

# **Estandarización de la extracción de ADN y la amplificación y visualización de cuatro marcadores moleculares (ADNmt (*ATP8*, *16S*, *NADH-5*) y ADNnu (*AMY*)) para estudios genéticos de felinos neotropicales (*Leopardus* spp. y *Herpailurus yagouaroundi*)**

Javier Darío Vega González – [vegagjdario@javeriana.edu.co](mailto:vegagjdario@javeriana.edu.co)

## **RESUMEN**

Se estandarizaron los protocolos para la extracción de ADN y para la amplificación y electroforesis de los marcadores mitocondriales (ADNmt: *ATP8*, *16S*, *NADH-5*) y nuclear (ADNnu: *AMY*) para felinos neotropicales (*Leopardus* spp. y *Herpailurus yagouaroundi*). Se utilizaron 94 muestras y 38 extraídos preparados previamente con correspondencia geográfica desde Nicaragua hasta Argentina. Se validaron los métodos de extracción orgánica Fenol-Cloroformo, inorgánica Chelex-100 y con Kit. Se encontró que Fenol-cloroformo produjo extraídos de ADN de buena calidad y concentración, los cuales también amplificaron adecuadamente. Por otra parte, se estandarizaron las condiciones de PCR para *16S*, la concentración tanto de ADN como de bromuro de etidio para la visualización y se validaron condiciones de PCR previamente reportadas para amplificar *ATP8*, *NADH-5* y *AMY*. Se obtuvo 53 amplificados de los marcadores mitocondriales para 6 especies de *Leopardus* (*L. colocolo*, *L. jacobita* y *L. geoffroyi*., *L. pardalis*, *L. tigrinus* y *L. wiedii*) y dos de *AMY*, en los que se pudo determinar el sexo de individuos de *L. pardalis* y *L. geoffroyi* en gel de agarosa sin necesidad de recurrir a los de poliacrilamida.

## **ABSTRACT**

Protocols for DNA extraction and for amplification and electrophoresis of mitochondrial markers (mtDNA: *ATP8*, *16S*, *NADH-5*) and nuclear (NDNA: *AMY*) were standardized for neotropical felines (*Leopardus* spp. and *Herpailurus yagouaroundi*). We used 94 samples and 38 extracts previously prepared with geographical correspondence from Nicaragua to Argentina. The methods of organic extraction Phenol-Chloroform, inorganic Chelex-100 and with Kit were validated. Phenol-chloroform was found to produce extracted DNA of good quality and concentration, which they also amplified adequately. On the other hand, the PCR conditions for *16S*, the concentration of both DNA and ethidium bromide for visualization were standardized and previously reported PCR conditions were validated to amplify *ATP8*, *NADH-5* and *AMY*. We obtained 53 amplified mitochondrial markers for 6 species of *Leopardus* (*L. colocolo*, *L. jacobita* and *L. geoffroyi*., *L. pardalis*, *L. tigrinus* and *L. wiedii*) and two of

AMY, in which it was possible to determine the sex of individuals of *L. pardalis* and *L. geoffroyi* in agarose gel without the need to resort to polyacrylamide.

## **PALABRAS CLAVE**

*Leopardus* spp., extracción de ADN, amplificación de fragmentos, PCR, electroforesis, sexaje molecular, ATP8, 16S, NADH-5, Amelogenina (AMY).

## **INTRODUCCIÓN**

En el neotrópico se han descrito 13 especies de felinos del género *Leopardus* que conforman cuatro complejos de especies: subgénero *Leopardus* con el tigrillo (*Leopardus tigrinus*), el tigrillo oriental (*Leopardus emiliae*), el gato tigre chico (*Leopardus guttulus*), el ocelote (*Leopardus pardalis*) y el margay (*Leopardus wiedii*) (Do Nascimento & Feijó, 2017), subgénero *Lynchailurus* con el gato del pantanal (*Leopardus braccatus*), el gato del pantanal oriental (*Leopardus munoai*), el gato de Garlepp (*Leopardus garleppi*), el colocolo (*Leopardus colocolo*) y el gato de los pajonales (*Leopardus pajeros*) (Do Nascimento *et al.*, 2021), subgénero *Oncifelis* con el gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*) y la huiña (*Leopardus guigna*) (Do Nascimento, 2014) y por último el subgénero *Oreailurus* con el gato andino (*Leopardus jacobita*) (Kitchener *et al.*, 2017). Estas especies están estrechamente relacionadas, son similares en su morfología, ecología y se solapan en algunos de sus rangos de distribución. Conforme ha incrementado el conocimiento en genética de estos felinos se han detectado casos de hibridación entre *L. colocolo* y *L. tigrinus* (Johnson *et al.*, 1999; Trigo *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2016), entre *L. geoffroyi* y *L. tigrinus* (Trigo *et al.*, 2008, 2013), entre *L. guttulus* y *L. geoffroyi* (Trigo *et al.*, 2014) y entre *L. tigrinus* con *L. pardalis* y *L. wiedii* en Colombia y *L. tigrinus* con *L. geoffroyi* en Bolivia (Ruíz-García *et al.*, 2018).

El género *Leopardus* y *Herpailurus* son clados que muestra una divergencia reciente (Ruíz-García *et al.*, 2018a, 2018b; Trindade *et al.*, 2021), el cual ha sido estudiado con la subunidad 8 de membrana de la ATP sintasa (ATP8), la subunidad 5 del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH-5), la región control (RC), el ARN ribosomal 16S (16S), la citocromo B (CytB) (Johnson *et al.*, 1999; Trigo *et al.*, 2008, 2013, 2014; Napolitano *et al.*, 2014; Ruíz-García *et al.*, 2018) y mitogenomas (Li *et al.*, 2016; Ruíz-García *et al.*, 2018). Estos marcadores tienen altas tasas de mutación con respecto a los marcadores nucleares (Lynch *et al.*, 2006; Allio *et al.*, 2017), por lo que se han usado en filogeografía y para diferenciar poblaciones genéticamente distintas en las que aún hay flujo génico (Moritz, 1994; Avise,

1995). Los marcadores *ATP8*, *16S* y *NADH-5* brindan prácticamente la misma información que mitogenómica, por lo que resultan ser apropiados y válidos para aclarar las relaciones entre las poblaciones y poder identificar posibles especies en los diferentes complejos de *Leopardus* que solo pueden ser reconocidas mediante herramientas y análisis moleculares (Struck & Cerca de Oliveira, 2019; Nardelli & Túnez, 2021).

Por otra parte, herramientas genéticas como el sexaje molecular son usadas para estudios de comportamiento (An *et al.*, 2007; Nardelli & Túnez, 2021) y se ha trabajado en *Leopardus* con los marcadores de la proteína proteolípida 1 (*PLP1*) y la tirosina cinasa de Bruton (*BTK*) del cromosoma X y con los intrones del cromosoma Y de la proteína del dedo de zinc (*ZFY*) y la proteína 3 del mantenimiento estructural del cromosoma (*SMCY3*) (Trigo *et al.*, 2013, 2014) para determinar si se trata de introgresión genética o una separación incompleta de linajes en los casos de hibridación (Rodríguez-Prieto, 2013; Ruíz-García *et al.*, 2018a). Adicionalmente, es posible identificar si la hibridación ocurre de manera natural por competencia y desplazamiento o por causas antrópicas (Abbott *et al.*, 2016; Ruíz-García *et al.*, 2018a; Adavoudi & Pilot, 2022). Además, el gen de la amelogenina (*AMY*) ha sido utilizado para sexar individuos de *L. pardalis* (Wultsch *et al.*, 2016) y *L. guigna* (Napolitano *et al.*, 2015) y complementar estudios de estructura poblacional. Este gen se encuentra en ambos cromosomas sexuales y presenta una deleción de 20pb en el cromosoma Y, por lo que produce dos bandas si se trata de un macho o una banda si se trata de una hembra (Miotto *et al.*, 2011). Esto hace que con este marcador pueda realizarse el sexaje en gel de agarosa (Ennis & Gallagher, 1994; Kumar *et al.*, 2015) sin recurrir a técnicas de genotipificado para determinar el sexo.

Sin embargo, para realizar estos estudios es necesario comenzar por extraer adecuadamente el ácido desoxirribonucleico (ADN), amplificar correctamente los fragmentos y visualizar los amplificadores de los loci de interés. Primero, para extraer ADN se han desarrollado protocolos como con la resina quelante Chelex-100, con solventes orgánicos como el fenol-cloroformo (Ph-Chl) y kits comerciales (Janabi *et al.*, 2016; Dairawan & Shetty, 2020). Segundo, para amplificar los fragmentos es necesario contar con los primers indicados, polimerasa, desoxinucleótidos (dNTPs), un buffer adecuado e identificar los ciclos de temperatura para la amplificación (Saiki, 1989). Por último, la visualización de los amplificadores puede hacerse en geles de agarosa o poliacrilamida, para lo cual es importante la concentración con la que son elaborados los geles y las condiciones de electroforesis, como el voltaje, el tiempo y la concentración de los agentes intercalantes que permiten revelar los fragmentos (Stellwagen, 2009)

Este trabajo de grado está enmarcado en el proyecto “Determinación del número de especies de tigrillos y posible evidencia molecular (mitocondrial y nuclear) de la hibridación del mismo con otras especies de felinos del género *Leopardus* en el noroeste de Sudamérica” financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, en cuyos objetivos está el aumentar el número de secuencias de *ATP8* y *16S* de las nuevas especies del género *Leopardus* de las trabajadas en Pinedo-Castro 2017 y Ruiz-García et al., 2018 y obtener secuencias de *NADH-5* y de un gen nuclear de todas las muestras de *Leopardus* con el fin de tener mayor robustez en los resultados. Para este propósito, se hizo necesaria la estandarización de los protocolos de extracción, amplificación y electroforesis para los genes de *ATP8* y *16S* y *NADH-5* en las nuevas especies y del marcador nuclear *AMY* en todas las especies.

## **METODOLOGÍA**

### *Muestras*

Se trabajó con un total de 94 muestras (hueso (46), piel (30), pelo (10), diente (3), músculo (2), uña (2) y sangre (1)) de felinos neotropicales (*Leopardus* spp. y *H. yagouaroundi*) obtenidas en campo desde Colombia hasta Argentina (Figura 1.). Discriminando por especies, este grupo se compone de 34 muestras *L. tigrinus* (Colombia (18), Ecuador (8), Perú (4), Bolivia (2) y Argentina (2)), 18 muestras de *L. pardalis* (Ecuador (7), Perú (6), Argentina (4) y Colombia (1)), 18 muestras de *L. geoffroyi* (Argentina (10), Paraguay (4) y Uruguay (4)), 4 muestras de *L. pajeros*, cuatro muestras de *L. wiedii* (Argentina (2) y Colombia (2)), 4 muestras de *L. braccatus* de Uruguay, 3 muestras de *L. colocolo* (Bolivia(1), Brasil (1) y Chile (1)), 1 muestra de *L. guigna* de Argentina y 8 muestras de *H. yagouaroundi* (Argentina (7) y Paraguay (1)).

También, se trabajó con 38 extraídos de ADN de felinos neotropicales (*Leopardus* spp.) obtenidos previamente con Ph-Chl por Ruíz-García y colaboradores (2018). El conjunto de extraídos se compone de 10 extraídos de *L. colocolo* (Bolivia (9) y Chile (1)), 9 extraídos de *L. tigrinus* (Colombia (5) y Ecuador (4)), 9 extraídos de *L. geoffroyi* (Bolivia (7) y Argentina (2)), 6 extraídos de *L. jacobita* de Bolivia, 2 extraídos de *L. wiedii* de Colombia, 1 extraído de *L. guigna* de Chile y 1 extraído de *L. pardalis* de Nicaragua.

### *Extracción de ADN*

A partir de muestras de piel y músculo: A las muestras de piel se les retiró todo el pelo y se cortó aproximadamente un centímetro cuadrado. Luego, estos trozos de piel, al igual que las muestras de músculo, fueron cortadas en pedazos pequeños, lavados en SDS al 20% y maceradas en mortero con buffer de lisis (Anexo 11). Posteriormente, se dejaron en digestión durante cinco días en tubos de base cónica de 2 ml (Biocentrix, Prolab, Ltda., São Paulo, Brasil) con 300 $\mu$ l de buffer de lisis, 20 $\mu$ l de SDS y 10 $\mu$ l de proteinasa K A 56°C en baño María. Por último, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo estándar de extracción orgánica Ph-Chl (Sambrock *et al.*, 1989).

A partir de muestras de hueso: Las muestras de hueso grandes fueron pulverizadas con Mototool. Los huesos pequeños y dientes fueron triturados con martillo y hombresolo. Se utilizó entre 168mg y 1260mg de muestra pulverizada de hueso, las cuales se depositaron en tubos de base cónica de 50ml (Biologix Research, Co., Lenexa, Estados Unidos) con 40ml EDTA 0.5M pH 7.5 a 37°C para descalcificarlas. En total se realizaron cinco lavados para cada muestra agregando 40 ml de solución EDTA 0.5M pH 7.5 cada 24 horas y descartando la solución anterior. Durante el día estas muestras se mantuvieron en movimiento en shaker a 150 rpm y 37 °C y en la noche se sometieron a baño María conservando la temperatura. Se extrajo el ADN utilizando el kit de extracción “DNeasy blood & tissue” (Quiagen, Inc., Hilden, Alemania) y siguiendo el protocolo brindado por el fabricante (Anexo 10).

A partir de muestras de pelo y garra: las garras fueron pulverizadas con limas de hierro y los pelos se cortaron a 1 cm del bulbo. Las muestras se lavaron con SDS al 20% y se almacenaron en microtubos de 2 ml (Biocentrix, Prolab, Ltda., São Paulo, Brasil). Posteriormente se extrajo el ADN siguiendo el protocolo estándar de resina quelante Chelex 10% (Anexo 9; Wash *et al.*, 1991) y para una muestra de uña se extrajo el material genético utilizando el kit de extracción “DNeasy blood & tissue” (Quiagen, Inc., Hilden, Alemania) y siguiendo el protocolo brindado por el fabricante (Anexo 10).

A partir de muestras de diente: Los dientes fueron triturados con martillo y hombresolo. Las muestras trituradas se depositaron en microtubos de 2 ml (Biocentrix, Prolab, Ltda., São Paulo, Brasil) y se extrajo el ADN usando el protocolo estándar de resina quelante Chelex 10% (Anexo 9; Wash *et al.*, 1991).

A partir de muestra de sangre: se tomaron 200 $\mu$ l de sangre total y se dejaron en digestión en 200 $\mu$ l buffer de lisis para sangre (Anexo 11) y 10 $\mu$ l de proteinasa K durante cinco días a 56°C en baño María. Posteriormente se extrajo el ADN siguiendo el protocolo estándar de extracción orgánica Ph-Chl (Sambrock *et al.*, 1989).

### *Amplificación de ADN*

Se hicieron reacciones en cadena de polimerasa (PCR) para la amplificación de *ATP8*, *16S*, *NADH-5* y *AMY* en termocicladores T100 (Bio-Rad, Inc., California, Estados Unidos) y Minicycler (MJ Research, Inc., Waltham, Estados Unidos). Las PCR fueron llevadas a un volumen final de 25  $\mu$ l y las reacciones se prepararon con un mezcla constituida por 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X, 3  $\mu$ l de MgCL, 1  $\mu$ l de dNTPs, 1  $\mu$ l de GenTaq polimerasa (Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Ltda., Bogotá, Colombia), 1  $\mu$ l de cada primer y entre 80 a 200 ng de ADN. Previamente se reconstituyeron los primers en agua bidestilada en el volumen recomendado por el fabricante para una concentración final de 100 pM/ml (Tabla 1.)

Se utilizaron los siguientes primers: *ATP8* (*AP8-1F* (5'-GCATTAACCTTTTAAGTTAAAG-3') y *AP8-2R* (5'-GGCGAATAGATTTTCGTTCA-3') (Johnson *et al.*, 1998)), *16S* (*16S-1F* (5'-GTGCAAAGGTAGCATAATCA) y *16S-4R* (5'-TGTCCTGATCCAACATCGAG-3') (Hoelzel & Green, 1992)) y *NADH-5* (*ND5-1F* (5'-GTGCAACTCCAAATAAAAG-3') y *ND5-2R* (5'-GGGTCTGAGTTTATATATC-3') (Johnson *et al.*, 1998)). Se calcularon las temperaturas de anillamiento con la herramienta web Tm calculator (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y las condiciones de los ciclos de amplificación fueron obtenidas a partir de literatura (Tabla 3.).

Gen *AMY*: se usaron los primers *AMELY-2F* (5'-CGAGGTAATTTTTCTGTTTACT-3') y *AMELY-2R* (5'-GAAACTGAGTCAGAGAGGC-3') (Pilgrim *et al.*, 2009). Se estandarizó la amplificación de la amelogenina. Para esto se realizó PCR en gradiente en la temperatura de anillamiento y las temperaturas fueron las siguientes: 57°C, 56.5°C, 55.8°C, 54.7°C, 53.3°C, 52.1°C, 51.4°C, 51°C, 50.5°C, 49.9°C, 48.9°C, 47.5°C, 45.6°C, 44°C, 43°C y 42.5°C.

### *Electroforesis y visualización*

Los productos de PCR de los marcadores mitocondriales fueron chequeados en geles de agarosa al 2% a 100V durante 60 minutos con 16  $\mu$ l de bromuro de etidio al 0.25%, controles positivos y como referencia el marcador de peso Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder (BioLabs, Inc., IpsWich, Estados Unidos). Los amplificadas con temperatura de anillamiento a 50°C de *AMY* se chequearon en gel de agarosa al 0.8% a 150V durante 90 minutos con 30  $\mu$ l de bromuro de etidio al 0.25% y se enviaron a genotipificar a GenCore en la Universidad de Los Andes.

## *Cuantificación de ADN*

Una vez hechas las extracciones y las PCR se cuantificó la concentración de ADN y los valores de las tasas de pureza (260/280 y 260/230) de los extraídos y de los amplificados con buena visualización con el espectrofotómetro/fluorómetro DS-11 (DeNovix, Inc., Wilmington, Estados Unidos).

## **RESULTADOS**

### *Extracción y cuantificación de ADN*

Se logró extraer ADN independientemente del método de extracción utilizado para 56 de las 94 muestras. Por otra parte, no se terminó la extracción de 38 muestras de hueso ya que cada una requirió de 240 ml de EDTA 0.5M pH 7.5 y por litro de solución se usó entre 12 y 13 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) para alcanzar el pH deseado, el cual es un reactivo de uso controlado y no se contó con las cantidades suficientes. Como resultado de los protocolos de extracción se obtuvo dos o más extraídos y eluidos para algunas muestras, para un total de 80 extraídos con Ph-Chl, 18 eluidos con Kit y 14 extraídos con Chelex (Tabla 2.).

La concentración de ADN en los extraídos resultó ser diferente entre los tres métodos de extracción usados (Figura 2.). Chelex y Ph-Chl mostraron valores muy altos en algunos extraídos (1619.043 ng/ $\mu$ l y 2432.889 ng/ $\mu$ l respectivamente), sin embargo, en promedio la extracción con Chelex presentó mayor concentración (680.106 ng/ $\mu$ l), seguida por Ph-Chl (521.812 ng/ $\mu$ l). Por otra parte, la concentración de ADN obtenida con Kit resultó ser considerablemente menor en comparación a los otros dos métodos de extracción trabajados, pues la concentración más alta obtenida con Kit fue 79.781 ng/ $\mu$ l y el promedio de concentración 18.644 ng/ $\mu$ l. No se incluyeron las mediciones de concentración de los extraídos de Pinedo-Castro (2017) y Ruíz-García y colaboradores (2018) de modo que la comparación fuera entre extraídos frescos.

### *Pureza del ADN extraído*

Las tasas de pureza también mostraron diferencias entre los métodos de extracción (Tabla 2.). La tasa 260/280 indica la presencia de contaminantes como proteínas, fenol y otros residuos que absorben a 280 nm cuando los valores no son cercanos a 1.8 (Desjardins & Conklin, 2010). Chelex y Kit mostraron los valores más bajos en los extraídos con esta tasa, en promedio 0.658 y 1.163 respectivamente, además, ningún extraído de estos dos métodos alcanzó valores cercanos a 1.8. Por otra parte, Ph-Chl resultó ser

el método con mayor pureza en los extraídos, ya que su promedio fue 1.761 y el 78% de los extraídos se encontraron con valores cercanos a 1.8. La tasa 260/230 indica la presencia de contaminantes como carbohidratos, sales y otros residuos de extracción como el fenol cuando sus valores no se encuentran entre 1.8 y 2.2 (Desjardins & Conklin, 2010). Para esta tasa ninguno de los tres métodos de extracción alcanzó en promedio los valores de pureza (1.8 a 2.2). Ph-Chl resultó ser el método de extracción con el valor más alto de la tasa 260/230 (Tabla 2.). A pesar de esto, solo con Ph-Chl se obtuvo que el 31% de los extraídos mostraron valores dentro del rango de pureza para esta tasa, los cuales también mostraron valores cercanos a 1.8 para la tasa 260/280 (Anexo 12.). No se incluyeron las mediciones de pureza de los extraídos de Pinedo-Castro (2017) y Ruíz-García y colaboradores (2018) de modo que la comparación fuese entre extraídos frescos.

### *Amplificación de ADN*

Se logró obtener un total de 55 amplificados. Chelex y Kit resultaron ser los métodos de extracción a partir de los cuales se logró obtener menos amplificados, ya que se obtuvo 2 con Kit (*ATP8* y *AMY*) y uno solo con Chelex (*ATP8*) (Figura 3.). Contrario a esto, Ph-Chl fue el método de extracción a partir del cual se logró obtener más amplificados: 15 para *ATP8*, 9 para *16S*, 4 para *NADH-5* y 1 para *AMY* (Figura 3.). Por otra parte, se obtuvieron 23 amplificados a partir de los extraídos de Ph-Chl de Ruíz-García y colaboradores (2018): 17 para *ATP8*, 5 para *16S* y 1 para *NADH-5* (Figura 3.). Adicionalmente, se logró amplificar estos marcadores para distintas especies (Tabla 4.). Se estandarizó la amplificación para 6 especies con *ATP8* (*L. tigrinus*, *L. colocolo*, *L. jacobita*, *L. pardalis*, *L. geoffroyi* y *L. wiedii*), para 5 especies con *16S* (*L. pardalis*, *L. tigrinus*, *L. geoffroyi*, *L. jacobita* y *L. wiedii*), para 3 especies con *NADH-5* (*L. pardalis*, *L. tigrinus* y *L. colocolo*) y para 2 especies con *AMY* (*L. geoffroyi* y *L. pardalis*).

Las temperaturas de anillamiento a las cuales amplificaron los marcadores no resultaron ser las mismas que las calculadas con la herramienta web Tm calculator (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) (Tabla 1.). Adicionalmente, las temperaturas melting (Tm) de la herramienta web también fueron diferentes a las temperaturas brindadas por el fabricante de los primers (Tabla 1.). El número de ciclos con los que se corrieron las PCR fueron los mismos a los reportados previamente por algunos autores, así como algunas condiciones de los ciclos de PCR (Tabla 1.; Tabla 3.). La temperatura de anillamiento para *ATP8* coincide con la reportada por Napolitano y colaboradores (2014). Se validaron las condiciones de los ciclos de PCR reportadas por Culver y colaboradores (2000)

para la amplificación de *NADH-5*. Las temperaturas utilizadas en la amplificación de *AMY* coinciden en las reportadas por Wultsch y colaboradores (2016) y sólo se aprecian diferencias en los tiempos de denaturación, amplificación y extensión. Por último, las condiciones de los ciclos de PCR para la amplificación de *16S* no coincidieron con condiciones previamente reportadas (Tabla 3.). Se encontró que el marcador amplificó adecuadamente con una temperatura de anillamiento de 59 °C (Tabla 1.).

### *Visualización y sexaje*

Se logró visualizar los 53 amplificados mitocondriales y dos amplificados de *AMY* en gel de agarosa al 2% (Figura 4.). El tamaño de los productos de PCR obtenidos fue entre 300 pb y 400 pb para *16S* y *NADH-5* (Figura 4a; 4b) y aproximadamente 200 pb para *ATP8* y *AMY* (Figura 4c; 4d). Se evidenció diferencias en la calidad de la banda (Figura 4.). Con la cuantificación de ADN de los amplificados se obtuvo en promedio la concentración para una adecuada visualización: *ATP8* (356.235 ng/ $\mu$ l), *16S* (330.415 ng/ $\mu$ l), *NADH-5* (332.246 ng/ $\mu$ l) (Tabla 4.). Debido a que únicamente se logró obtener dos amplificados para *AMY* se tomó como referencia para una adecuada visualización el valor 498.938 ng/ $\mu$ l obtenido para la banda más visible. No se evidenció mayor diferencia en la visualización entre Chelex y Kit, sin embargo, las bandas con mayor intensidad corresponden a extraídos de Ph-Chl. Adicionalmente, muestras frescas como algunas de piel y la de sangre mostraron una buena calidad de la banda (Figura 4.).

Para probar *AMY* para el sexaje se intentó amplificar extraídos de muestras con sexo conocido: dos tigrillos hembra, una hembra ocelote, un tigrillo macho y un gato de Geoffroy macho. De estas muestras únicamente se logró amplificar el marcador para la hembra ocelote y el macho de gato de Geoffroy (Figura 4e.). Se logró visualizar los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, al 1,5%, al 1% y al 0,8%, sin embargo, la visualización no resultó ser la mejor. En el gel al 0,8%, luego de una electroforesis a 150V durante una hora y 30 minutos, se logró la mejor visualización y el sexaje de las dos muestras con un solo producto de PCR para la hembra y dos productos de PCR para el macho (Figura 4e.). Por último, no fue posible enviar a genotipificar a Gencore en la Universidad de Los Andes.

## **DISCUSIÓN**

### *Extracción y cuantificación de ADN*

Las altas concentraciones de ADN obtenidas con Chelex en comparación con otros métodos ya se han documentado anteriormente (Jensen *et al.*, 2003; Al-Griw *et al.*, 2017; Ernanto *et al.*, 2018). Chelex ha mostrado mayor cantidad de material genético extraído de muestras en comparación a métodos que incluyen la extracción orgánica Ph-Chl (Jensen *et al.*, 2003; Ernanto *et al.*, 2018) y en comparación con los Kits comerciales (Al-Griw *et al.*, 2017), lo cual concuerda con el promedio más alto de concentración obtenido para Chelex (Figura 2.). Ph-Chl ofrece una mayor cantidad de ADN en comparación a Kits de extracción comerciales (Janabi *et al.*, 2016; Yalçinkaya *et al.*, 2017). Factores como el tipo de muestra, la cantidad de muestra, que tan fresca es la muestra, el tiempo de incubación y las diluciones en los protocolos de Kit podrían influir en la cantidad de ADN recuperado. Por ejemplo, a partir de muestras frescas con distinta cantidad de ADN, Kits comerciales de extracción pueden extraer una mayor cantidad de material genético que otros métodos como el Chelex (Ip *et al.*, 2015).

#### *Pureza del ADN extraído*

Contrario a las bajas tasas de pureza obtenidas con Kit (Tabla 2.), este tipo de extracción suele caracterizarse por una alta pureza en sus extraídos (Janabi *et al.*, 2016; Al-Griw *et al.*, 2017), incluso para el Kit “DNeasy blood & tissue” (Quiagen, Inc., Hilden, Alemania) utilizado (Yalçinkaya *et al.*, 2017). Estos extraídos con baja pureza con kit pueden deberse a la cantidad de reactivo utilizado para la preparación del EDTA 0.5M para nivelar su pH a 7.5, lo cual pudo contribuir a la formación de sales y una baja tasa 260/230 como la obtenida (Tabla 2.). Las extracciones con Ph-Chl se caracterizan por una alta pureza (Dairawan & Shetty, 2020) y se han reportado valores para las tasas 260/280 y 260/230 dentro de los rangos estimados para extractos puros de ADN (Yalçinkaya *et al.*, 2017; Ernanto *et al.*, 2018). Los valores obtenidos para dichas tasas corroboran lo reportado en literatura, sin embargo, este método debe optimizarse para este tipo de extracción de modo que se obtengan extraídos con mayor calidad y tasas de pureza. Por último, la gran cantidad de ADN recuperado y facilidad de extracción con Chelex se contrarresta por la gran cantidad de contaminantes presentes en los extraídos (Al-Griw *et al.*, 2017; Ernanto *et al.*, 2018; Dairawan & Shetty, 2020) tal como se observó en los valores obtenidos para las tasas de pureza (Tabla 2.).

#### *Amplificación de ADN*

La inhibición de la PCR puede darse por la presencia de algunos contaminantes o residuos de extracción, como el Chelex y algunos iones que impiden la interacción de la polimerasa o degradan el ADN (Schrader *et al.*, 2012; Dairawan & Shetty, 2020). Debido a la gran cantidad de contaminantes es probable

que se inhibieran las PCR con Chelex y Kit, por lo que es necesario optimizar la extracción con estos dos métodos. Sin embargo, las amplificaciones de extraídos hechos con Kit pueden no haber sido exitosas debido a la baja cantidad de ADN, para lo cual se podrían preparar PCR de 50  $\mu$ l (Ruíz-García *et al.*, 2018) e incluso de 75  $\mu$ l (Trigo *et al.*, 2008). Ph-Chl resulta ser un método muy bueno en cuestión calidad-precio para la extracción y posterior amplificación de fragmentos, sin embargo, la naturaleza tóxica para el ser humano resulta ser la gran limitación para este método (Dairawan & Shetty, 2020). Las diferencias entre la cantidad de amplificadores obtenidos para los 4 marcadores se debe a la longitud de los fragmentos y el tipo de marcador molecular. A menor tamaño del fragmento hay un mayor éxito en la amplificación (Broquet *et al.*, 2007), lo cual explica el mayor número de amplificadores para *ATP8* con respecto a los demás marcadores.

La temperatura de anillamiento suele encontrarse 5°C en torno la  $T_m$  (Fernández *et al.*, 2013), lo cual explica la cercanía de las temperaturas para la amplificación de los marcadores con las  $T_m$  de los primers (Tabla 1.). Puntualmente, para *I6S* la temperatura de anillamiento es menor a la  $T_m$  del primer reverso de este marcador (Tabla 1.), por lo que está dentro del rango de 5°C por debajo de la  $T_m$ . Tomando en cuenta las coincidencias con las temperaturas de anillamiento a las cuales se logró amplificar los marcadores (Tabla 1.) y sus coincidencias con algunas de las reportadas en literatura (Tabla 3.) se validan dichos protocolos previamente reportados (Culver *et al.*, 2000; Napolitano *et al.*, 2014; Wulsch *et al.*, 2016). Sin embargo, la diferencia con la temperatura de anillamiento observada para *I6S* (59 °C) y las reportadas en literatura (Tabla 3.) pueden deberse a factores como los reactivos y los equipos utilizados por los distintos autores y en el presente trabajo de grado para la amplificación del marcador. Teniendo en cuenta que las temperaturas de anillamiento para cada marcador (Tabla 1.) no generaron bandas inespecíficas, estas son lo suficientemente altas para aumentar la especificidad sin llegar a inhibir la amplificación (Fernández *et al.*, 2013).

Por último, con estas condiciones se estandariza la amplificación para el Laboratorio de Genética de Poblaciones, Biología Molecular y Evolutiva (LGPBME) de los cuatro marcadores trabajados para las diferentes especies del género *Leopardus*, validando los primers para la amplificación de *ATP8*, *I6S* y *NADH-5* (Hoelzel & Green, 1992; Johnson *et al.*, 1998) para *L. colocolo*, *L. geoffroyi*, *L. jacobita* y las trabajadas anteriormente por Pinedo-Castro (2017) y Ruíz-García y colaboradores (2018), lo cual permite aumentar el número de secuencias. Sin embargo, se recomienda terminar la extracción de las muestras de hueso para así probar las condiciones previamente comentadas con *L. braccatus*, *L. pajeros*, *L. guigna* y *H. yagouaroundi*. Con este trabajo de grado se validan los primers de *AMY* (Pilgrim *et al.*, 2005) para

*L. geoffroyi* además de *L. guigna* (Napolitano *et al.*, 2015) y *L. pardalis* (Wultsch *et al.*, 2016), sin embargo, resulta necesario ampliar el número de especies trabajadas con este par de primers.

### *Visualización y sexaje*

El gel de agarosa al 2% es adecuado para separar fragmentos entre 60 pb y 2,5 kb y a mayor concentración de agarosa se logran separar fragmentos más pequeños de ADN (Fierro, 2014). Adicionalmente, la concentración de los agentes intercalantes también afecta la visualización, si esta es muy baja no se logran ver las bandas y si esta es muy alta no se alcanza a apreciar el suficiente contraste con el gel para ver la banda (Adkins & Burmeister, 1996). Tomando en cuenta el tiempo de corrida de la electroforesis para el sexaje (90 minutos), el bromuro pudo haberse inactivado por incidencia de luz o disuelto en el buffer, lo cual puede explicar la baja calidad de las bandas obtenidas y la mala visualización del marcador de peso. Dicho esto, resulta necesario optimizar la visualización para realizar adecuadamente el sexaje y probar mayores concentraciones de agarosa en el gel para separar estos fragmentos pequeños (Weikard *et al.*, 2006; Fierro, 2014). Por ejemplo, Kumar y colaboradores (2015) lograron sexar individuos del Panda Rojo (*Ailurus fulgens*) en donde la diferencia entre los fragmentos es menor a 20pb. Por otra parte, la concentración de ADN también resulta ser importante en la visualización de las bandas ya que a una concentración muy baja la banda no se ve o resulta ser muy tenue y a concentraciones muy altas esta se pierde (Hadrys *et al.*, 1992). Sin embargo, no hubo mayor diferencia entre la concentración de los amplificados como para evidenciar una relación, por lo que otros factores como qué tan fresca es la muestra pueden estar influyendo en la visualización. Consecuentemente, se recomienda implementar cambios en la preparación del gel agregando bromuro de etidio directamente y no en la electroforesis o aumentando la concentración del agente intercalante. Adicionalmente, se recomienda validar el sexaje no solo con muestras de sexo conocido sino también mediante técnicas de genotipificado como la corrida de fragmentos, de modo que se tenga total certeza del sexo de los individuos y puedan corregirse problemas en la interpretación de las bandas relacionados con la visualización.

## **CONCLUSIÓN**

Se validaron las condiciones de PCR reportadas en literatura para *ATP8* (Napolitano *et al.*, 2014), *NADH-5* (Culver *et al.*, 2000) y se estandarizaron las condiciones para *16S* para el Laboratorio de Genética de Poblaciones, Biología Molecular y Evolutiva (LGPBME) para *L. colocolo*, *L. jacobita* y *L. geoffroyi*.

Se obtuvo un total de 23 amplificados para las nuevas especies trabajadas y 30 para *L. pardalis*, *L. tigrinus* y *L. wiedii*.

Se validaron las condiciones de PCR reportadas en literatura para *AMY* (Wultsch *et al.*, 2016) en *L. pardalis* y se obtuvo un amplificado para una nueva especie de felino neotropical (*L. geoffroyi*).

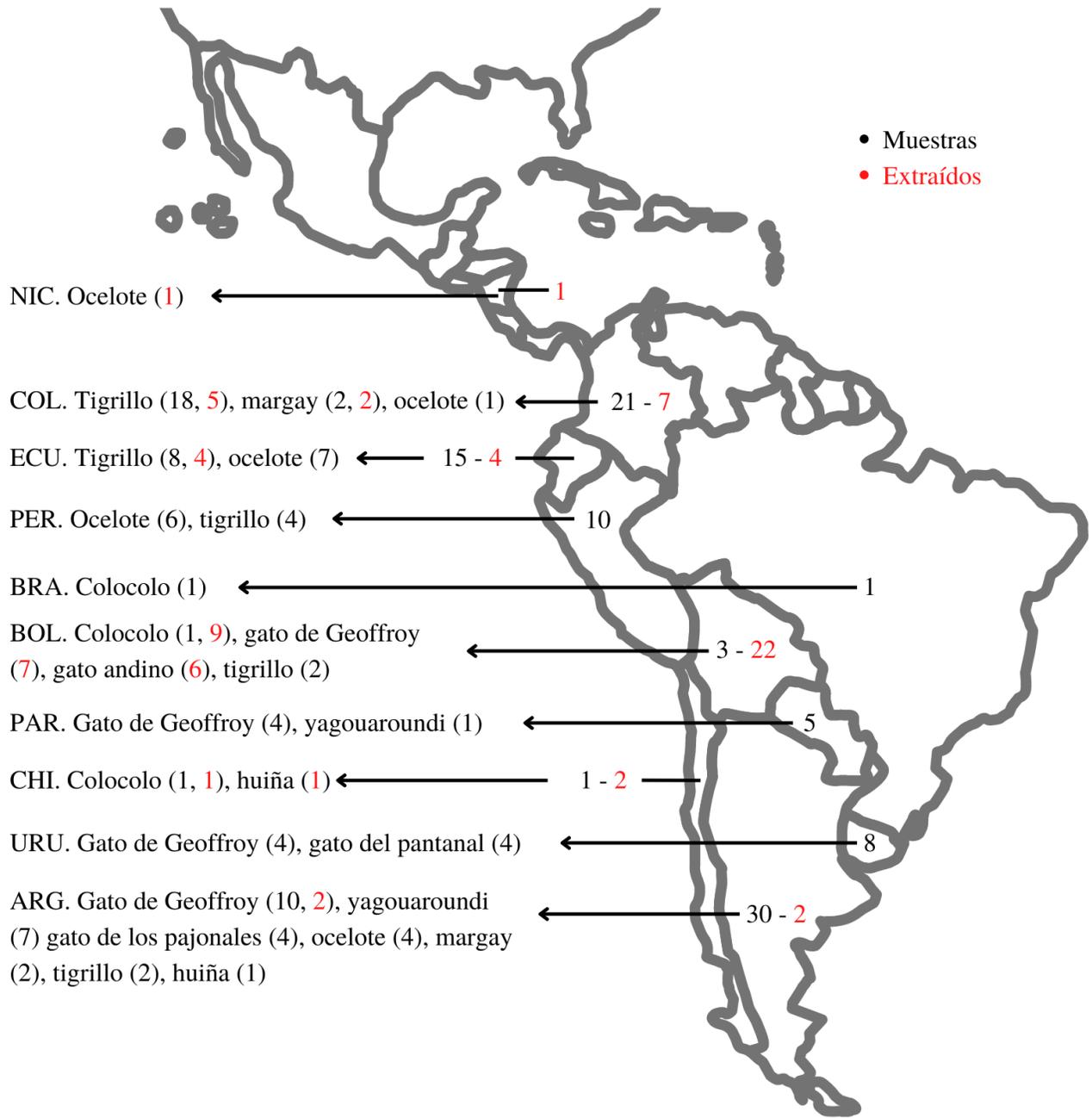
Fenol-cloroformo fue el mejor método de extracción y a partir del cual se pudieron amplificar en mayor medida los marcadores, seguido por Kit y Chelex.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Doctora Myreya Pinedo Castro por el apoyo, su guía constante y la confianza depositada. Gracias a la Pontificia Universidad Javeriana y al Laboratorio de Genética de Poblaciones, Biología Molecular y Evolutiva (LGPBME) por los recursos y espacios necesarios para llevar a cabo este trabajo de grado. Un agradecimiento especial a Katherin Niño, Elizabeth Pérez, Andrea Martínez, Jaime Ramírez, Laura Rincón y Daniel García por su colaboración y apoyo en los momentos precisos. Gracias a mis compañeros de laboratorio, Daniela Paz y Jacobo Pinto, por la compañía en las largas jornadas de trabajo y los momentos agradables durante las mismas. Gracias a mi familia y amigos por su apoyo constante.

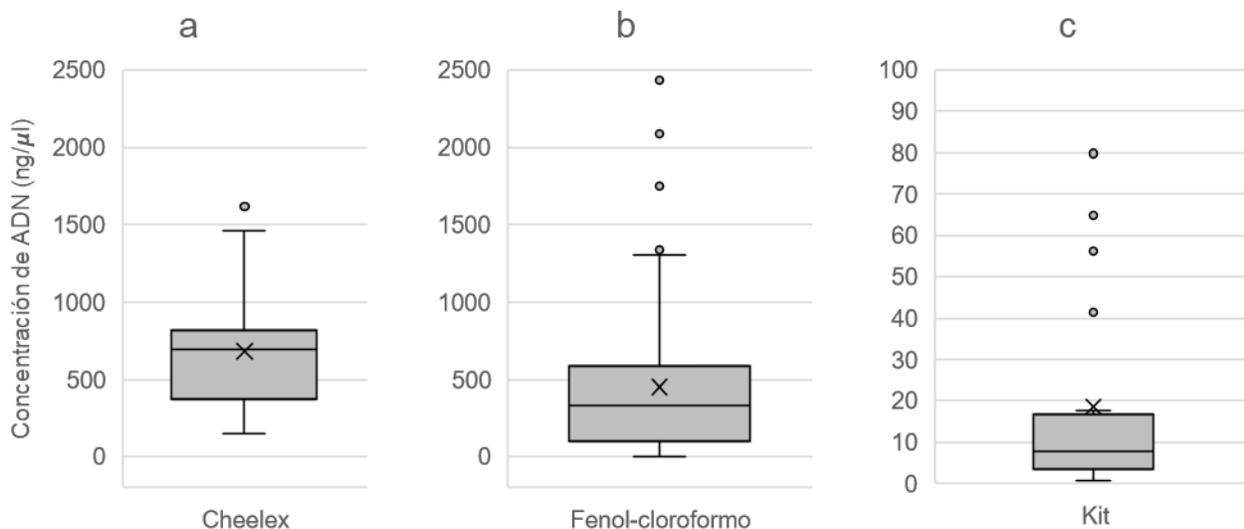
## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Procedencia de muestras y extraídos de felinos neotropicales.**



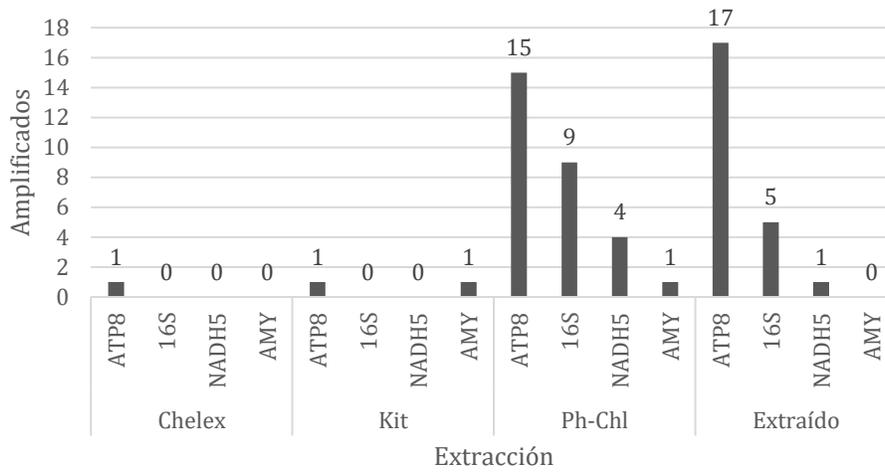
**Figura 1. Procedencia de muestras y extraídos de felinos neotropicales.** Se muestra el total de muestras y extraídos del país dentro de su área geográfica. Con una flecha se desglosa el número de muestras por especie precedidos por el indicativo del país: Argentina (ARG), Bolivia (BOL), Brasil (BRA), Chile (CHI), Colombia (COL), Ecuador (ECU), Nicaragua (NIC), Paraguay (PAR), Perú (PER) y Uruguay (URU). El color negro refleja el número de muestras y el rojo el número de extraídos.

**Anexo 2. Concentración de ADN por método de extracción.**



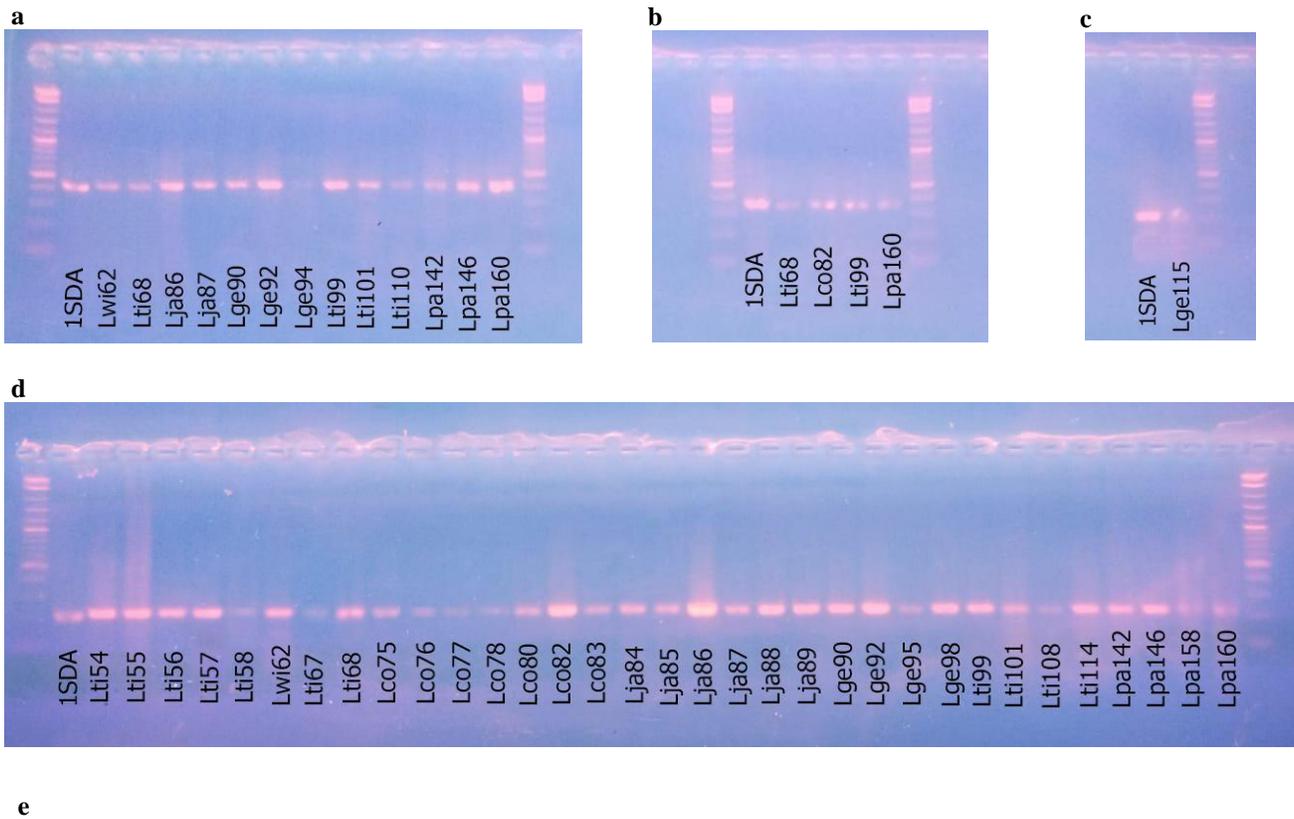
**Figura 2. Concentración de ADN por método de extracción.** Se muestran gráficos de caja y bigotes que muestran las diferencias en la concentración de ADN obtenida a partir de los diferentes métodos de extracción trabajados. La X en los gráficos representa el valor promedio obtenido para la concentración para el conjunto de muestras procesadas con cada tipo de extracción. a) Chelex (X=680.106 ng/μl). b) Ph-Chl (X=521.812 ng/μl). c) Kit (X=18.644 ng/μl)

**Anexo 3. Número de amplificadas para cada marcador por tipo de extracción.**



**Figura 3. Número de amplificados para cada marcador por tipo de extracción.** Se muestra un gráfico de barras con el número de amplificados obtenidos para cada marcador y por cada tipo de extracción.

#### Anexo 4. Visualización de amplificados y sexaje en gel de agarosa





**Figura 4. Visualización de amplificadores y sexaje en gel de agarosa.** a) Amplificados obtenidos para *16S* en gel 2%. b) Amplificados obtenidos para *NADH-5* en gel 2%. c) Amplificados obtenidos para *AMY* en gel 2%. d) Amplificados obtenidos para *ATP8* en gel 2%. e) Amplificados y sexaje con *AMY* en gel 0.8%. Debajo de las bandas se muestra el indicador de la muestra o extraído del que se amplificó.

## Anexo 5. Volumen y temperaturas ( $T_m$ y anillamiento) para cada set de primer y condiciones de PCR.

**Tabla 1. Volumen y temperaturas ( $T_m$  y anillamiento) para cada set de primer y condiciones de PCR.** Las temperaturas dadas por el fabricante y calculadas con la calculadora web se encuentran en  $^{\circ}\text{C}$  La medida del volumen de agua para reconstituir los primers a 100pM son  $\mu\text{l}$ . Se muestran las condiciones de los ciclos para la amplificación de los marcadores y la longitud esperada del fragmento amplificado.

| Marcador      | Fabricante      |                    |      | Tm calculator |      | PCR    |             |             |             | Longitud Fragmento (pb) |
|---------------|-----------------|--------------------|------|---------------|------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
|               | Primer          | V H <sub>2</sub> O | Tm   | Tm            | Ta   | Ciclos | Td          | Ta          | Te          |                         |
| <i>ATP8</i>   | <i>ATP8-1F</i>  | 300                | 48.4 | 50.5          | 50.5 | 35     | 95<br>(30s) | 55<br>(30s) | 72<br>(30s) | 181                     |
|               | <i>ATP8-2R</i>  |                    | 54.6 | 53.2          |      |        |             |             |             |                         |
| <i>16S</i>    | <i>16S-1F</i>   | 300                | 53.4 | 51.7          | 51.7 | 35     | 95<br>(35s) | 59<br>(30s) | 72<br>(45s) | 364                     |
|               | <i>16S-4R</i>   |                    | 59.7 | 56.6          |      |        |             |             |             |                         |
| <i>NADH-5</i> | <i>ND5-1F</i>   | 320                | 50.6 | 49.3          | 45.5 | 35     | 94<br>(30s) | 49<br>(90s) | 72<br>(60s) | 350                     |
|               | <i>ND5-2R</i>   |                    | 47.3 | 45.5          |      |        |             |             |             |                         |
| <i>AMY</i>    | <i>AMELY-2F</i> | 280                | 51.8 | 53.4          | 53.4 | 45     | 94<br>(60s) | 50<br>(30s) | 72<br>(30s) | 194 - 214               |
|               | <i>AMELY-2R</i> |                    | 57.7 | 54.8          |      |        |             |             |             |                         |

## Anexo 6. Contaminantes en los extraídos por método de extracción.

**Tabla 2. Contaminantes en los extraídos por método de extracción.** Se tienen los valores del tamaño muestral (n) y para el promedio (Prom), máximo (Max), mínimo (Min) y desviación estándar (s) para las dos tasas de pureza medidas para Chelex, Fenol-Cloroformo (Ph-Chl) y Kit. En la columna de pureza se muestra el porcentaje de muestras que alcanzaron

valores que indican pureza acorde a cada tasa.

| Extracción    | n  | 260/280 |      |      |       |        | 260/230 |      |      |       |        |
|---------------|----|---------|------|------|-------|--------|---------|------|------|-------|--------|
|               |    | Prom    | Max  | Min  | s     | Pureza | Prom    | Max  | Min  | s     | Pureza |
| <b>Chelex</b> | 14 | 0.658   | 1.67 | 0.4  | 0.289 | 0%     | 0.368   | 0.83 | 0.19 | 0.141 | 0%     |
| <b>Ph-Chl</b> | 80 | 1.761   | 1.99 | 1    | 0.323 | 78%    | 1.643   | 6.16 | 0.31 | 0.111 | 31%    |
| <b>Kit</b>    | 18 | 1.163   | 1.67 | 0.43 | 0.141 | 0%     | 0.224   | 0.44 | 0.04 | 0.764 | 0%     |

### Anexo 7. Condiciones de los ciclos de PCR para los marcadores reportados en literatura.

**Tabla 3. Condiciones de los ciclos de PCR para los marcadores reportados en literatura.** Se muestran los marcadores en método de PCR utilizados, el número de ciclos y las temperaturas (denaturación (D), anillamiento (A) y extensión (E)) con su respectivo tiempo según cada autor. \* se usa para indicar que *ATP8* solo fue amplificado por Trigo y colaboradores (2008)

| Marcador                     | PCR       | Condiciones Ciclo |   | Autor                          |
|------------------------------|-----------|-------------------|---|--------------------------------|
|                              |           | Ciclos            | Temperaturas                                      |                                |
| <i>ATP8, 16S, NADH-5</i>     | Normal    | 30                | D (1min; 92°C), A (1min; 48°C), E (1min; 72°C)    | Johnson et al., 1998; 1999     |
| <i>ATP8, 16S, NADH-5</i>     | Normal    | 30                | D (30s; 94°C), A (1,5min; 49°C), E (1min; 72°C)   | Culver <i>et al.</i> , 2000    |
| <i>ATP8*</i> , <i>NADH-5</i> | Touchdown | 10                | D (45s; 94°C), A (45s; 60-51°C), E (1,5min; 72°C) | Trigo et al., 2008; 2013; 2014 |
|                              |           | 30-35             | D (45s; 94°C), A (45s; 50°C), E (1,5min; 72°C)    |                                |
| <i>ATP8, 16S, NADH-5</i>     | Normal    | 35                | D (1min; 94°C), A (1min; 53-55°C), E (1min; 72°C) | Napolitano et al., 2014; 2015  |
| <i>ATP8, 16S, NADH-5</i>     | Normal    | 45                | D (30s; 94°C), A (30s; 57°C)                      | Pinedo-Castro. 2017            |
| <i>ATP8, 16S</i>             | Normal    | 35                | D (1min; 92°C), A                                 | Ruíz-García et al.,            |

|     |           |       |   |                      |
|-----|-----------|-------|---|----------------------|
|     |           |       | (1min; 48°C), E<br>(1min; 72°C)                       | 2018                 |
| AMY | Normal    | 29-45 | D (1min; 94°C), A<br>(1min; 51°C), E (30s;<br>72°C)   | Pilgrim et al., 2005 |
| AMY | Touchdown | 13    | D (30s; 94°C), A<br>(1,5min; 60-51°C), E<br>(1; 72°C) | Wultsch et al., 2016 |
|     |           | 30    | D (30s; 94°C), A<br>(1,5min; 50°C), E<br>(1min; 72°C) |                      |

### Anexo 8. Amplificados obtenidos por marcador y especie.

**Tabla 4. Amplificados obtenidos por marcador y especie.** Se muestra por marcador el número de muestras obtenidas para cada especie, el total y el promedio de concentración de ADN de los amplificados para una buena visualización.

| Marcador | Amplificados        |       | Concentración ADN<br>(ng/μl) |         |
|----------|---------------------|-------|------------------------------|---------|
|          | Especies            | Total |                              |         |
| ATP8     | <i>L. colocolo</i>  | 7     | 34                           | 356.235 |
|          | <i>L. geoffroyi</i> | 4     |                              |         |
|          | <i>L. jacobita</i>  | 6     |                              |         |
|          | <i>L. pardalis</i>  | 5     |                              |         |
|          | <i>L. tigrinus</i>  | 11    |                              |         |
|          | <i>L. wiedii</i>    | 1     |                              |         |
| 16S      | <i>L. geoffroyi</i> | 3     | 14                           | 330.415 |
|          | <i>L. jacobita</i>  | 2     |                              |         |
|          | <i>L. pardalis</i>  | 4     |                              |         |
|          | <i>L. tigrinus</i>  | 4     |                              |         |
|          | <i>L. wiedii</i>    | 1     |                              |         |
| NADH-5   | <i>L. colocolo</i>  | 1     | 5                            | 332.246 |
|          | <i>L. pardalis</i>  | 2     |                              |         |
|          | <i>L. tigrinus</i>  | 2     |                              |         |
| AMY      | <i>L. geoffroyi</i> | 1     | 2                            | 498.938 |

|  |                    |   |  |  |
|--|--------------------|---|--|--|
|  | <i>L. pardalis</i> | 1 |  |  |
|--|--------------------|---|--|--|

#### **Anexo 9. Protocolo de extracción estándar de resina quelante Chelex-100 (Wash *et al.*, 1991)**

1. Adicionar a cada muestra 200 µL de Chelex, 10 µL de Proteinasa K y 20 µL de DTT. Dejar que la muestra se precipite y rectificar que el Chelex cubra la muestra.
2. Dejar en baño maría toda la noche a 56 °C, asegurándose de que los pelos queden dentro de la solución. Durante el día sacar y realizar vortex cada 2 horas durante 20-30 segundos.

*Se recomienda observar la desaparición del pelo después de tres días como resultado de su digestión y si no ocurre se debe añadir más Proteinasa (10 µL) y Ditiotreitól (20 µL).*

1. Una vez digerida la muestra, colocar en ebullición por 8 minutos exactos en un beaker de 1000 mL con 300 mL agua hervida o de la llave. Depositar los tubos de base cónica en barcos, cuando el agua esté en ebullición.
2. Realizar vortex durante 20-30 segundos.
3. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos.
4. Conservar en la nevera a 4 °C.

#### **Anexo 10. Protocolo de extracción de hueso y uña con Kit “DNeasy blood & tissue” (Quiagen, Inc., Hilden, Alemania)**

Disponible online para uña (<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=a5a065dc-e287-4a61-b917-9792e25ab42f&lang=en>) y hueso compacto (<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=bd4e7285-9329-4158-9207-d37427a60940&lang=en>) (Quiagen, Inc., Hilden, Alemania).

#### **Anexo 11. Composición de los buffer de lisis para piel y sangre para 50ml.**

Buffer de lisis piel:

TRIS HCl 50 mM pH 7.5 = 2.5 ml

EDTA 1mM pH 8 = 0.1 ml

NaCl 100mM = 1 ml

SDS 1% = 2.5 ml

Água destilada estéril = 43.9 ml

Buffer de lisis sangre:

TRIS HCl 10 mM pH 7.5 = 0.5 ml

EDTA 10mM pH 8 = 1 ml

NaCl 50mM = 0.5 ml

SDS 2% = 5 ml

Água destilada estéril = 43 ml

**Anexo 12. Material suplementario extracción y amplificación.**

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1iAuO5YFhp1oCOpMwxquyaJq3Dd5qCY7V/edit?usp=sharing&oid=113853542170515045248&rtpof=true&sd=true>

**Referencias**

Abbott, R. J., Barton, N. H., & Good, J. M. (2016). Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Molecular ecology*.

Adavoudi, R., & Pilot, M. (2021). Consequences of hybridization in mammals: A systematic review. *Genes*, 13(1), 50.

Adkins, S., & Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating-colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical biochemistry*, 240(1), 17-23.

Al-Griw, H. H., Zraba, Z. A., Al-Muntaser, S. K., Draid, M. M., Zaidi, A. M., Tabagh, R. M., & Al-Griw, M. A. (2017). Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: A comparison of recovery methods. *Open veterinary journal*, 7(3), 239-243.

Allio, R., Donega, S., Galtier, N., & Nabholz, B. (2017). Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker. *Molecular biology and evolution*, 34(11), 2762-2772.

An, J., Lee, M. Y., Min, M. S., Lee, M. H., & Lee, H. (2007). A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. *Forensic science international*, 167(1), 59-61.

Avise, J. C. (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9(3), 686-690.

Broquet, T., Ménard, N., & Petit, E. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics*, 8(1), 249-260.

Culver, M., Johnson, W. E., Pecon-Slattery, J., & O'Brien, S. J. (2000). Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity*, 91(3), 186-197.

Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). The evolution of DNA extraction methods. *American Journal of Biomedical Science and Research*, 8(1), 39-46.

Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.

Do Nascimento, F. O. D. (2014). On the morphological variation and taxonomy of the Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844)(Carnivora, Felidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 54(11), 129-160.

Do Nascimento, F. O., & Feijó, A. (2017). Taxonomic revision of the tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) species group (Carnivora, Felidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57, 231-264.

Do Nascimento, F. O. D., Cheng, J., & Feijó, A. (2021). Taxonomic revision of the pampas cat *Leopardus colocolo* complex (Carnivora: Felidae): an integrative approach. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 191(2), 575-611.

Ennis, S., & Gallagher, T. F. (1994). A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, 25(6), 425-427.

Ernanto, A. R., Afifah, D., Lesmana, I., & Daryono, B. S. (2018, August). Isolation of DNA from chicken (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) feather with lysis buffer-phenol chloroform isoamyl alcohol method (PCI) and chelex method. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2002, No. 1, p. 020002). AIP Publishing LLC.

Fernández, J. H., Acevedo, K. O., Beltran, G., & Daza, L. A. (2013). Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezona (*Caretta caretta*) y Carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe colombiano. *Revista Mutis*, 3(2), 21-30.

Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.

Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, 1(1), 55-63.

Hoelzel, A. R., & Green, A. (1992). Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In AR Hoelzel (Ed.) *Molecular genetic analysis of populations a practical approach*.

Ip, S. C., Lin, S. W., & Lai, K. M. (2015). An evaluation of the performance of five extraction methods: chelex® 100, QIAamp® DNA blood mini kit, QIAamp® DNA investigator kit, QIASymphony® DNA Investigator® kit and DNA IQ™. *Science & Justice*, 55(3), 200-208.

Janabi, A. H., Kerkhof, L. J., McGuinness, L. R., Biddle, A. S., & McKeever, K. H. (2016). Comparison of a modified phenol/chloroform and commercial-kit methods for extracting DNA from horse fecal material. *Journal of microbiological methods*, 129, 14-19.

Jensen, T., Pernasetti, F. M., & Durrant, B. (2003). Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 22(6), 561-571.

Johnson WE, Culver M, Iriarte JA, Eizirik E, Seymour KL, O'Brien SJ. 1998. Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *J Hered.* 89:227–232

Johnson, W. E., Slattery, J. P., Eizirik, E., Kim, J. H., Menotti Raymond, M., Bonacic, C., ... & O'Brien, S. J. (1999). Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology*, 8, S79-S94.

Kitchener, A. C., Breitenmoser-Würsten, C., Eizirik, E., Gentry, A., Werdelin, L., Wilting, A., ... & Tobe, S. (2017). A revised taxonomy of the Felidae: The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN Cat Specialist Group. *Cat News*.

Kumar, A., Roka, B., Rai, U., & Reddy, P. A. (2015). Molecular sex identification of red panda (*Ailurus fulgens*) suitable for noninvasive genetic studies. *European journal of wildlife research*, 61(4), 641-644.

Li, G., Davis, B. W., Eizirik, E., & Murphy, W. J. (2016). Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae). *Genome research*, 26(1), 1-11.

Lynch, M., Koskella, B., & Schaack, S. (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311(5768), 1727-1730.

Miotto, R. A., Cervini, M., Figueiredo, M. G., Begotti, R. A., & Galetti, P. M. (2011). Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics*, 12(6), 1447-1455.

Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in ecology & evolution*, 9(10), 373-375.

Napolitano, C., Johnson, W. E., Sanderson, J., O'Brien, S. J., Rus Hoelzel, A., Freer, R., ... & Poulin, E. (2014). Phylogeography and population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid. *Conservation Genetics*, 15(3), 631-653.

Napolitano, C., Díaz, D., Sanderson, J., Johnson, W. E., Ritland, K., Ritland, C. E., & Poulin, E. (2015). Reduced genetic diversity and increased dispersal in Guigna (*Leopardus guigna*) in Chilean fragmented landscapes. *Journal of Heredity*, 106(S1), 522-536.

Nardelli, M., & Túnez, J. I. (Eds.). (2021). *Molecular Ecology and Conservation Genetics of Neotropical Mammals*. Springer International Publishing.

Pilgrim, K. L., McKelvey, K. S., Riddle, A. E., & Schwartz, M. K. (2005). Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 60-61.

Pinedo Castro, M. O. Z. Filogeografía comparativa de cinco taxones de felinos neotropicales (Jaguar, *Panthera onca*; Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*; Ocelote, *Leopardus pardalis*; Margay, *Leopardus wiedii* y el complejo de especies de tigrillos; Felidae, Carnivora, Mammalia) mediante análisis del ADN mitocondrial.

Rodríguez Prieto, A. (2013). Filogenia, morfometría y especiación de dos topillos ibéricos: *Microtus duodecimcostatus* y *Microtus lusitanicus*.

Ruiz-García, M., Pinedo-Castro, M., & Shostell, J. M. (2018a). Small spotted bodies with multiple specific mitochondrial DNAs: existence of diverse and differentiated tigrina lineages or species (*Leopardus* spp: Felidae, Mammalia) throughout Latin America. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(7), 993-1014.

Ruiz-García, M., Pinedo-Castro, M., & Shostell, J. M. (2018b). Mitogenomics of the jaguarundi (*Puma yagouaroundi*, Felidae, Carnivora): disagreement between morphological subspecies and molecular data. *Mammalian Biology*, 93, 153-168.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. V1. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Saiki, R. K. (1989). The design and optimization of the PCR. In *PCR technology* (pp. 7-16). Palgrave Macmillan, London.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014-1026.

Stellwagen, N. C. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, 30(S1), S188-S195.

Struck, T. H., & Cerca De Oliveira, J. (2019). Cryptic species and their evolutionary significance. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.

Trigo, T. C., Freitas, T. R. O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J. C. R., Johnson, W. E., ... & Eizirik, E. (2008). Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*, 17(19), 4317-4333.

Trigo, T., Schneider, A., Lehueur, L., Silveira, L., Freitas, T. O., & Eizirik, E. (2013). Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. *Current Biology*, *23*(24), 2528-2533.

Trigo, T. C., Tirelli, F. P., de Freitas, T. R., & Eizirik, E. (2014). Comparative assessment of genetic and morphological variation at an extensive hybrid zone between two wild cats in southern Brazil. *PloS one*, *9*(9), e108469.

Trindade, F. J., Rodrigues, M. R., Figueiró, H. V., Li, G., Murphy, W. J., & Eizirik, E. (2021). Genome-wide SNPs clarify a complex radiation and support recognition of an additional cat species. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(11), 4987-4991.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 10:506–513.

Weikard, R., Pitra, C., & Kühn, C. (2006). Amelogenin cross-amplification in the family Bovidae and its application for sex determination. *Molecular reproduction and development*, *73*(10), 1333-1337.

Wulsch, C., Waits, L. P., & Kelly, M. J. (2016). A comparative analysis of genetic diversity and structure in jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*) in fragmented landscapes of a critical Mesoamerican linkage zone. *PloS one*, *11*(3), e0151043.

Yalçınkaya, B., Yumbul, E., Mozioglu, E., & Akgoz, M. (2017). Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chemistry*, *221*, 1253-1257.