

Estandarización de un protocolo de extracción de ADN en pieles del Pecari de collar silvestre (*Pecari tajacu* Linnaeus 1758)

Martha Rengifo^{1,2,3,*}, Jorge Rodríguez¹, Juan Agapito², José Espinoza¹

¹Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430. Urb. Ingeniería. San Martín de Porras. Lima, Perú

²Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

³Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Almirante Grau 1072, Iquitos, Perú

Resumen

La Ley Forestal y de Fauna Silvestre en el Perú, permite la caza de subsistencia de la fauna silvestre para autoconsumo y el comercio de pieles por las comunidades locales. Estas pieles son secadas en la modalidad de seco dulce y luego almacenadas en las viviendas de los pobladores hasta su comercialización. Por lo tanto, son altamente manipuladas y expuestas a efectos ambientales diversos. En el estudio se recolectó 300 muestras de pieles, procedentes de tres cuencas de ríos (Amazonas, Napo y Pacaya-Samiria) y se estandarizó un protocolo de extracción del ADN para pieles de Pecari, evaluándose dos métodos de extracción de ADN (Fenol-Cloroformo - Alcohol isoamílico y por columna). Se logró cuantificar el ADN con valores entre 164 y 3461 ng/μL obtenido por el Fenol-Cloroformo - Alcohol isoamílico. Asimismo, se estandarizó un protocolo de PCR para evaluar la eficiencia del ADN obtenido, logrando una amplificación de 1,325 bp para la región control del ADNmt de *Pecari tajacu* a partir de una secuencia heteróloga propuesta para *Sus scrofa* (cerdo doméstico). Finalmente, se demostró que el protocolo aplicado para extraer el ADN fue eficiente y se constituye en una herramienta para el conocimiento del estado genético de la especie y el comercio ilegal del recurso.

Palabras claves: *Pecari tajacu*, ADNmt, protocolo, extracción, PCR

Standardization of a DNA extraction protocol from in skins of hunted collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus 1758)

Abstract

The Forestry and Wildlife Law in Peru, allows subsistence hunting of wildlife for feeding and fur trade by local communities. These skins are dried by "sweet dry" process and then stored in villagers's homes until trade. Skins are highly manipulated and exposed to harsh environmental conditions. In this study 300 skin samples were collected from three river basins (Amazon, Napo and Pacaya-Samiria) and a DNA extraction protocol for Pecari skins was standardized and two methods of DNA extraction (phenol-chloroform - isamyl alcohol and column) were evaluated. The quantification of DNA was possible, obtaining values between 164 and 3461 ng/μL obtained by phenol-chloroform - isoamyl alcohol. Also, a PCR protocol was standardized to evaluate the efficiency of obtained DNA, achieving an amplification of 1,325 bp for the *Pecari tajacu* mtDNA control region from a heterologous sequence proposed for *Sus scrofa* (domestic pig). Finally, it was shown that the protocol applied to extract DNA was efficient and constitutes a tool for understanding the genetic status of the species and illegal trade resource.

Keywords: *Pecari tajacu*, protocol, extraction, PCR, mtDNA

1. Introducción

En la actualidad, dentro del Pecari existen tres especies (Tayasuidos) de los cuales el "sajino" o "pecari de collar" (*Pecari tajacu*, Linnaeus 1758) es la más pequeña (aproximadamente con 30 a 40 kg) [1]. Tiene una amplia distribución geográfica, que se extiende desde el suroeste de Estados Unidos

de América (Texas y Nuevo México), a lo largo de América Central hasta América del Sur. En Arizona se los encuentra entre los 200 a los 650 msnm en lugares de alta temperatura y evaporación, con escasa precipitación anual [2]. En el Perú se

* Correspondencia autor: martharengifo13@gmail.com

distribuye por todo la bosque lluvioso de la amazonía baja y alta, que varía entre los 112 hasta a 900 msnm. Asimismo, habita los bosques secos del noroeste (Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad) y también en los bosques secos del valle del Marañón y en Puno [3].

Esta especie en el Perú está ubicada en el Apéndice II - vulnerabilidad por presión de cacería y selectividad para el comercio de exportación de piel (Convención Internacional de Tráfico de Especies Silvestres - CITES) [4]. Esta situación se agrava con la deforestación, la agricultura migratoria y el cambio climático, que se pueden traducir en una sobreexplotación de áreas geográficas que podrían diezmar las poblaciones de fauna; a pesar de ser un recurso ancestral que cumple un rol importante en la seguridad alimentaria de la población humana mestiza e indígena de la localidad. Por ejemplo, en la Región Loreto existe una alta demanda de carne (aprox. 13 t de carne/año) [5,6]. Este aspecto obliga al Estado peruano a través del Ministerio de Agricultura, Ministerio del Ambiente apoyados por el Servicio Forestal (SERFOR), a realizar estudios de evaluación en las poblaciones naturales de fauna a nivel de censos, que les permita emitir resoluciones anuales donde se fija la cuota máxima de comercialización de cueros y pieles de fauna silvestre; por ejemplo, para el año 2015 se ha programado la extracción de 25, 379 pecaris para la Región Loreto [7], que en términos de exportación significan ingresos económicos al país. Otro aspecto importante es que existen zonas de la amazonía peruana donde las poblaciones naturales de pecari han sido exterminadas en su totalidad [7] y hasta el momento no se conoce como esas poblaciones han desaparecido [8]. Las hipótesis que tratan de explicar estas desapariciones incluyen migraciones, enfermedades epidémicas, alta mortalidad y sobrecaza [9, 10]. Si esto se observa que sucede en el *Pecari pecari* es muy posible que suceda lo mismo con *Pecari tajacu*.

En resumen, es posible que estemos acelerando el proceso de erosión genética de la especie y perdiendo diversidad [11]. Puesto que actualmente no existe información genética sobre el *Pecari tajacu* en el Perú,

que contribuya a identificar y caracterizar las poblaciones silvestres de manera que se evidencie la diversidad intrapoblacional e interpoblacional, así como, la viabilidad del recurso por áreas geográficas. Por lo que, el problema central que se soluciona y que justifica el presente estudio es haber estandarizado un protocolo de extracción de ADN y de PCR para los estudios genéticos a partir de pieles producto de caza de subsistencia.

2. Metodología

2.1 Área de muestreo

El *Pecari tajacu* está tipificado en el apéndice II del CITES – especie vulnerable por caza, por lo tanto requiere contar estrictamente con los permisos de extracción de material genético expedido por el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), de investigación expedido por Servicio Nacional de Áreas Protegidas (SERNAP), el de colecta y transporte de muestras del Ministerio de Agricultura - Programa Forestal y de Fauna Silvestre y el permiso institucional del Comité Institucional de Ética para Uso de Animales (CCIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Asimismo, se contó con la participación de los propietarios de los almacenes de acopio de pieles de pecari en la ciudad de Iquitos quienes proporcionaron los lugares de acopio, nombre de los acopiadores en las cuencas. Los lugares de muestreo que se tomaron en cuenta para este estudio son: cuenca del amazonas (bajo amazonas), Cuenca del Napo, Cuenca del Pacaya – Samiria.

2.2 Muestra

El mínimo número muestral (N=300) fue calculado por el programa Minsage [12], asumiendo una frecuencia alélica mínima del 1 %, nivel de confianza del 95 % y poblaciones en desequilibrio de Hardy – Weimberg. La muestra, fue obtenida a partir de pieles acopiadas por los pobladores locales en las comunidades y comercializadas en la ciudad de Iquitos en el Perú bajo la modalidad de “seco dulce” (secada al ambiente sin preservantes). Cada muestra fue identificada por el lugar de procedencia (Napo, Amazonas, Pacaya – Samiria). Los fragmentos colectados y etiquetados fueron colocados en una bolsa plástica estéril y

transportadas en un contenedor plástico para su conservación a temperatura ambiente y trasladadas al laboratorio; para este procedimiento no fue necesario la cadena de frío.

2.3 Extracción de ADN

2.3.1. *Extracción de ADN método Fenol – Cloroformo-Alcohol Isoamílico*–protocolo modificado a partir de Wu, Q *et al.* 1995 y Moraes - Barros N. *et al.* 2007 [13, 14].

La muestra de piel (3 cm²) fue recortada y fragmentada en pequeños círculos (5 mm de diámetro) y se seleccionaron aquellos que contenían la mayor cantidad de cerdas. El peso aproximado de cada círculo fue de 0.02 g. Dos de estos círculos se colocaron en tubos de 2 mL. **Fase I:** Hidratación. Se añadió a cada tubo 1 mL de agua ultra pura para PCR y se dejó reposar por 10 minutos, se centrifugó a 12000 rpm/10 minutos (se repitió este proceso por 3 veces), se observó que el tejido alcanzara la hidratación al máximo sin fragmentarse. **Fase II:** Orgánica. Sobre el tejido hiperhidratado se añadió 500 µL de buffer de lisis (tris-HCl 100 mM, Ph 8.5, NaCl 400 mM, EDTA 5mM, SDS 0.5 %) y con ayuda de una espátula se trituró manualmente el tejido hasta lograr un máximo de homogenización, posteriormente se añadió 500 µL de buffer de lisis, se mezcló y se añadió 50 µL de Proteinasa K (1 mg/mL) mezclando nuevamente por inversión. Se incubó en baño María a 60 °C / 48 horas, dejándolos posteriormente a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadió 500 µL de fenol y se homogenizó por 10 segundos (solución lechosa). Se centrifugó a 14000 rpm/5 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril. **Fase III:** A partir de la extracción acuosa, se añadió 500 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó por inversión (10 segundos), se centrifugó a 14000 rpm/ 5 minutos y se transfirió 800 µL del sobrenadante a otro tubo. Al sobrenadante se añadió 800 µL de Isopropanol helado y se dejó en reposo a -20 °C / 1 hora , centrifugándose posteriormente a 5000 rpm/1 min. **Fase IV:** El precipitado se resuspendió con 800 µL de etanol al 70 %, se centrifugó a 14000 rpm / 1 min, se eliminó el sobrenadante y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos a 1

hora. El ADN fue resuspendido en Buffer TE 1X y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

2.3.2. *Extracción de ADN método de Columna – GFI- Tissue DNA extracción Kit. Vivantis*

Preparación de la piel: La muestra de piel (3 cm²) fue recortada y fragmentada en pequeños círculos (5 mm de diámetro). Se aseguró que cada círculo contenga la mayor cantidad de cerdas. Cada círculo pesaba aproximadamente 0.02 g. Se etiquetó 3 tubos de 2 mL y se colocó en cada uno 2 fragmentos redondos. La extracción de ADN se siguió según el protocolo [15], de acuerdo con las condiciones del fabricante.

2.3.4. *Extracción de ADN en muestra de sangre*

Para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se siguió el mismo protocolo referido en el punto 2.3.1 y 2.3.2.

2.4 *Cuantificación de ADN*

La concentración del ADN fue cuantificada mediante espectrofotometría utilizando un equipo (NanoDrop ND 1000) a una absorbancia de 230/260 y 260/280. Todas las muestras fueron diluidas homogéneamente hasta una concentración de 20 ng/µL.

2.5 *Reacción en cadena de la polimerasa- PCR*

Se trabajó con el protocolo de Kim *et al.* 2002 [16] el cual fue modificado en el presente estudio. Se consideró como control positivo DNA extraído de sangre de *Sus scrofa* y de *Pecari tajacu* (método de extracción de columna-Vivantis) y muestras de piel (extracción de ADN a partir del método fenol – cloroformo – alcohol isoamílico). Se utilizaron primer forward 5' CCAAGACTCAAGGAAGGAG3' reverse 5' GCGCGGATACTTGCATGTG 3' región control [12]. Siendo el protocolo de trabajo en un volumen final de 50 µL. Conteniendo ADN 40 ng/µL, Buffer con KCl 1x, Cl₂Mg 2 mM, dNTPs 0.2 mM marca Thermo Scientific, primer forward 0.1 pmol/µL, primer reverse 0.1 pmol/µL, Taq polimerasa 0.2 U. Las condiciones de la reacción en el termociclador (PROFLEX) fue: Inicio de 94 °C / 4 min, seguido de 30

ciclos denaturación 94 °C / 1 min, hibridación a 55.5 °C / 1', extensión de 72 °C/ 1.5 min y finalizando con una extensión de 72 °C / 4 min y en reposo a 4°C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida de TBE 1X al 1 %.

La visualización del producto se evaluó a partir de un marcador de peso molecular de 100 pb (Plus DNA Ladder de Thermo Scientific).

3. Resultados y Discusión

3.1 Eficiencia del método de extracción de ADN

Al comparar la eficiencia de la extracción de ADN a partir de muestras de piel procedente de caza de subsistencia, por el método de columna y Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico, se observó resultado negativo en el método de columna. Sin embargo, el resultado fue positivo por el método de extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, obteniendo concentraciones que

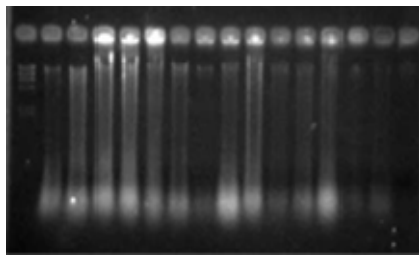


Figura 1. Gel de agarosa al 1 % con muestras de piel de *Pecari tajacu* – Protocolo Método fenol cloroformo-alcohol isoamílico.

3.2 Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa PCR

El protocolo de PCR para ADN de *Pecari tajacu*, presenta modificación al protocolo propuesto por Kim *et al.* 2002 [16]. Los cambios más sobresalientes fueron las concentraciones y la temperatura de hibridación (annealing) encontrados (55.5 °C). Este cambio en el protocolo también es reportado por otros autores [17]. No obstante, se conoce que a diferencia de las temperaturas de desnaturalización y extensión, la temperatura de hibridación no es la misma en todos los PCR [18]. Asimismo, la visualización de la banda del

ADNmt región control obtenido en el estudio indica un tamaño de 1325 pb que no coincide con lo reportado por otro autor que obtiene un tamaño aproximado de 1200 pb [17], estas diferencias tienen su explicación en los primers utilizados. Otro aspecto a mostrar en el estudio es la calidad de la banda de ADN obtenido de piel en *Pecari tajacu* producto de caza de subsistencia y confirma su uso en estudios genéticos. Además reportamos la eficaz amplificación del fragmento de la región control utilizando primers aplicados a *Sus scrofa* (cerdo doméstico) (Figura 3), tal como lo demuestran anteriores investigaciones [19,

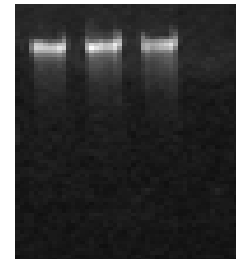


Figura 2. Gel de agarosa al 1% con muestras de sangre de *Sus scrofa domesticus* y *Pecari tajacu* – Protocolo Método Columna.

20,21]. Esto soporta el uso de primers de cerdo estableciendo homologías funcionales al comparar secuencias heterólogas con

Pecari tajacu. que contribuirán al estudio de la especie.

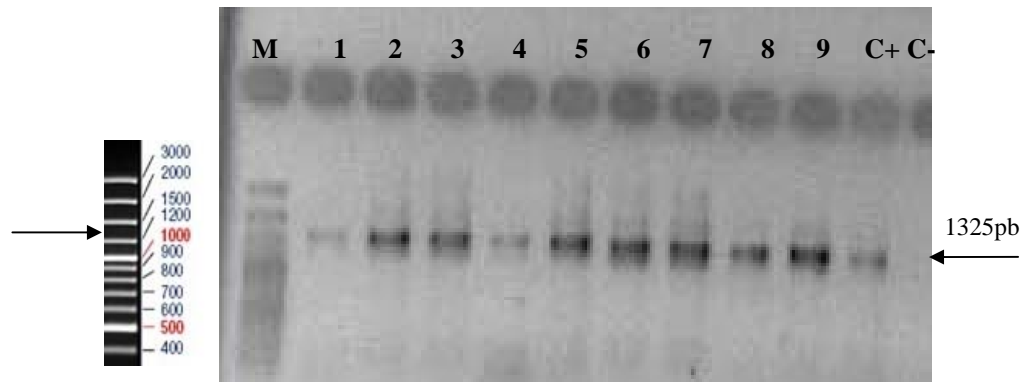


Figura 3. Amplificación de la región control de *Pecari tajacu* por PCR. La flecha indica el tamaño amplificado de 1325 pb para todos los individuos analizados. M= marcador 100 pb, C+ = control positivo, C- = control negativo.

4. Conclusiones

- La colecta de pieles de animales producto de la caza de subsistencia es estratégico para estudios genéticos en la población local y tiene carácter no invasiva.
- La extracción de ADN a partir de piel es importante en estudios prospectivos - transversal para el conocimiento del estado genético.
- El protocolo de extracción de ADN para este tipo de muestras, necesita de una fase previa de hidratación.
- La temperatura de annealing o hibridación en PCR para ADN de *Pecari tajacu* es de 55.5 °C.
- Se aplica el uso de secuencias heterólogas de *Sus scrofa* en *Pecari tajacu*.

5. Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Servicio Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SERNAP), Ministerio de Agricultura – Programa Regional de Forestal y de Fauna Silvestre, Parque de la Leyendas, Lima-Perú por el apoyo brindado en el estudio.

6. Bibliografía

- [1] Pacheco V. Ubicación sistemática del *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758). Museo de Historia Natural. UNMSM. 1999.
- [2] SOWLS LK. The Peccaries. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona; 1984, pp. 251.
- [3] Bodmer R, Aquino R, Puertas P, Reyes C, Fang T, Gottdenker N.. Manejo y uso sustentable de pecaríes en la amazonía peruana. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission No. 18. Quito, Novo Milenium; 1997. p. 7-8.
- [4] Tovar Narvaez A. Listado de especies CITES peruanas de fauna silvestre: Informe final. Ministerio de Ambiente, Lima: Perú. 181 p.
- [5] Bendayan N, Bardales J. Impacto del uso de la carne de monte en el área de influencia de las localidades de Iquitos, Nauta y Tamshiyacu. Loreto, Perú. [Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias]. Iquitos: Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2004.
- [6] Dourojeanni RM. Impacto de la producción de la fauna silvestre en la economía de la amazonía peruana. Rev. For. del Perú. 1974; 5: 15-27.
- [7] Bodmer Richard, Fang Tula. 2014. Evaluación de pecaríes en la Amazonía peruana de Loreto para cuotas máximas

- sostenibles. 2015. Fundamazonia-MINAGRI. 145 pp
- [8] Fragoso JM. Large mammals and the community dynamics of an Amazonian rain forest. PhD Dissertation. University of Florida. 1994. 209 pp.
- [9] Fragoso JM. Home range and movement patterns of White-lipped peccary (*Tayassu pecari*) herds in the Northern Brazilian Amazon. *Biotropica*. 1998; 30(3): 458-469.
- [10] Kiltie y Terborgh. Observations on the behaviour of rain forest peccaries in Peru: Why do white-lipped peccaries form herds? *Z. Tierpsychol.* 1983; 62: 241-255.
- [11] Aranguren-Méndez JA, Jordana J, Gómez M. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2002; 119: 256-263.
- [12] Gregorius HR. The Probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics*. 1980; 36(4): 643-652.
- [13] Wu Q, Chen M, Buchwald M, Phillips RA. A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues. *Nucleic Acids Research*. 1995; 23(24): 5087-5088.
- [14] Moraes-Barros Nadia de, Morgante JS. A simple protocol for the extraction and sequence analysis of DNA from study skin of museum collections. *Genetic and Molecular Biology*. 2007; 30(4): 1181-1185.
- [15] Vivantis Technologies Sdn. Bhd. [sede Web]. GF-1 Tissue DNA extraction user guide (Version 3.1). Nucleic acid extraction kit handbook. Disponible en: <http://vivanttechnologies.com/images/Resources/manual/GF-1nucleicacid/GF-TD-050.pdf>
- [16] Kim KI, Lee JH, Li K, Zhang YP, Lee SS, Gongora J, Moran C. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*. 2002; 33(1): 19-25.
- [17] Brown T. The polymerase chain reaction. In: Brown TA, editor. *Essential molecular biology. A practical approach. Volume II*. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press. 200. p. 89-120.
- [18] Sabogal Rodríguez Sandra P. Filogeografía y conservación genética del pecari de collar, *Pecari tajacu*, en cuatro departamentos de Colombia. [Tesis de Maestría en Biología]. Bogota, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología; 2010.
- [19] Gongora J, Chen Y, Bernal JE, Nicholas FW, Moran C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. *Animal Genetics*. 2002; 33: 312-327.
- [20] Gongora J, Morales S, Bernal JE, Moran C. Phylogenetic divisions among Collared peccaries (*Pecari tajacu*) detected using mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 2006; 41(1): 1-11.
- [21] Gongora J, Biondo C, Cooper JD, Taber A, Keuroghlian A, et al. Revisiting the species status of *Pecari maximus* van Roosmalen et al., 2007 (Mammalia) from the Brazilian Amazon. *Bonn Zoological Bulletin*. 2011; 60(1): 95-101.