGAATT	117
Susscrofa	GACCTCCCAGCC	CCCTCAAACATCT	CATCATGATGAAA	CTTCGGTTC	CCCTCTTAGGCATC	117
Equsasinus	GACCTGCCAACCC	CTCAAACATTT	CATCATGATGAAA	CTTTGGCTC	CCCTCCTAGGAATC	117
Equscaballus	GACCTACCAGCC	CCCTCAAACATTT	CATCATGATGAAA	CTTCGGCTC	CCCTCCTAGGAATC	117
Feliscatus	GATCTACCCACCC	ATCTAACATCT	CAGCATGATGAAA	CTTCGGCTC	CCCTCTTAGGAGTC	117
Canisfamiliaris	GACCTCCCAGCG	CGTCTAACATCT	CTGCTTGATGGAA	CTTCGGATC	CCTTACTAGGAGTA	117
Oryctolaguscuniculus	GACCTTCCTGCT	CCATCAAACATCT	CTGCTGATGAAA	CTTTGGCTC	TCTACTAGGCCTG	117
Rattusnorvegicus	GACCTACCGGCC	ATCTAACATCT	CATCATGATGAAA	CTTCGGTTC	TCTACTAGGAGTA	117
Homosapiens	GACCTCCCCACCC	ATCTCAAACATCT	CCGATGATGAAA	CTTCGGCTC	ACTCCTTGGCGCC	117
Gallusgallus	GACCTCCCAGCC	CCATCAAACATCT	CTGCTTGATGAAA	TTTCGGCTC	CCCTATTAGCAGTC	120
	**	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	**	**	**	**
		L14841				
Bostaurus	TGCCTAATCCT	TACAAATCCTCACAGGCCT	TATTCCTAGCAATACACTACACATCCGACACA			177
Caprahircus	TGCCTAATCCT	TACAAATCCTGACAGGCCT	TATTCCTAGCAATACACTATACATCCGACACA			177
Susscrofa	TGCCTAATCCT	TGCAAATCCTAACAGGCCT	GTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA			177
Equsasinus	TGCCTAATCCT	TCAAATCCTAACAGGCCT	TATTCCTAGCCATACACTACACATCAGACACT			177

Equscaballus TGCCTAATCCTCAAATCTTAACAGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGACACG 177
 Feliscatus TGCCTAATCCTCAAATCCTCACCAGGCCTCTTTTGGCCATACACTACACATCAGACACA 177
 Canisfamiliaris TGCTTGATTCTACAGATTCTAACAGGTTTATTCTTAGCTATGCACTATAACATCGGACACA 177
 Oryctolagusuniculus TGCTTATAATTCAAATTTTACTGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACCTCTGACACA 177
 Rattusnorvegicus TGCTCATAGTACAAATCCTCACAGGCTTATTCTTAGCAATACACTACAGCTGATAACC 177
 Homosapiens TGCTTGATCCTCAAATCACCACAGGACTATTCTTAGCCATACACTACTCACCAGACGCC 177
 Gallusgallus TGCTCATGACCAATCCTCACCAGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACA 180
 *** **

Bostaurus ACAACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACACGGCTGAATCATC 237
 Caprahircus ATAAACAGCATTCCCTCTGTAACCTCACATTTGTCGAGATGTAATATGGCTGAATCATC 237
 Susscrofa ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATTTGTCGAGACGTAATACGGATGAGTTATT 237
 Equasinus ACAACTGCCTTCTCATCCGTACCCATATCTGCCGAGACGTAACTACGGATGAATCATT 237
 Equscaballus ACAACTGCCTTCTCATCCGTACCTCACATCTGCCGAGACGTAACTACGGATGAATATC 237
 Feliscatus ATAAACGCCTTTTCTCATCAGTTACCCACATCTGTCCGACGTAAATATGGCTGAATCATC 237
 Canisfamiliaris GCCACAGCTTTTCTCATCAGTACCCACATCTGCCGAGACGTAACTACGGCTGAATATC 237
 Oryctolagusuniculus ACAACAGCATTCTCATCAGTAAACCCATATTTGCCGAGATGTTAACTATGGCTGACTTATC 237
 Rattusnorvegicus ATAAACAGCATTCTCATCAGTACCCACATCTGCCGAGACGTAATACGGCTGACTAATC 237
 Homosapiens TCAAACGCCTTTTCTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAATATGGCTGAATCATC 237
 Gallusgallus TCCCTAGCCTTCTCCTCCTAGCCGACACTTGCCTGAGACGTAATACGGCTGACTTATC 240
 ** * * * * *

Bostaurus CGATACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCCTATATATGCACGTAGGA 297
 Caprahircus CGATACATACACGCAAACGGAGCATCAATATTCTTTATCTGCCTATTACATACATACCGGA 297
 Susscrofa CGCTATCTACATGCAAACGGAGCATCCATATTCTTTATTTGCCTATTACATCCACGTAGGC 297
 Equasinus CGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCCATATTTTCTATCTGCCTCTTTATCCACGTAGGG 297
 Equscaballus CGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCAATATTTTATCTGCCTCTTCATTACGTAGGA 297
 Feliscatus CGATATTTACACGCAAACGGAGCTTCTATATTCTTTATCTGCCTGTACATACATGTAGGA 297
 Canisfamiliaris CGCTATATGCACGCAAATGGCGCTTCCATATTCTTTATCTGCCTATTCTACATGTAGGA 297
 Oryctolagusuniculus CGATACCTCCACGCTAACGGAGCATCTATATTCTTTATTTGCCTCTACATACAGTAGGC 297
 Rattusnorvegicus CGATACCTACAAGCAAACGGCGCCTCAATATTTTCTATCTGCCTATTCTCCATGTGGGA 297
 Homosapiens CGCTACCTTACAGCAAACGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTATTCTCCATACATCGGG 297
 Gallusgallus CGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCTATCTGTATCTTCTTCCATACCGGA 300
 ** * * * * *

Bostaurus CGAGGCTTATATTACGGGCTTACACTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTT 357
 Caprahircus CGAGGCTTATATTATGGATCATATACCTTTCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAATCCTC 357
 Susscrofa CGAGGCTTATACTACGGATCCTATATATCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGCCTA 357
 Equasinus CGCGGCCCTACTATGGCTCCTACACATTTCTAGAAACATGAAACATTGGAAATATCCTA 357
 Equscaballus CGCGGCCCTACTACGGCTTCTACCAATTTCTAGAGACATGAAACATTGGAAATATCCTA 357
 Feliscatus CGGGGAATGTACTACGGCTCCTACACTTCTCAGAGACATGAAACATTGGAAATACATACTA 357
 Canisfamiliaris CGAGGCCATATATTACGGATCCTATGTATTACATAGAAACATGAAACATTGGAAATGTACTA 357
 Oryctolagusuniculus CGCGGAATCTACTATGGATCATAACACTTCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTC 357
 Rattusnorvegicus CGAGGACTATACTATGGATCCTACACTTTCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTC 357
 Homosapiens CGAGGCCATATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATTGGGATATCTCCTC 357
 Gallusgallus CGAGGCCATACTACGGCTCCTACTCTACAAGGAAACCTGAAACACAGGAGTAATCCTC 360
 ** * * * * *

Bostaurus CTGCTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGTCCTACCATGAGGACAAATATCA 417
 Caprahircus CTGCTCGGCAATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTTTACCATGAGGACAAATATCA 417
 Susscrofa CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCTATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 417
 Equasinus CTTTTACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCC 417
 Equscaballus CTTTTACAGTTATAGGCTATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCC 417
 Feliscatus TTATTTACAGTACATAGCCACAGCCTTTTATGGGATACGTCCTACCATGAGGACAAATATCC 417
 Canisfamiliaris TTATTTGCAACCATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCA 417
 Oryctolagusuniculus CTATTTGCAAGTATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCA 417
 Rattusnorvegicus CTATTTGCAAGTATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCA 417
 Homosapiens CTGCTTGCACACTATAGCAACAGCCTTCTATAGGCTATGTCCTCCCGTGGGACAAATATCA 417
 Gallusgallus CTCTTCACTCATAGCCACCGCCTTTGTCGGGCTATGTTCTCCCATGAGGACAAATATCA 420
 * * * * *

H15149∞

Bostaurus TTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTTATCAGCAATCCATACATCGGCACAAAT 477
 Caprahircus TTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTTATCAGCAATCCATACATCGGCACAAAC 477
 Susscrofa TTCTGAGGAGCTACGGTACCAAACTCTACTATCAGCAATCCCTATATCGGAACAGAC 477
 Equasinus TTCTGAGGAGCAACGGTCATTACAAACCTCCTATCAGCAATCCCTACATCGGTACTACG 477
 Equscaballus TTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCCTATCAGCAATCCCTACATCGGTACTACC 477
 Feliscatus TTCTGAGGAGCAACGGTAACTACCAACCTCCTGTCAGCAATCCATACATCGGACTGAA 477

```

Canisfamiliaris      TTTTGAGGAGCAACTGTAATCACTAATCTTCTCTCTGCCATCCCTTATATCGGAACTGAC 477
Oryctolaguscuniculus TTTTGGGGAGCAACCGTAATCACTAACCTCCTATCAGCAATCCCATATATCGGAACAACC 477
Rattusnorvegicus    TTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACC 477
Homo sapiens        TTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTACTATCCGCCATCCCATACATTGGGACAGAC 477
Gallusgallus        TTCTGAGGGGCCACCGTTATCACAAACCTATTCTCAGCAGTTCCTACATTGGACACACC 480
TTCTGAGGAGCTGCAGTTT* ** * * * * * * * * * *

```

Fig. 8. Alineamiento asistido por el programa ClustalW de un segmento del gen *cyt b*. Se destaca la región de 307 pb (en negrilla) amplificada por L14841 y H15149 y las regiones (en gris) donde hibridizan estos últimos. Las especies incluidas son: *Bos taurus* (vaca), *Capra hircus* (cabro o chivo), *Sus scrofa* (cerdo), *Equus asinus* (asno), *Equus caballus* (caballo), *Felis catus* (gato), *Canis familiaris* (perro), *Oryctolagus cuniculus* (conejo), *Rattus norvegicus* (rata), *Homo sapiens* (hombre), y *Gallus gallus* (pollo). *El primer H15149 corresponde en realidad a la secuencia complementaria del gen original

Para facilitar la futura clonación de los amplificados, se añadieron sitios de restricción en el extremo 5' de los oligonucleótidos que no estuvieran dentro de la secuencia a amplificar. L14841 incluye en su región 5' un sitio de restricción para la enzima *Hind* III correspondiente al palíndromo AAGCTT. H15149 posee un sitio de restricción para la enzima *Pst* I en CTGCAG. Detalles de las secuencias de los *primers* L14841 y H15149 se hallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificación del fragmento interno del gen *cyt b*. Los nucleótidos enmarcados en gris representan las secuencias reconocidas por *Hind* III y *Pst* I en L14841 y H15149, respectivamente.

Primer*	Secuencia	Long. (pb)	Contenido GC	T _m **
L14841	5' -AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	35	37 %	75
H15149	5' -AAACTGCAGCTCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	34	41 %	72

*Las letras L y H corresponden a las cadenas liviana (Light) y pesada (Heavy) en el ADN mitocondrial respectivamente. Los números indican la posición de la base 3' del primer sobre la secuencia completa del ADN mitocondrial humano (Anderson et al., 1981). ** Temperatura media de desnaturalización.

3.3 EXTRACCIÓN DE ADN

ADN total (genómico y mitocondrial) fue aislado a partir de tejido muscular crudo de varias especies animales (Fig. 9, A), así como de material cárnico procesado (Fig. 9, B), empleando los

métodos de extracción PCI (Hillis et al., 1996) y el kit DNeasy® Tissue (Quiagen, Maryland). Los métodos de extracción en sangre del FBI (FBI, USA, 1993) (Fig. 9 A, Hs) y lisis alcalina, fueron empleados sólo en sangre de *Homo sapiens*.

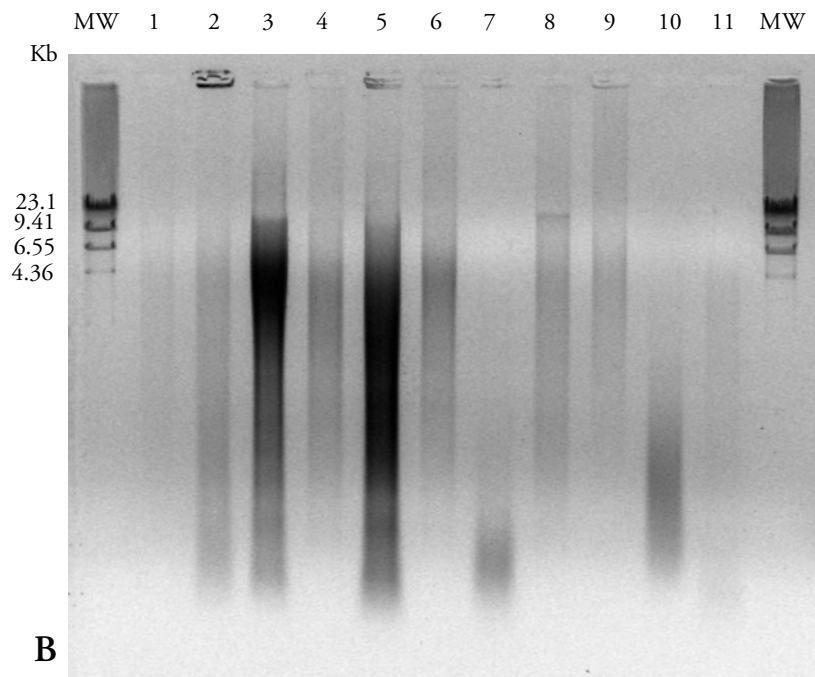
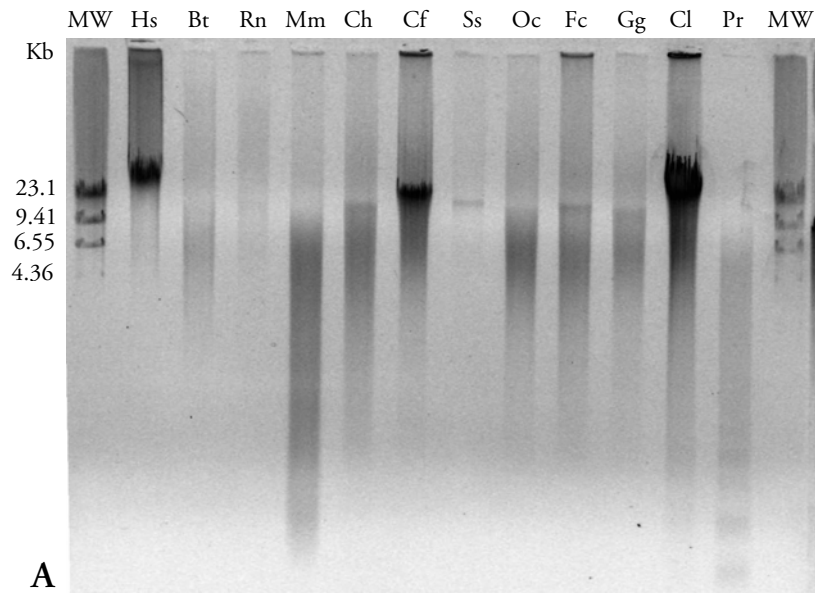


Fig. 9. A. Resultados del aislamiento de ADN total en tejido muscular crudo por el método de extracción básica de fenol-cloroformo, excepto para *Homo sapiens* (método de extracción de FBI). Gel de 0.4% agarosa. Kb, kilobases; MW, marcador de peso molecular (ADN de virus lambda + *Hind* III); Hs, *Homo sapiens* (hombre); Bt, *Bos taurus* (vaca); Rn, *Rattus norvegicus* (rata); Mm, *Mus musculus* (ratón); Ch, *Capra hircus* (cabra); Cf, *Canis familiaris* (perro); Ss, *Sus scrofa* (cerdo); Oc, *Oryctolagus cuniculus* (conejo); Fc, *Felis catus* (gato doméstico); Gg, *Gallus gallus* (gallina); Cl, *Columba livia* (paloma), Pr, *Prochylodus reticulatus* (bocachico). B. Resultados del aislamiento de ADN total de productos cárnicos procesados a través de dos métodos de extracción: fenol-cloroformo-álcool isoamílico (PCI) y DNeasy[®] Tissue Kit (kit). 1, mortadela (kit); 2, mortadela (PCI); 3, salchichón1 (PCI); 4, salchichón2 (kit); 5, salchichón2 (PCI); 6, salchichón3 (kit); 7, salchicha (kit); 8, salchicha (PCI); 9, chorizo (kit); 10, carne cocida; 11, atún enlatado (PCI).

Previamente se probaron algunas modificaciones al protocolo de extracción PCI con el objetivo de evaluar sus efectos sobre la cantidad y calidad de los extractos de ADN. En una de las modificaciones se omitieron los pasos de precipitación con fenol-cloroformo-álcool isoamílico y se conservó la precipitación con cloroformo-álcool isoamílico, mientras que en otras se siguió el método de extracción alternativo para PCI citado por Hillis et al., (1996), en el cual, después de la lisis del tejido se realiza precipitación salina del ADN con NaCl.

Las cantidades de ADN total aisladas por PCI y precipitación con el método modificado (cloroformo-álcool isoamílico) fueron similares; sin embargo, la precipitación salina con NaCl produjo cantidades mínimas de ADN (datos no mostrados). Adicionalmente se evaluó la calidad de estos aislados mediante amplificación por PCR del fragmento interno del gen *cyt b* (ver numeral 3.5) Los resultados para la extracción por lisis alcalina en *Homo sapiens* fueron satisfactorios (datos no mostrados).

3.4 RENDIMIENTO DE ADN AISLADO

El método PCI generó alrededor de 1.1 y 1.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN total a partir de tejido muscular crudo y material cárnico procesado respectivamente, mientras que el kit de extracción DNeasy[®] Tissue, empleado en el material cárnico, permitió aislar cerca de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN total en las muestras utilizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento de ADN total aislado de tejido muscular crudo y material cárnico procesado.

Muestra	Método*	Abs _{260nm} **	µg/µl
<i>Homo sapiens</i>	FBI	0,157	0,79
<i>Canis familiaris</i>	PCI	0,213	1,07
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	PCI	0,275	1,38
<i>Rattus norvegicus</i>	PCI	0,144	0,72
<i>Felis catus</i>	PCI	0,242	1,21
<i>Bufo marinus</i>	PCI	0,28	1,40
<i>Gallus gallus</i>	PCI	0,25	1,25
<i>Mus musculus</i>	PCI	0,349	1,75
<i>Columba livia</i>	PCI	0,275	1,38
<i>Sus scrofa</i>	PCI	0,133	0,67
<i>Bos taurus</i>	PCI	0,215	1,08
<i>Capra hircus</i>	PCI	0,226	1,13
Bagre	PCI	0,238	1,19
<i>Prochilodus reticulatus</i>	PCI	0,169	0,85
Atún enlatado	PCI	0,231	1,16
	kit	0,146	0,73
Chorizo	kit	0,129	0,65
Mortadela	PCI	0,278	1,39
	kit	0,14	0,70
Salchicha	PCI	0,206	1,03
Salchicha1	kit	0,175	0,88
Salchicha2	kit	0,15	0,75
Salchichón1	PCI	0,313	1,57
Salchichón2	PCI	0,284	1,42
	kit	0,184	0,92
Salchichón3	kit	0,161	0,81

* FBI, método de extracción en sangre del FBI (FBI, USA 1993); PCI, método básico de extracción con fenol-cloroformo (Hillis et al. 1996); kit, DNeasy[®] Tissue Kit (Quiagen, Maryland).

** Lecturas hechas sobre una dilución 1/100 a 260 nm de longitud de onda.

3.5 AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA (PCR) DEL FRAGMENTO SELECCIONADO

La evaluación de la calidad amplificable del ADN aislado empleando el método PCI y sus modificaciones se muestra en la figura 10. El ADN extraído con NaCl (Fig 10; 1 y 4) no amplificó el fragmento de *cyt b*, mientras que para los aislamientos con el método modificado

(cloroformo-álcohol isoamílico) y PCI se presentó amplificación (Fig. 10; 2, 5 y 3, 6 respectivamente). Los mejores resultados se obtuvieron con el método PCI.

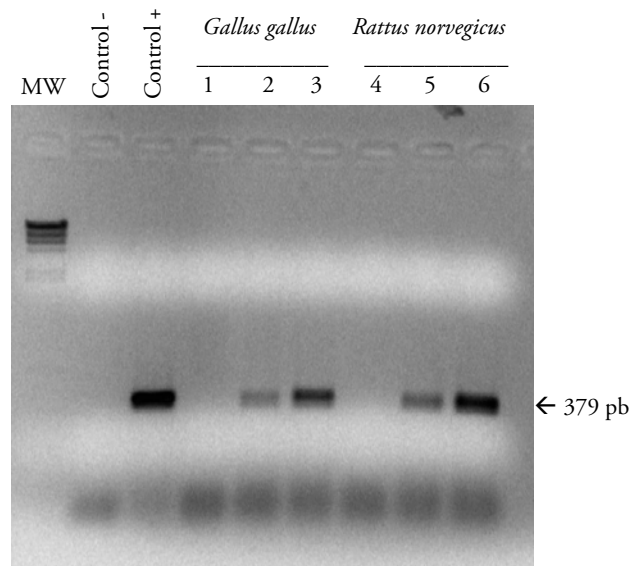


Fig. 10. Evaluación de la calidad amplificable del ADN aislado empleando el método PCI y las modificaciones hechas al protocolo original. MW, marcador de peso molecular; 1 y 4, precipitación con NaCl; 2 y 5, cloroformo-álcohol isoamílico; 3 y 6, PCI. Como control positivo (+) de la PCR se empleó ADN de *Homo sapiens* (humano) aislado por el método del FBI.

Como se esperaba, un fragmento de ADN de 379 pb, perteneciente al gen citocromo *b* (*cyt b*), fue amplificado de las muestras de ADN aisladas de tejido muscular crudo (Fig. 11, A) y de material cárnico procesado (Fig. 11, B). La amplificación con 30 ciclos de este fragmento permitió un rendimiento hasta 1300 ng de ADN, cuando se utilizan aproximadamente 100 ng de ADN total molde para la PCR en reacciones de 100 μ l de volumen final.

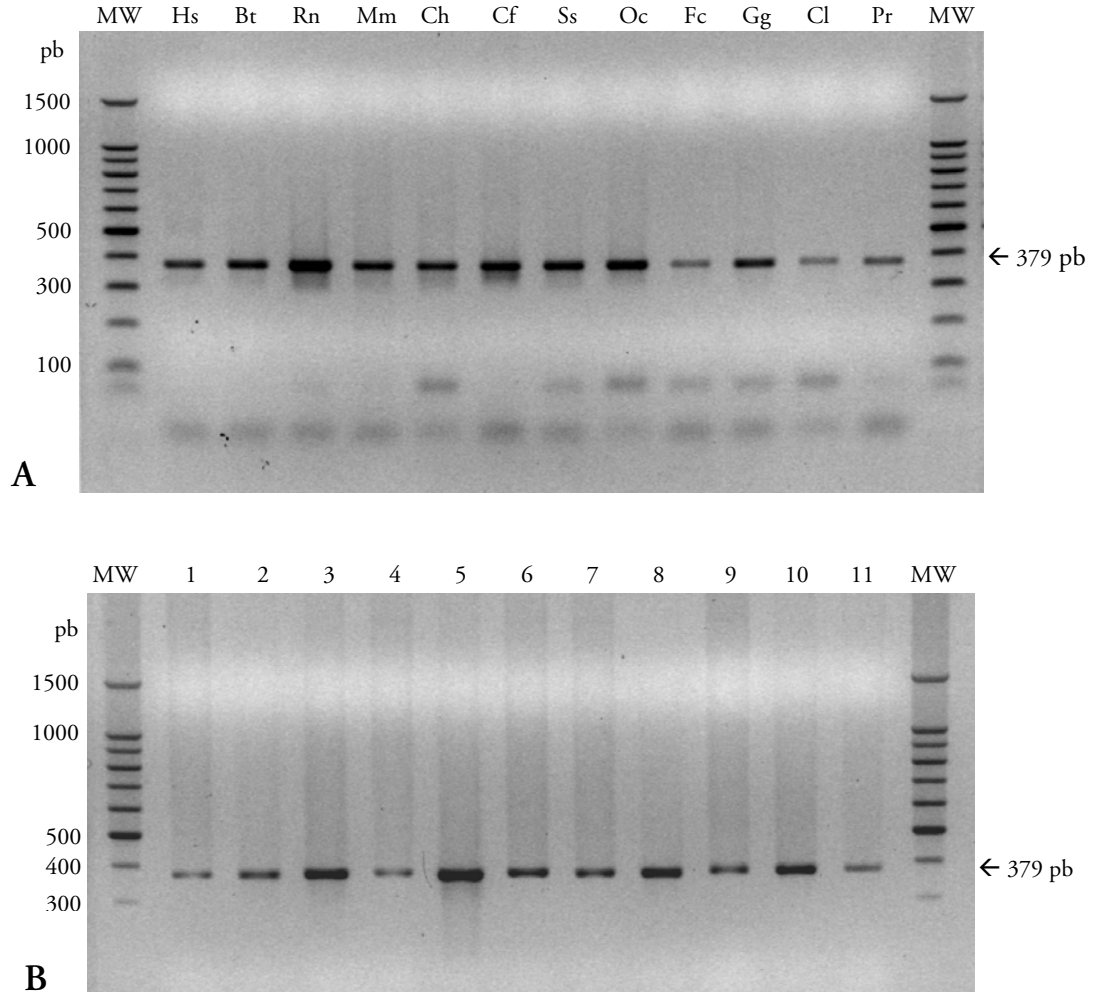


Fig. 11. **A.** Amplificación por PCR del fragmento interno del gen *cyt b* (379 pb) en muestras de ADN total en diferentes especies animales. pb, pares de bases; MW, marcador de peso molecular; Hs, *Homo sapiens* (hombre); Bt, *Bos taurus* (vaca); Rn, *Rattus norvegicus* (rata); Mm, *Mus musculus* (ratón); Ch, *Capra hircus* (cabra); Cf, *Canis familiaris* (perro); Ss, *Sus scrofa* (cerdo) Oc, *Oryctolagus cuniculus* (conejo); Fc, *Felis catus* (gato doméstico); Gg, *Gallus gallus* (gallina); Cl, *Columba livia* (paloma); Pr, *Prochylodus reticulatus* (bocachico). **B.** Amplificación por PCR del fragmento interno del gen *cyt b* (379 pb) en muestras de ADN total aisladas a partir de material cárnico procesado. 1, mortadela (kit); 2, mortadela (PCI); 3, salchichón1 (PCI); 4, salchichón2 (kit); 5, salchichón2 (PCI); 6, salchichón3 (kit); 7, salchicha (kit); 8, salchicha (PCI); 9, chorizo (kit); 10, carne cocida; 11, atún enlatado (PCI).

Las amplificaciones no generaron bandas parásitas como resultado de posibles hibridaciones de los oligonucleótidos en otras regiones del ADN diferentes al gen *cyt b*. Temperaturas de

hibridización por debajo de 60 °C durante los ciclos PCR repercutieron en la aparición de bandas no específicas, en tanto que temperaturas de 60 °C generan amplificadas óptimos (Fig. 12).

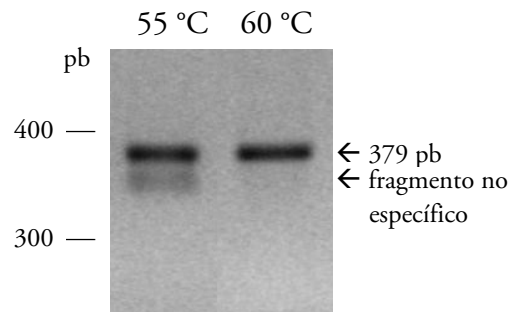


Figura 12. Efecto de la temperatura de hibridización en la PCR. La disminución de la temperatura de hibridización por debajo de 60 °C incrementa la probabilidad de amplificadas no específicas. Las condiciones restantes para la PCR fueron las mismas citadas en la metodología. Las amplificaciones se efectuaron en *Homo sapiens*. pb, pares de bases.

Para verificar la autenticidad del amplificado (fragmento de 379 pb de *cyt b*) se realizaron análisis de restricción en algunas muestras.

3.5.1 Digestión enzimática. Los corridos electroforéticos de los digeridos para *Homo sapiens* y salchichón se pueden observar en la figura 13 (A y B respectivamente).

Como se esperaba, para *Homo sapiens* se obtuvieron tres fragmentos (179, 144 y 53 pb) ya que el producto PCR posee sitios de corte para la enzima *Ban I* en las posiciones 53 y 197 del fragmento amplificado de 379 pb (Fig. 13, A).

Para salchichón (Fig. 13, B) se obtuvieron fragmentos de 197 y 176 pb en la reacción correspondiente para *Ban I*, ya que teóricamente el fragmento amplificado para *Gallus gallus* posee un sitio de corte en la posición 197 al ser digerido con esta misma enzima. De igual forma, en la reacción para *Bam HI* se obtuvieron dos fragmentos (122 y 254 pb)

correspondiente a la digestión teórica con esta enzima para *Sus scrofa*. Claramente se aprecia que no hubo digestión en la reacción para la enzima *Xba* I, la cual debería cortar en la posición 268 del amplificado, generando dos fragmentos de 268 y 108 pb respectivamente, si éste presentara amplificadores correspondientes para *Bos taurus*.

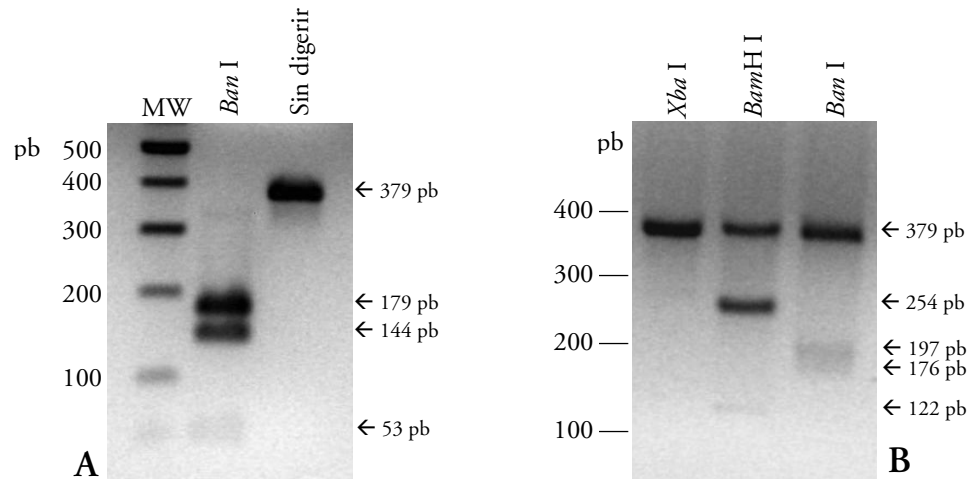


Fig. 13. **A.** Digestión enzimática del amplificado PCR (379 pb) de *Homo sapiens* con *Ban* I. Detalles en el texto. **B.** Digestión enzimática del amplificado PCR (379 pb) de un producto cárnico procesado (salchichón) con *Xba* I, *Bam*H I y *Ban* I. Detalles en el texto. MW, marcador de peso molecular; pb, pares de bases.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló un conjunto de métodos para el aislamiento de ADN total y amplificación de un fragmento del gen *cyt b* en tejido muscular fresco y productos cárnicos procesados, los cuales rinden suficiente ADN para posteriores análisis destinados a tipificar el origen animal de una muestra de carne. Estos análisis podrán servir de soporte para que las autoridades sanitarias logren controlar la sustitución ilegal de tejido animal de una u otra especie.

Para esto, fue necesario escoger un marcador genético a utilizar (*cyt b*); probar y modificar diferentes metodologías para la extracción de ADN en tejidos y desarrollar una estrategia de amplificación vía PCR que fuese reproducible.

4.1 SELECCIÓN DEL MARCADOR GENÉTICO Y OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR

La región seleccionada dentro del gen *cyt b* incluye segmentos transmembranales y de la superficie interna mitocondrial en la proteína citocromo *b*, con un alto número de posiciones internas variables a nivel aminoacídico. Irwin et al., (1991) sugirieron que la superficie externa de la proteína, al parecer, evoluciona más lentamente que la región transmembranal o la superficie interna y que la mayoría de los cambio variables en la porción transmembranal corresponde a cambios entre residuos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina). Esto ha podido ser soportado por otros autores (Matthee & Robinson 1997); sin embargo, Mouchaty et al., (1995) en un análisis filogenético en focas, no encontraron diferencias significativas en la proporción de reemplazamientos en sitios hipervariables en las regiones interna, transmembranal y externa, y de igual forma, en la tasas de evolución de estas mismas.

Se ha encontrado que esta corta secuencia (307 pb) del gen *cyt b* contiene información filogenética que se extiende desde nivel intraespecífico a nivel intergenérico (Kocher et al., 1989), por lo que se ha empleado éste o parte de él en un gran número de análisis filogenéticos (Mouchaty et al., 1995; Matthee & Robinson, 1997; Theimer & Keim, 1998), filogeográficos (Clark et al., 2003; Li et al., 2003), poblacionales (Steiner & Catzeflis, 2003) y en identificación taxonómica (Russell & Carnegie, 1994; Wickliffe et al., 2003).

Los alineamientos de las secuencias completas del gen *cyt b* pertenecientes a especies comúnmente utilizadas en el comercio legal e ilegal de carnes, permitieron identificar segmentos conservados que flanqueaban la región seleccionada. A partir de estos segmentos fueron seleccionados los oligonucleótidos necesarios para la amplificación. Los oligonucleótidos escogidos, L14841 y H15149, fueron diseñados inicialmente por Kocher et al. (1989) basado en alineamientos de secuencias del gen *cyt b* publicadas en esa fecha para mamíferos; la rana *Xenopus laevis* (Roe et al. 1985) y *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenholme 1985). Sin embargo, en esta investigación se adicionaron sitios de restricción enzimática en sus extremos 5' que pueden ser empleados en futuras manipulaciones. Kocher et al., (1989) emplearon estos oligonucleótidos y amplificaron un fragmento en 110 especies que incluían mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces e insectos. Desde entonces se han empleado de manera amplia como *primers* altamente conservados en numerables, trabajos investigativos (Russell & Carnegie 1994; Mouchaty et al. 1995; Clark et al. 2003).

4.2 EXTRACCION DEL ADN

Los patrones observados en la figura 9 demuestran que el tiempo *post mortem* y el almacenamiento afectan la calidad y cantidad del ADN aislado. Hillis et al., (1996) han aclarado que una vez muerto un organismo, al interior de sus células se desencadenan procesos degradativos del ADN, explicado por la actividad de DNAsas liberadas durante la muerte

celular. En los corridos electroforéticos de la figura 9A se aprecian bandas de alto peso molecular correspondientes a muestras con reducidos tiempos *post mortem* (Cf, Cl), así como de muestras de sangre procesadas inmediatamente después de tomada la muestra (Hs). Para los demás carriles se aprecia ADN con alto grado de degradación relacionado con diferentes tiempos después de ser sacrificados.

De igual forma, Hillis et al., (1996) sugieren que el tiempo de almacenamiento es crítico ya que el proceso de descongelamiento de las muestras durante la manipulación aumenta la actividad de las DNAsas. Se recomienda que durante el proceso de maceración de la muestra, ésta debe permanecer congelada; este punto es importante cuando se usan tejidos frescos, dado que si este paso se omite, los extractos no rinden productos PCR. El método PCI ofrece los mejores rendimientos en cuanto a la extracción, aunque se presenta cierto grado de degradación (Fig. 9 A, Cl), en comparación con otros métodos usados (Fig. 9 A, Hs) donde se aprecia mejor calidad de ADN.

El procesamiento culinario extensivo de la muestra, así como el tiempo de almacenamiento una vez procesado el producto cárnico afecta drásticamente la calidad y cantidad del ADN aislado. Como se puede apreciar para cárnicos procesados, el método PCI ofrece los mejores rendimientos, (Fig. 9 B; 2, 3, 5, 8, 10 y 11); sin embargo, dichos rendimientos también pueden verse afectados por el procesamiento culinario de la muestra (Fig. 9 B; 2, 10 y 11); en éstos, los derivados cárnicos fueron sometidos a extensos tiempos de cocción y sobrecocción que contribuirían a la degradación del ADN y en consecuencia, en la cantidad extraíble.

Los extractos realizados con el kit (Fig. 9 B; 1, 4, 6, 7 y 9) ofrecen menores rendimientos. Limitaciones de diseño en la metodología aplicada a la extracción de ADN con el kit (colmatación de la membrana) impiden tomar más de 25 mg de muestra y dado que se trata de

tejidos altamente procesados, esta cantidad inicial ofrece bajos rendimientos. No se extrajo ADN de tejidos frescos utilizando el kit por limitantes económicos.

Los extractos realizados con el método alternativo de precipitación salina no generan productos PCR (Fig. 10); es probable que la falta de extracción orgánica pueda dejar inhibidores enzimáticos y contaminantes que interfieran con la rutina de la PCR.

Los extractos de ADN llevados a cabo por el método de lisis alcalina no ofrecen resultados cuantificables en un gel de electroforesis; sin embargo, productos PCR a partir de estos extractos son satisfactorios (dato no mostrado).

4.3 AMPLIFICACION ENZIMATICA (PCR) DEL FRAGMENTO GEN CITOCROMO *b* SELECCIONADO

Para la rutina de la PCR inicialmente se utilizaron condiciones como 94 °C para desnaturalización, 55 °C para la hibridización y 72 °C para la extensión; sin embargo, se observó que con estas condiciones surgían bandas parásitas (Fig. 12), como consecuencia de uniones inespecíficas entre los oligonucleótidos y secuencias para los cuales no se diseñaron. Por esto se decidió aumentar la temperatura de hibridización a 60 °C para hacer más específica la unión entre el oligonucleótido y su secuencia diana.

La concentración 1.8 mM MgCl₂ presentó los mejores resultados, con lo cual se aumentó la cantidad del amplificado, mientras las otras condiciones de la PCR permanecían inalteradas. Innis & Gelfand (1990) consideran que la temperatura de hibridización y la concentración de MgCl₂ son puntos críticos a modificar cuando se presentan estos problemas.

Los rendimientos de los productos PCR, se ven afectados por la concentración del ADN utilizado en cada reacción, como se puede apreciar en la (Fig.11 A; 2, 3, 5, 8, 10 y 11) ya que el método de extracción PCI ofrece mejores rendimientos durante las reacciones posteriores de amplificación, en tanto que los amplificadores realizados a partir de extractos hechos con el kit ofrecen menos rendimientos por reacción (Fig. 11 A; 1, 4, 6, 7 y 9). De igual manera, los resultados sugerirían que ciertas condiciones como el origen de la muestra, tiempo de almacenamiento y el procesamiento, pueden afectar los rendimientos en los productos PCR (Fig.11 B; 1, 4, 11); por ejemplo para atún (Fig.11 B, 11), los rendimientos de extracción fueron bajos y esto afecta la cantidad de los productos PCR (Fig.11 B, 11), lo que indica claramente que el procesamiento extenso afecta los resultados. Los amplificadores a partir de extracto de ADN en atún utilizando el kit fueron nulos (dato no mostrado).

Es importante mencionar que, aunque el método de extracción de ADN utilizado y el extenso procesamiento de las muestras afectan el rendimiento de los productos PCR, en la reacción final (100 μ l) se encuentra suficiente amplificador (aproximadamente entre 0.63 μ g - 1.9 μ g); que una vez filtrado y concentrado a través de columnas se obtienen productos PCR suficientes y limpios para posteriores análisis (RFLPs, secuenciación, clonación).

Dado los datos obtenidos durante la extracción y amplificación se recomienda la utilización del método PCI para la extracción del ADN en productos frescos y procesados.

Para procesados donde se esperaba una amplia degradación del ADN (corroborado en la práctica, figura 9 B) se obtuvieron excelentes patrones PCR, a pesar del alto grado de procesamiento del tejido (es claro que este procesamiento afecta la calidad y cantidad del ADN genómico); sin embargo, el ADN mitocondrial resiste más esta manipulación. Esto es debido a su circularidad lo cual lo hace más resistente. Además, se encuentran varias copias por células que aumentan la probabilidad que algunas de estas moléculas soporten el procesamiento.

Los patrones de restricción obtenidos por la digestión enzimática sobre algunas muestras (Fig. 13) permiten soportar la identidad del fragmento interno del gen *cyt b* amplificado en las especies y productos cárnicos procesados incluidos en la presente investigación. Patrones de restricción teóricos del fragmento establecidos por análisis informáticos para algunas especies, e.g., *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Gallus gallus* y *Sus scrofa*, son congruentes con los datos experimentales.

5. CONCLUSIONES

- Los *primers* seleccionados son suficientemente conservados para amplificar la región interna 96-402 pb de *cyt b* en todos los grupos vertebrados. En esta investigación se pudo amplificar el fragmento deseado en todos los grupos vertebrado empleados en el análisis, demostrando de esta manera su carácter universal.
- A pesar de las intensas rutinas de procesamiento de las muestras cárnicas, el ADNmt puede conservarse y ser amplificado por PCR. Gran parte del ADN genómico puede estar altamente degradado, sin embargo un buen número de moléculas de ADNmt soportan el procesamiento.
- Muestras de tejido muscular con largos periodos *post mortem* permiten extraer ADN total conteniendo ADNmt de calidad amplificable.
- Análisis de PCR-RFLP sobre este fragmento mitocondrial permitirían una identificación animal previa en cualquier tipo de muestra o podrían facilitar la identificación simultánea de 2 o 3 taxa que hicieran parte de una misma muestra.
- La amplificación exitosa del gen *cyt b* a partir de estos tejidos demuestran la adecuada utilidad del ADNmt como herramienta en la identificación de especies animales.

6. RECOMENDACIONES

- Es necesario implementar análisis de polimorfismo nucleotídico intraespecífico del fragmento en poblaciones animales colombianas objeto de estudio del proyecto.
- La posibilidad de identificaciones animales utilizando esta herramienta puede extenderse a casos forenses y en el tráfico ilegal de pieles.
- Se debe evaluar su utilidad en la identificación vegetal. Es interesante establecer otros tipos de marcadores moleculares en el ADNmt que puedan brindar esta aplicación.
- La continuación de la fase II (secuenciación) asegura la implementación de esta herramienta en el control sanitario de estos alimentos por parte de los organismos gubernamentales de salud pública a nivel local o nacional.

BIBLIOGRAFIA

AKHMANOVA, A., F. VONCKEN, T. ALEN, A. HOEK, G. VOGELS, B. BOXMA, M. VEENHUIS, J. H. HACKSTEIN. 1998. A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396: 527-528.

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. R. RAFF, J. D. WATSON. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York.

ANDERSON, S., A. T. BANKIER, B. G. BARRELL, M. H. L. DE BRUIJN, A. R. COULSON, J. DROUIN, I. C. EPERON, D. P. NIERLICH, B. ROE, F. SANGER, P. H. SCHEIRER, A. J. H. SMITH, R. Y. STADEN. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

ANDERSON, S., M. H. L. DE BRUIJN, A. R. COULSON, I. C. EPERON, F. SANGER, I. G. YOUNG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.

ANDERSON, S., A. ZOMORODIPOUR, J. O. ANDERSON, T. SICHERITZ-PONTÉN, U. C. M. ALSMARK, R. M. PODOWSKI, A. K. NÄUSLUND, A. S. ERIKSSON, H. H. WINKLER, C. G. KURLAND. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140.

BARRELL, B. G., A. T. BANKIER, J. DROUIN. 1979. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282: 189-194.

- BARTLETT, S. E., W. S. DAVIDSON. 1992. FINS (Forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques* 12: 408-411.
- BIBB, M., R. A. VAN ETTEN, C. T. WRIGHT, M. W. WALBERG, D. A. CLAYTON. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26: 167-180.
- BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767-1780.
- BORST, P., L. A. GRIVELL, G. S. P. GROOT. 1984. Organelle DNA. *TIBS* April: 128-130.
- BUCHHOLZ, W. G., S. T. MILLAR, W. J. SPEARMAN. 1999. Manual DNA sequencing using fluorescent-labeled primers and fluorescence scanner. *BioTechniques* 27: 646-648.
- BURGER, G., Y. ZHU, T. G. LITTLEJOHN, S. J. GREENWOOD, M. N. SCHNARE, B. F. LANG, M. Gray. 2000. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena pyriformis* and comparison with *Paramecium aurelia* mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 00: 1-16.
- BUTLER, J. M., B. C. LEVIN. 1998. Forensic applications of mitochondrial DNA. *TIBTECH* 16: 158-162.
- CLARK, A. M., P. E. MOLER, E. E. POSSARDT, A. H. SAVITZKY, W. S. BROWN, B. W. BOWEN. 2003. Phylogeography of the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) based on mtDNA sequences. *Journal of Herpetology* 37(1): 145-154.

CLARY, D. O., D. R. WOLSTENHOLME. 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Evol. 22(3): 252-71.

COLLOMBET, J. M., C. COUTELLE. 1998. Towards gene therapy of mitochondrial disorders. Molecular Medicine Today January: 31-38.

COOPER, G. M. 1997. *The Cell: A Molecular Approach*. AMS press, Washinton D.C.

EDWARDS, S. V., A. C. WILSON. 1990. Phyllogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of australian songbirds (*Pomatostomus*). Genetics Society of America 126: 695-711.

EMBLEY, T. M., W. MARTIN. 1998. A Hydrogen-producing mitochondrion. Nature 396: 517-519.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. 1993. *RFLP Manual*, U.S. Government.

FERRIS, S. D., A. C. WILSON, & W. M. BROWN. 1981. Evolutionary tree for apes humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2432-2436.

FERRIS, S. D., R. D. SAGE, C. M. HUANG, J. T. NIELSEN, U. RITTE, A. C. WILSON. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2290-2294.

FREY, T. G., C. A. MANNELLA. 2000. The internal structure of mitochondria. *TIBS* 25: 319-324.

GLENN, T. C., J. S. STATON, A. T. VU, L. M. DAVIS, J. R. ALVARADO, W. E. RHODES, L. BRISBIN JR., & R. H. SAWYER. 2002. Low mitochondrial DNA variation among american alligators and a novel non-coding region in Crocodylians. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 249: 312-324.

GRAY, M. 1989a. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 25-50.

GRAY, M. 1989b. The evolutionary origins of organelles. *TIG* 5: 294-299.

GRAY, M. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Inter. Rev. of Cyt.* 141: 233-357.

GRAY, M. 1999. Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 9: 678-687.

GRAY, M., G. BURGER, F. LANG. 1999a. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.

GRAY, M., G. BURGER, F. LANG. 1999b. Mitochondria make a comeback: Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1475-1481.

GRAY, M., W. F. DOOLITTLE. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiological Reviews* 46: 1-42.

GRAY, M., F. LANG. 1998. Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends in Microbiology* 6: 1-3.

GRAY, M., F. LANG, R. CEDERGREN, B. GOLDING, C. LEMIEUX, D. SANKOFF, M. TURMEL, N. BROSSARD, E. DELAGE, T. G. LITTLEJOHN, I. PLANTE, P. RIOUX, D. SAINT-LOUIS, Y. ZHU, G. BURGER. 1998. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Research* 26: 865-878.

GRAY, M., D. SPENCER. 1996. *Organelle Evolution. Evolution of Microbial Life*. pp. 109-126. Cambridge University Press.

HAUSWIRTH, W. W., P. J. LAIPIS. 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of holstein cow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4686-4690.

HILLIS, D. M., B. K. MABLE, A. LARSON, S. K. DAVIS, E. A. ZIMMER. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning, pp. 342-343. *En* D. M. Hillis, C. Moritz, B. K. Mable (eds), *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

HIGGINS, D. G., J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymology* 266: 402.

HUNKAPILLER, T., R. J. KAISER, B. F. KOOP, L. HOOD. 1991. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254: 59-67.

INNIS, M. A., D. H. GAELFAND. 1990. Optimization of PCRs, pp. 3-11. *En* M. A. Innis & D. H. Gelfand (eds), *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. Londres.

IRWIN, D. M., T. D. KOCHER, A. C. WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.

KLUG, W. S., M. R. CUMMINGS. 1999. *Conceptos de Genética*. Prentice Hall, Madrid.

KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F. X. VILLABLANCA, A. C. WILSON. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.

LANG, F., M. GRAY, G. BURGER. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet* 33: 351-397.

LI, M., F. WEI, P. GROVES, Z. FENG, J. HU. 2003. Genetic structure and phylogeography of the takin (*Budorcas taxicolor*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Can. J. Zool.* 81: 462-468.

MAHLKNECHT, U., D. HOELZER, R. BUCALA. 1999. Sequencing of genomic DNA. *BioTechniques* 27: 406-408.

MARTIN, W., R. G. HERRMANN. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology* 118: 9-17.

MARTIN, W., M. MÜLLER. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41.

- MATTHEE, C. A., T. J. ROBINSON. 1997. Molecular phylogeny of the springhare, *Pedetes capensis*, based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14(1): 20-29.
- MINDELL, D. P., M. D. SORENSON, D. E. DIMCHEFF. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10693-10697.
- MOREIRA, D., H. L. GUYADER, H. PHILIPPE. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplast. *Nature* 405: 69-72.
- MOUCHATY, S., J. A. COOK, G. G. SHIELDS. 1995. Phylogenetic analysis of northern hair seals based nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Mammalogy* 76: 1178-1185.
- PALMER, J. D. 2000. A single birth of all plastids? *Nature* 405: 32-33.
- PICHLER, F. B., S. M. DAWSON, E. SLOOTEN, C. S. BAKER. 1998. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conservation Biology* 12: 676-682.
- POYTON, R. O., J. E. McEWEN. 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 563-607.
- PROBER, J. M., G. L. TRAINOR, D. J. DAM, F. W. HOBBS, C. W. ROBERTSON, R. J. ZAGURSKY, A. J. COCUZZA, M. A. JENSEN, K. BAUMEISTER. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-342.

- RAVEN, P. H. 1970. A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science* 169: 641-646.
- ROE, B., D. P. MA, R. K. WILSON, J. F. H. WONG. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *The Journal of Biological Chemistry* 17: 9759-9774.
- RUDBECK, L., J. DISSING. 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *BioTechniques* 25(4): 588-592.
- RUSSELL, A. R., P. R. CARNEGIE. 1994. Identification of gourmet meat using FINS (Forensically informative Nucleotide Sequencing). *BioTechniques* 17: 24-26.
- SANGER, F., S. NICKLEN, A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SHADEL, G., D. A. CLAYTON. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 409-435.
- SIMONSEN, B. O. T., H. R. SIEGISMUND, P. ARCTANDER. 1998. Population structure of african buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Molecular Ecology* 7: 225-237.
- SMITH, L. M., J. Z. SANDERS, R. J. KAISER, P. HUGHES, C. DODD, C. R. CONNELL, C. HEINER, B. H. S. KENT, L. E. HOOD. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Science* 321: 674-679.

STEINER, C., F. M. CATZEFLIS. 2003. Mitochondrial diversity and morphological variation of *Marmosa murina* (Didelphidae) in French Guiana. *Journal of Mammalogy* 84(3): 822-831.

THEIMER, T. C., P. KEIM. 1998. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. *Journal of Mammalogy* 79: 566-572.

THOMPSON J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

THORSNESS, P. E., E. R. WEBER. 1996. Escape and migration of nucleic acids between chloroplast, mitochondria, and the nucleus. *International Review of Cytology* 165: 207-234.

TURMEL, M., CH. OTIS, & C. LEMIEUX. 2002a. The complete mitochondrial DNA sequence of *Mesostigma viride* identifies this green alga as the earliest green plant divergence and predicts a highly compact mitochondrial genome in the ancestor of all green plants. *Mol. Biol. Evol.* 19(1):24-38.

TURMEL, M., CH. OTIS, & C. LEMIEUX. 2002b. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: Insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(17): 11275-11280.

VAWTER, L., W. M. BROWN. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234: 194-195.

WARD, B. L., S. R. NADERSON, J. A. BENDICH. 1981. The mitochondrial genome is a large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell* 25: 793-803.

WARRIOR, R., J. GALL. 1985. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sc. Geneve.* 38: 439-445.

WOLSTENHOLME, D. R., J. L. MACFARLANE, R. OKIMOTO, D. CLARY, J. A. WAHLEITHNER. 1987. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1324-1328.

ZINK, R. M. & J. D. WECKSTEIN. 2003. Recent evolutionary history of the fox sparrows (Genus: *Passerella*). *The Auk* 120(2): 522-527.