

COLECCIONES BIOLÓGICAS: UNA ALTERNATIVA PARA LOS ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Paula A. Ossa L.¹, Javier Mauricio Giraldo M.¹, Germán Ariel López G.¹, Lucimar G. Dias¹, Fredy A. Rivera P.¹

Resumen

Actualmente, las técnicas moleculares han ganado protagonismo en el estudio de la biodiversidad, y se han privilegiado los estudios genéticos con ADN de muestras frescas, procedentes de poblaciones naturales. Sin embargo, teniendo en cuenta el inmenso potencial de información que reposa en las colecciones biológicas, se han realizado esfuerzos por obtener ADN de buena calidad, a partir de estos ejemplares algunas veces olvidados, lo que se ha convertido en alternativa para los estudios de biodiversidad en países como Colombia. A pesar de la dificultad reportada en la literatura para realizar investigaciones genéticas con los ejemplares de museo, por el efecto de las soluciones fijadoras sobre la integridad del ADN, en este estudio, se evaluó la viabilidad del ADN extraído de tejidos de serpientes de la especie *Bothriechis schlegelii*, con algunas muestras, que tienen más de 70 años de conservación en los museos colombianos. Se analizaron 60 muestras pertenecientes, a colecciones biológicas de tres museos: Serpentario y Colección Biológica de la Universidad del Cauca (Popayán), Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas (Manizales) y la Colección Biológica del Colegio San José del Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín. El ADN, fue extraído por dos métodos: a) Kit comercial Qiagen DNeasy blood and tissue y b) Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico. La calidad y cantidad de ADN, en ambos casos, se evaluó por espectrofotometría y amplificación por PCR de los genes mitocondriales 12S, 16S y COI y los ribosomales 18S y 28S. Con el kit comercial Qiagen DNeasy blood and tissue, se obtuvo el mejor resultado de extracción. Los iniciadores correspondientes a los genes 18S y 28S, presentaron la mayor eficiencia de amplificación. Se concluye que, los organismos conservados en las colecciones biológicas, son un material con alto potencial de uso en estudios moleculares, independientemente, del tiempo de preservación.

Palabras clave: *Bothriechis*, colecciones biológicas, diversidad genética, PCR.

BIOLOGICAL COLLECTIONS: AN ALTERNATIVE FOR GENETICS DIVERSITY STUDIES

Abstract

Recently, molecular techniques have gained the lead in the study of biodiversity, and have privileged genetic studies with fresh DNA samples from natural populations. Nevertheless, considering the great potential of information that lies in the biological collections, efforts have been made to obtain good quality DNA from these sometimes forgotten exemplars which have become an alternative for biodiversity studies in countries such as Colombia. Despite the literature reported difficulty in carrying out genetic investigations with museum exemplars due to the effect of fixing solutions on DNA integrity, in this study, DNA extracted from

* FR: 24-V-2012. FA: 24-VIII-2012.

¹ Grupo de investigación: Genética, Biodiversidad y Fitomejoramiento: GEBIOME, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. E-mail: paulaandrea_ossa@hotmail.com, plamao43@hotmail.com, german.lopez@ucaldas.edu.co, lucimar.dias@ucaldas.edu.co, fredy.rivera@ucaldas.edu.co.

serpent tissues of the species *Bothriechis schlegelii* was evaluated in terms of its viability, of which some samples had more than 70 years of conservation in Colombian museums. Sixty samples from the biological collections of three museums were analyzed: the Serpentario y Colección Biológica de la Universidad del Cauca (Popayán), Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas (Manizales), and the Colección Biológica del Colegio San José del Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín. The DNA was extracted by two methods: a) Qiagen DNeasy Blood and Tissue commercial kit and b) phenol-chloroform-isoamyl alcohol. The DNA quality and quantity were evaluated, in both cases, by spectrophotometry and PCR amplification of the mitochondrial 12S, 16S, and COI genes and the ribosomal 18S and 28S genes. The best extraction results were obtained from the Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. The corresponding primers of the 18S and 28S genes showed the best amplification efficiency. It is concluded that organisms conserved in biological collections are material with high potential for use in molecular studies, independently of their preservation time.

Key words: *Bothriechis*, biological collections, genetic diversity, PCR.

INTRODUCCIÓN

Colombia es reconocida internacionalmente, como un país megadiverso, el cual alberga el 10 % de la biodiversidad del planeta, representando actualmente, un 20 % del total de aves del mundo, 7 % de mamíferos terrestres y 6 % del total de reptiles (FIERRO, 2012). El Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), reporta que, hasta el 2009, se habían evaluado en Colombia, 47.677 especies de las cuales, el 36 %, se considera en peligro de extinción, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), (SECRETARÍA DEL CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA, 2010).

Según el IAvH (2010), en Colombia, se registran 1.971 especies de plantas y animales amenazadas, que precisan de esfuerzos para la implementación de estrategias de conservación y uso sostenible de estos recursos biológicos. Este panorama de impacto, sobre la biodiversidad, se ve influenciado por diferentes acciones antropogénicas, que afectan áreas, con elementos bióticos diversos, aún sin descubrir a lo largo del territorio colombiano, con gran número de especies de fauna y flora, caracterizada por una restringida distribución geográfica, lo cual implica, una alta tasa de endemismos y por consiguiente, una alta vulnerabilidad de estas especies (FIERRO, 2012). No obstante, los estudios sobre biodiversidad (inventarios, monitoreos, estudios de línea base, entre otros), realizados por universidades nacionales, grupos o centros de investigación, que generalmente, capturan ejemplares, que luego son preservados (voucher specimens), en colecciones científicas públicas o privadas (PÁEZ, 2004; VALLEJO & ACOSTA, 2005; CRISTÍN & PERRILLIAT, 2011). Estas colecciones biológicas, han sido de especial relevancia para la profundización, de estudios biológicos, ecológicos, sistemáticos, que son aprovechados por investigadores nacionales o extranjeros, incluso, para el intercambio de especímenes (MESA, 2005).

Las colecciones biológicas, han sido fundamentales para la conservación del patrimonio biológico, al promover el conocimiento de la biodiversidad y sus usos, además apoyan, el desarrollo de investigaciones, que contribuyen con el inventario nacional de biodiversidad (SIMMONS & MUÑOZ-SABA, 2005; DELGADILLO & GÓNGORA, 2009; CRISTÍN & PERRILLIAT, 2011). Tradicionalmente, estas colecciones, se han utilizado como herramientas de docencia, para realizar

comparaciones morfológicas/biométricas y/o para identificación de especies. Son escasas las investigaciones moleculares, que se han adelantado utilizando ejemplares de colecciones biológicas colombianas. La mayoría de estos estudios, se han desarrollado en las áreas de: sistemática clásica, ecología y biogeografía (PÁEZ, 2004; MESA, 2005; DELGADILLO & GÓNGORA, 2009).

Las investigaciones moleculares, registran dificultad para realizar estudios que involucren especímenes de museo, debido al notable deterioro de biomoléculas como el ADN y las proteínas, por efecto de las sustancias fijadoras, como: el formaldehído, parafina, alcohol etílico; utilizadas comúnmente, para la preservación de los ejemplares. Además, en algunos casos, se carece de la información de campo (geográfica y ambiental), en el trabajo curatorial y registro de la información detallada (SHEDLOCK *et al.*, 1997; SRINIVASAN *et al.*, 2002; BOSCH *et al.*, 2005; CAUDRON *et al.*, 2007).

La obtención de muestras de especies silvestres para la realización de estudios moleculares, sigue siendo una de las principales limitaciones, para el avance de este tipo de investigación, debido a que muchas veces, requieren el sacrificio del animal (muestras destructivas); en otras ocasiones, es necesario la captura, para realizar la extracción de sangre o hacer la biopsia (muestra invasiva); mientras que, en otros casos, se puede obtener el ADN, sin capturar, ni fatigar al animal (plumas sueltas, escamas de muda, heces, entre otras) o recolectando las muestras de tejido muscular, de cadáveres de animales encontrados en el campo (muestra no-invasiva) (TABERLET *et al.*, 1999). Se considera que las muestras de las colecciones biológicas de museos, pertenecen a ésta última categoría (BOSCH *et al.*, 2005). Por consiguiente, es evidente, que las colecciones biológicas, deben permanecer bajo un enfoque de conservación preventiva, con un gran potencial para profundizar en el conocimiento de la biodiversidad, incluso, en el nivel molecular (SIMONS & MUÑOZ, 2005; DELGADILLO & GÓNGORA, 2009).

Esta investigación, exploró la viabilidad de utilizar como fuente de extracción de ADN, especímenes conservados en las colecciones biológicas de tres museos colombianos, que facilite, la obtención de información, en el estudio de la variabilidad genética de la especie *B. schlegelii*. Este tipo de análisis, puede ser un elemento fundamental para adelantar estudios: filogenéticos, biogeográficos, ecológicos y toxicológicos, con especímenes depositados en museos. Para el caso *B. schlegelii*, el estudio tiene una importancia destacada, debido a que la especie, presenta, además de discrepancias taxonómicas, una variación en la composición del veneno, sumado a que los accidentes por esta especie, ocupan el primer lugar en las zonas cafeteras y en el norte de Antioquia (QUINTANA *et al.*, 2000; CASTOE & PARKINSON, 2006; ARIKAN *et al.*, 2008). De esta forma, con la caracterización molecular de las diferentes poblaciones de *B. schlegelii*, es posible asociar la composición del veneno, además de realizar investigaciones toxicológicas y bioquímicas (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se revisaron las colecciones biológicas de tres museos colombianos (Anexo 1), durante los meses de septiembre, octubre y noviembre, de 2010: Serpentario y Colección Biológica de la Universidad del Cauca (MHNUC-Se), Colección Biológica

del Colegio San José del Instituto Tecnológico Metropolitano (CSJ-H) y Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas (MHN-UC). Se analizaron 60 individuos (18 del MHN-UC-Se, 38 de la CSJ-H y 4 de MHN-UC), de la especie *B. schlegelii*, fijados en formaldehído al 10 % y posteriormente, en alcohol etílico, al 75 % (MESA, 2005; SIMMONS & MUÑOZ-SABA, 2005), de cada espécimen, se obtuvieron fragmentos de escamas ventrales (2 cm² de muestra, equivalentes aproximadamente, a seis escamas de un organismo adulto). Cada muestra, se rotuló y almacenó, en tubos Eppendorf de 1,5 mL, con etanol al 70 %, según lo recomendado por SALOMÃO *et al.* (1999) y CAMPBELL-STATON (2008).

Las muestras se limpiaron con una solución tampón fosfato salina (conocida por sus siglas en inglés como PBS; pH= 7,2), que remueve o elimina el fijador y disminuye la probabilidad de inhibir la reacción de PCR, según el protocolo comercial de QIAGEN (2006). La extracción del ADN, se realizó por los métodos Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico (KOCHER *et al.*, 1989, BELLO *et al.*, 2001) y el *DNeasy blood and tissue kit* de Qiagen (VIDAL *et al.*, 2007), macerando una o dos escamas, de cada organismo (25 mg de muestra).

La cantidad y calidad de ADN, se determinó mediante un espectrofotómetro, marca NanoVue, utilizando la razón de absorbancia de 260/280 nm, donde valores entre 1,6 y 1,9 se consideran indicadores de buena calidad del ADN y muestras con valores < 1,6 pueden indicar la presencia de proteínas u otros elementos absorbentes de UV en la muestra, tales como compuestos orgánicos, entre ellos el fenol. Los valores > 1,9 indican la presencia de ARN (AMARU *et al.*, 2006; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008).

La amplificación por PCR para el estudio de regiones correspondientes a los genes mitocondriales 12S, 16S y COI (Citocromo Oxidasa I), se evaluaron con los iniciadores 12Sai-12Sbi; 16Sa-16Sb (SIMON *et al.*, 1994; OGDEN & WHITING, 2005; SHEKHAR *et al.*, 2005), LCO1490-HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994). Además, se diseñaron dos parejas de iniciadores (18Sf-18Sr y 28Sf-28Sr), para los genes 18S y 28S del ADN ribosomal (Tabla 1), utilizando las secuencias del *GenBank* EF125058, de la especie *Cerastes cerastes* y M59413, de la especie *Heterodon platirrhinos*. El diseño de iniciadores, se realizó con el programa Primer-BLAST.

La mezcla de reacción para PCR, se llevó a cabo en 20 µL, que contenían de 2 a 4 µL de ADN, 0,8 mM de la mezcla de dNTP's, 1 unidad de Taq polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM, de cada iniciador y 2 µL del buffer 10X para PCR. La amplificación, se realizó en un termociclador (Bio-Rad PTC-100), con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial de 95 °C x 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización, a 94 °C x 30 s, anillamiento a 50 °C x 30 s, extensión a, 72 °C x 1 min y una elongación final de 72 °C por 5 minutos. Los amplicones, se visualizaron, en geles de poliacrilamida al 6 %, coloreados con nitrato de plata (SANGUINETTI *et al.*, 1994; GARCÍA, 2000).

Conociendo las limitaciones y dificultades, que pueden presentarse en la amplificación de ADN procedente de muestras obtenidas, de las colecciones biológicas (TABERLET *et al.*, 1999; BOSCH *et al.*, 2005), los iniciadores de PCR, se evaluaron utilizando como controles positivos, el ADN obtenido de escamas y mudas (almacenadas posteriormente, en alcohol al 70 %, sin pasar por un proceso de fijación con formol) de tres organismos vivos de *B. schlegelii* y otro del género *Clelia*. Para la prueba piloto, sobre tejido fijado en formol, se utilizó un ejemplar

del género *Bothrops*, que fue fijado por el método tradicional con formalina (formol o formaldehído) al 10 % y preservado en alcohol al 70 %, según los protocolos para la preservación y el manejo de las colecciones biológicas colombianas (MESA, 2005; SIMMONS & MUÑOZ-SABA, 2005). Los productos de amplificación por PCR, fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 6 %, coloreados con nitrato de plata (SANGUINETTI *et al.*, 1994; GARCÍA, 2000).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la caracterización molecular de *Bothriechis schlegelii*.

Gen	Iniciadores	Secuencia de los iniciadores (5' - 3')
18Sr	18Sforward	ACAAACGTTTACATGGATAACCGTGGT
	18Sreverse	CGCGCCTGCTGCCTTCCTTA
28Sr	28Sforward	CGGTAACGCGACCGATCCCG
	28Sreverse	CCTCTCTCGGGGCGAACCCA
COI _{mt}	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
16S _{mt}	16Sa	GCCTGTTTATCAAAAACAT
	16Sb	CTCCGGTTTGAACTCAGATCA
12S _{mt}	12Sai	AACTACGATTAGATACCCTATTAT
	12Sbi	AAGAGCGACGGGCGATGTGT

RESULTADOS

Si se tiene en cuenta la evaluación de ADN planteada por AMARU *et al.* (2006) y LOPERA-BARRERO *et al.* (2008), con el protocolo de extracción tradicional con Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico, se logró extraer ADN de buena calidad, 11 de 60 muestras estudiadas (18,33 %), las concentraciones variaron entre 31 y 130,5 ng/ μ L. Con el kit comercial Qiagen *DNeasy blood and tissue*, se logró extraer ADN de buena calidad a partir de 54 muestras (90 %), con concentraciones, que oscilaron entre 103 y 160,5 ng/ μ L. El ADN procedente de muestras de organismos vivos, fue de buena calidad (a excepción de la muestra de *Bothrops asper*), independientemente, del método de extracción utilizado y con un rango de variación en la concentración del ADN entre 110 y 125,5 ng/ μ L.

Las amplificaciones del ADN por PCR, mostraron iniciadores muy sensibles para ser utilizados en estas muestras (Figura 1 y Tabla 2) y otros, se ven limitados para utilizarlos en la amplificación de ADN procedente de colecciones biológicas. La evaluación de los dos métodos de extracción, mostraron diferencias en la eficiencia de extracción del ADN a favor del kit comercial de Qiagen, lo cual se ve reflejado también, en la eficiencia de la amplificación por PCR (Tablas 2 y 3).

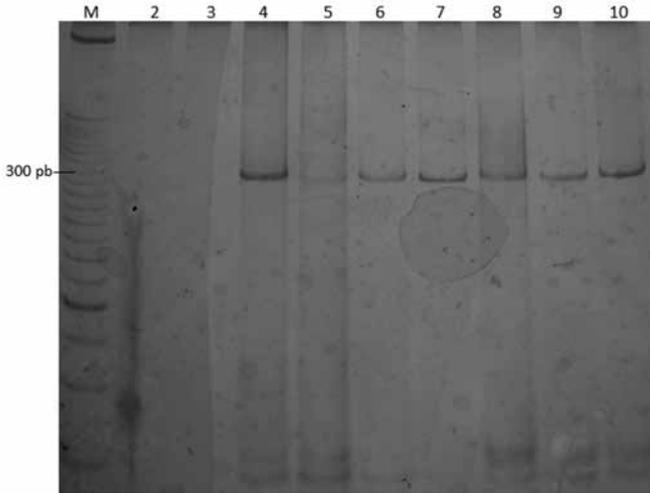


Figura 1. Amplificación del gen 18S del ADN_r, con los iniciadores 18Sf-18Sr, en gel de poliacrilamida al 6 %, coloreado con nitrato de plata. Carril 1, Marcador de peso molecular (incrementos cada 25 pb); Carril 2, Control de reacción; Carril 3, Control negativo; Carril 4, Control positivo *Bothriechis schlegelii* (muestra Bs-061); Carriles 5 a 10, *Bothriechis schlegelii* (muestras Bs-001, Bs-002, Bs-006, Bs-019, 020 y Bs-022, respectivamente).

Tabla 2. Comparación de métodos de extracción de ADN de *Bothriechis schlegelii* de tres colecciones biológicas colombianas a través de amplificación por PCR.

Iniciador	MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN					
	Fenol- Cloroformo-Alcohol Isoamílico			<i>DNeasy blood and tissue Kit</i>		
	A	NA	% de eficiencia	A	NA	% de eficiencia
16Sa-16Sb	25	35	41,7	22	38	36,7
12Sa-12Sb	0	60	0	4	56	6,7
28Sf-28Sr	24	36	40	60	0	100
18Sf-18Sr	27	33	45	54	6	90

A: Amplificó, NA: No amplificó.

Tabla 3. Peso molecular aproximado en pares de bases (pb) de las muestras amplificadas con los diferentes marcadores moleculares.

Gen	Iniciador	<i>Bothriechis schlegelii</i>	<i>Clelia clelia</i>	<i>Bothrops asper</i>
16Smt	16Sa-16Sb	600	600	600
12Smt	12Sai-12Sbi	380	380	380
COImt	LCO1490-HCO2198	890	890	---
28r	28Sf-28Sr	115	115	115
18r	18Sf-18Sr	300	300	300

DISCUSIÓN

El porcentaje de eficiencia en la extracción de ADN, a partir de muestras de especímenes de *Bothriechis schlegelii*, depositados en colecciones biológicas, fue superior ($\approx 72\%$ más efectivo) con el kit comercial *DNeasy blood and tissue*, frente al método tradicional Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico. Los resultados, apoyan la hipótesis que, es posible extraer ADN, eficientemente, a partir de muestras depositadas, en museos o en colecciones biológicas, con aplicación en estudios moleculares, que impliquen la amplificación posterior por PCR, de genes mitocondriales y nucleares, permitiendo obtener un elevado número de copias de una región concreta de este ácido nucleico; incluso, partiendo de una mínima cantidad inicial, ha facilitado extraordinariamente, el estudio con muestras que contienen poco ADN. Estos resultados, son concomitantes, con lo reportado por JIMÉNEZ *et al.* (2007), quienes extrajeron ADN, de material biológico parafinado en muestras patológicas, como: tumor congénito de pulmón, tumor de base del hígado, osteosarcomas, entre otros.

La cantidad y calidad del ADN obtenido de los ejemplares de museo, fue suficiente para optimizar reacciones de PCR (Tabla 2). En este sentido, CAMPBELL-STATION (2008), obtuvieron resultados similares, a partir de muestras de ADN procedente de piel de reptil, con concentraciones de ADN, dentro del rango de 4,2 a 95,9 ng/ μ L. Así mismo, SHEDLOCK *et al.* (1997), obtuvieron más de un 82 %, de éxito, al amplificar fragmentos de ADN mitocondrial de tamaños inferiores a 500 pb, a partir de muestras de tejido fijados en formol y posteriormente, preservados en alcohol, las cuales fueron extraídas, con el método clásico Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico, con algunas modificaciones.

Se ha reportado, que las muestras procedentes de organismos fijados en formol, conservan la arquitectura del tejido y que, aunque es posible extraer ADN, su calidad se ve disminuida por la solución fijadora, debido a que ésta, produce entrecruzamiento (*cross-linkage*), entre los ácidos nucleicos e hidroliza los puentes fosfodiéster del ADN (DOUGLAS & ROGERS, 1998; GARCÍA *et al.*, 2006; JIMÉNEZ *et al.*, 2007). SRINIVASAN *et al.* (2002) y VILLALOBOS (2006), indican que el tiempo de almacenamiento (a menor tiempo, menor ruptura del ADN), tamaño del tejido y el pH del fijador utilizado para la conservación de especímenes de museo, son cruciales para la obtención de un ADN de buena calidad. FRANK *et al.* (1996), reportan que el control del pH, no era una práctica común en décadas pasadas, por

tanto, puede que el fijador, afecte en mayor medida las muestras más antiguas. Por otra parte, BEN-EZRA *et al.* (1991), registran que los tejidos fijados en formalina, permiten recuperar ADN de baja calidad, lo que hace difícil la amplificación por PCR. NOGUCHI *et al.* (1997) y JIMÉNEZ *et al.* (2007), publicaron que la amplificación por PCR de ADN aislado de muestras parafinadas y en formalina, es inconsistente, debido a la baja cantidad, ausencia o degradación, casi completa del ADN causada por la formalina o la presencia de inhibidores de extracción, incluso por el PCR, aunque esto, también se ve influenciado por las diferencias del método de extracción.

En el presente estudio, la amplificación por PCR, mostró variación en el rango de eficiencia: entre 6,7 % y 100 %. Estas diferencias se pueden asociar con: 1) número de repeticiones mayores de los genes mitocondriales por célula, con respeto al genoma nuclear, fenómeno reportado por DÍAZ & BRADY (1997) y COOMBS *et al.* (1999). 2) tamaño del fragmento de ADN amplificado, observado por GARCÍA *et al.* (2006) y VILLALOBOS (2006), quienes reportaron amplificaciones exitosas con tamaños < 500 pb, independientemente, de las soluciones fijadoras utilizadas (incluida la formalina ácida). Asimismo, FRANK *et al.* (1996), GIANNELLA *et al.* (1997) y NARDELLI *et al.* (2011), reportaron amplificaciones < 420 pb. GARCIA *et al.* (2006), argumentan, que el rompimiento del ADN, generalmente, en fragmentos cortos por el formaldehído, puede generar problemas en la obtención de material genético de buena calidad, necesario para la amplificación por PCR, por lo cual, sugieren la utilización de iniciadores que generen amplicones cuyos pesos esperados sean bajos. 3) el estado de preservación y almacenamiento de las muestras, tal como lo afirman FRANK *et al.* (1996), BERNSTEIN *et al.* (2002), JIMÉNEZ (2005) y MESA (2005), quienes lo atribuyen al efecto de las características y propiedades de la solución fijadora en la calidad del ADN obtenido. BEN-EZRA *et al.* (1991), mencionan que la magnitud del daño del ADN, es mayor con el paso de los años de preservación, todo lo cual, pone en evidencia, el alto riesgo de fragmentación del ADN, con el paso del tiempo, cambios de temperatura y la solución fijadora utilizada.

MESA (2005), indica que en Colombia, son pocas las colecciones biológicas que consideran la conservación de tejidos, de tal forma que, se maximice la factibilidad y que puedan ser utilizados más adelante para análisis moleculares. En este estudio, se hizo evidente, la posibilidad de amplificación de ADN por PCR, independientemente, del tiempo de preservación, de ejemplares de colecciones biológicas, conservadas en formol (en algunos casos con más de 70 años de preservación).

En conclusión, este estudio sugiere la viabilidad, de utilizar muestras de material biológico procedente de especímenes de museo o colecciones biológicas, como una alternativa para los análisis de biodiversidad, basados en pruebas moleculares y de diversidad genética, sin tener que realizar, esfuerzos de muestreo que implique mayor costo, riesgo y esfuerzo de colecta, ni tampoco, el sacrificio de animales silvestres, especialmente, especies en peligro de extinción o bajo alguna categoría de amenaza.

AGRADECIMIENTOS

Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas por la financiación de este proyecto. Fundación Alejandro Ángel Escobar, por el auxilio, a

través del fondo de apoyo a la investigación, Beca Colombia Biodiversa convocatoria 2010. Serpentario y Colección Biológica de la Universidad del Cauca. Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas. Colección Biológica del Colegio San José del Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín (ITM-San José). Centro de Investigación y Asesoría Ofidica "Ophidia" de Manizales, Caldas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALAPE-GIRÓN, A., SANZ, L., ESCOLANO, J., FLORES-DÍAZ, M., MADRIGAL, M., SASA, M., CALVETE, J. J., 2008.- Snake venomomics of the lancehead pit viper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.*, 7 (8): 3556-71.
- AMARU, R., MIGUEZ, H., PEÑALOZA, R., TORRES, G., SILVESTRE, J., CUEVAS, H., 2006.- DNA-UMSagen, extracción de DNA genómico para diagnóstico molecular: método rápido y económico. *Cuadernos*, 2: 11-15.
- ARIKAN, H., GÖÇMEN, B., KUMLUTAŞ, Y., ALPAGUT-KESKIN, N., ILGAZ, Ç., YILDIZ, M., 2008.- Electrophoretic characterisation of the venom samples obtained from various Anatolian snakes (Serpentes: Colubridae, Viperidae, Elapidae). *J. Zoology*, 4 (1): 16-28.
- BELLO, N., FRANCINO, O., SÁNCHEZ, A., 2001.- Isolation of genomic DNA from feathers. *J. Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 162-164.
- BEN-EZRA, J., JOHNSON, D. A., ROSSI, J., COOK, N., WU, A., 1991.- Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J. Histochem Cytochem*, 39: 351-4.
- BERNSTEIN, J., THOMPSON, W., CASEY, G., DICIOCCIO, R., WHITTEMORE, A., DIEP, A., THAKORE, S., VAZIRI, S., XUE, S., HAILE, R., 2002.- Comparison of techniques for the successful detection of *BRCA1* mutations in fixed paraffin-embedded tissue. *Cancer Epidem., Biomarkers Prevention*, 11: 809-814.
- BOSCH, M., MARMÍ, M., FERRANDO, A., LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F., ANDRÉS, O., GARCÍA-FRANQUESA, E., PONSÀ, M., KELLERMANN, T., BRUNO GUALLAR, B., BISBAL, F., DOMINGO-ROURA, X., 2005.- Genotipar sin capturar. *Galemys*, 17: 81-102.
- CAMPBELL-STATON, S., 2008.- Un modificado sistema de purificación de ADN genómico, protocolo para purificar el ADN genómico de reptil. [En línea]. Disponible en: <http://www.promega.com/enotes/applications/ap0089.htm>.
- CASTOE, T. A. & PARKINSON, C. L., 2006.- Bayesian mixed models and the phylogeny of Pit vipers (Viperidae: Serpentes). *Mol., Phylogenet. Evol.*, 39: 91-110.
- CAUDRON, A. K., NEGRO, S. S., MÜLLER, C. G., BOREN, L. J., GEMMELL, N. J., 2007.- Hair sampling and genotyping from hair follicles: a minimally-invasive alternative for genetics studies in small, mobile pinnipeds and other mammals. *Mar. Mamm. Sci.*, 23: 184-192.
- COOMBS, N., GOUGH, A., PRIMROSE, J., 1999.- Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.*, 27 (16): 12-14.
- CRISTÍN, A. & PERRILLIAT, M. C., 2011.- Las colecciones científicas y la protección del patrimonio paleontológico. *Bol. Soc. Geol. Mex.*, 63 (3): 421-427.
- DELGADILLO, I. & GÓNGORA, F., 2009.- Estrategias didácticas en la enseñanza-aprendizaje de la biología. *Bio-grafía: Escritos sobre la Biología y su Enseñanza*, 2 (3): 148-157.
- DÍAZ, S. & BRADY, S., 1997.- DNA extraction from formalin-fixed, paraffin embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high quality DNA. *Diagnostic Mol. Pathol.*, 6: 342-346.
- DOUGLAS, M. P. & ROGERS, S. O., 1998.- DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mut. Res.*, 401: 77-88.
- FIERRO, M. J., 2012.- *Políticas mineras en Colombia*. Digiprint Editores, E. U.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R., 1994.- DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5: 294-299.
- FRANK, T., SVOBODA, S., HSI, E., 1996.- Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagnostic Mol. Pathol.*, 3: 220-224.
- GARCÍA, M. P., BENAVENTE, M. F., MELO, A. A., ROA, E. I., ROA, S. J. C., 2006.- Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Esp. Patol.*, 3: 175-179.
- GARCÍA, P. H. M., 2000.- Electroforesis en geles de poli(acrilamida): fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.*, 1 (2): 31-41.
- GIANNELLA, C., ZITO, F. A., COLONNA, F., PARADISO, A., MARZULLO, F., ALAIBAC, M., 1997.- Comparison of formalin, ethanol, and histochoice fixation on the PCR amplification from paraffin-embedded breast cancer tissue. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35: 633-5.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT, 2010.- Amenazas sobre la biodiversidad. [En línea]. Disponible en: <http://www.humboldt.org.co/iavh/component/k2/item/131-amenazas-sobre-la-biodiversidad>.

- JIMÉNEZ, A. G., VILLALOBOS, Q. M. J., JIMÉNEZ, M. E., PLATERO, P. W., 2007.- Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Rev. Méd. Univ. Costa Rica.*, 1 (1): 10-19.
- JIMÉNEZ, G., 2005.- *Diagnóstico molecular de los linfomas no Hodgkin*. Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines. Universidad de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación. Unidad de Genética y Biología Molecular.
- KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PAABO, S., VILLABLANCA, F. X., WILSON, A. C., 1989.- Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6196-6200.
- LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J. A., RIBEIRO, R. P., GOMES, P. C., JACOMETO, C. B., DA SILVA, L. T., 2008.- Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.*, 35 (1): 77-86.
- MESA, R. D. P., 2005.- Protocolos para la preservación y manejo de colecciones biológicas. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 10: 117-148.
- NARDELLI, M., TÚNEZ, J. I., CENTRÓN, D., 2011.- Técnicas de muestreo no invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia*, 36: 404-411.
- NOGUCHI, M., SHUICHIROH, F., TAKEUCHI, T., HIROHASHI, S., 1997.- Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol. Internat.*, 47: 685-691.
- OGDEN, T. H. & WHITING, M. F., 2005.- Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37: 625-643.
- PÁEZ, V., 2004.- El valor de las colecciones biológicas. *Actualidades Biológicas*, 26 (81): 2 pp.
- QIAGEN., 2006.- DNeasy blood and tissue handbook. [En línea]. Disponible en: www.qiagen.com.
- QUINTANA, J. C., OTERO, R., NÚÑEZ, V., TORO, F., 2000.- Estudio de la variabilidad en el veneno de dos poblaciones de *Bothriechis schlegelii* del suroeste y norte de Antioquia y correlación morfométrica. *Iatreia*, 13 (2): 107-107.
- SALOMÃO, M. G., WÜSTER, W., THORPE, R. S. 1999.- ADNmt phylogeny of neotropical pit vipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia Darmstadt. Beit. Naturgeschichte*, 8: 127-134.
- SANGUINETTI, C. J., DIAS, N., SIMPSON, A. J., 1994.- Rapid silver staining and recovery of PCR products separate on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17: 914-921.
- SECRETARÍA DEL CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA., 2010.- *Perspectiva mundial sobre la diversidad biológica 3*. Progress Press Ltd.
- SHEDLOCK, A. M., MARGO, M. G., PIETSCH, T. W., BENTZEN, P., 1997.- Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioTechniques*, 22: 394-400.
- SHEKHAR, M. S., GOPIKRISHNA, G., AZAD, I. S., 2005.- PCR-RFLP analysis of 12s and 16s mitochondrial rRNA genes from brackishwater, finfish and shellfish species. *Asian Fisheries Sc.*, 18: 39-48.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., FLOOK, P., 1994.- Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals Entomolog. Soc. America*, 87: 651-701.
- SIMMONS, J. & MUÑOZ-SABA, Y., 2005.- Tipos de Colecciones: 31-43 (en) SIMMONS, J. & MUÑOZ, Y (ed.) *Cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- SRINIVASAN, M., SEDMAK, D., JEWELL, S., 2002.- Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity nucleic acids. *Am. J. Pathol.*, 161: 1961-1971.
- TABERLET, P., WAITS, L. P., LUIKART, G., 1999.- Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 323-327.
- VALLEJO, M. Y. & ACOSTA, A., 2005.- Aplicación de indicadores de conocimiento sobre biodiversidad para el diagnóstico y comparación de colecciones biológicas. *Nova Publ. Cient.*, 3 (4): 48-57.
- VIDAL, N. DELMAS, A-S., PATRICK, D., CRUAUD, C., COULOUX, A. S., HEDGES, B. S., 2007.- The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C. R. Biologies*, 330: 182-187.
- VILLALOBOS, Q. M.J., 2006.- Implementación de un Protocolo de Extracción de ADN a Partir de Biopsias Humanas y Determinación de su Calidad para PCR: Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología Ingeniería en Biotecnología.

Anexo 1. Ejemplares de *Bothriechis schlegelii* (fijados en formol al 10 % y posteriormente, en alcohol etílico al 75 %), de tres museos colombianos.

Código de Colección	Procedencia	Colector	Año de Colecta
MHNUC-Se-000371	Cauca, Totoró	*	1960
MHNUC-Se-000132	Cauca, Piendamó	Santiago Ayerbe MD.	1991
MHNUC-Se-000442	Cauca, Cajibío, Corregimiento La Capilla, Vereda La Unión, Vertiente Oriental de la Cordillera Occidental	Andrés Cortés	2004
MHNUC-Se-000038	Cauca, Popayán, Km 2, vía Popayán-Totoró	Santiago Ayerbe MD.	*
MHNUC-Se-000372	Cauca, El Tambo, Vía Popayán-López de Micay, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental, Km 81	Fernando Campo	*
MHNUC-Se-000384	Cauca, Popayán, de la Panamericana vía a la Hacienda Calibío	Francisco José López	2001
MHNUC-Se-000129	Cauca, El Tambo, Vereda La Playa, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental	Santiago Ayerbe MD.	1994
MHNUC-Se-000127	Cauca, Popayán, La Cabuyera	Santiago Ayerbe MD.	1993
MHNUC-Se-000133	Cauca, Popayán, Río Palacé	Santiago Ayerbe MD.	1985
MHNUC-Se-000130	Cauca, El Tambo, Vereda La Playa, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental	Santiago Ayerbe MD.	*
MHNUC-Se-000131	Cauca, El Tambo, La Playa, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental	Santiago Ayerbe MD.	1998
MHNUC-Se-000015	Cauca, El Tambo, Hacienda Las Torres, Río San Joaquín, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental	Santiago Ayerbe MD.	*
MHNUC-Se-000134	Cauca, Totoró, Novirao	Santiago Ayerbe MD.	1995
MHNUC-Se-000128	*	*	*
MHNUC-Se-000037	Cauca, El Tambo, Hacienda La Primavera, Río San Joaquín, Vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental	*	*
MHNUC-Se-000117	Córdoba, Alto Quimará	Kjell von Sneidern	1949
MHNUC-Se-000216	Cauca, Popayán, Julumito	Santiago Ayerbe MD.	2000
MHNUC-Se-NR	Risaralda, Pereira Finca El Cedral (Finca de Cartón de Colombia)	Edwin Royer	2010
CSJ-H-4761	Antioquia, Sonsón	*	1986



Código de Colección	Procedencia	Colector	Año de Colecta
CSJ-H-4759	Chocó	*	1941
CSJ-H-4758	Antioquia, Santo Domingo	*	1989
CSJ-H-4757	Antioquia, La Ceja	*	*
CSJ-H-4760	Antioquia, Andes	*	1951
CSJ-H-4771	*	*	*
CSJ-H-4769	Antioquia, Medellín, El Poblado	*	1969
CSJ-H-4768	Antioquia, San Pedro	*	1937
CSJ-H-4767	Antioquia, San Pedro	*	1933
CSJ-H-4766	Antioquia, San Pedro	*	1965
CSJ-H-4764	Antioquia, San Pedro	*	1965
CSJ-H-4762	Antioquia, San Pedro	*	1960
CSJ-H-4765	Antioquia, San Pedro	*	*
CSJ-H-4778	Antioquia, San Pedro	*	*
CSJ-H-4777	Antioquia, Andes	*	*
CSJ-H-4776	Antioquia, Medellín, Los Caunces	*	1956
CSJ-H-4808	Antioquia, San Pedro	*	*
CSJ-H-4775	Antioquia, San Pedro	*	*
CSJ-H-4774	Antioquia, Medellín, Santa Elena	*	1964
CSJ-H-4773	Antioquia, Medellín, Santa Elena	*	*
CSJ-H-4772	Antioquia, La Ceja	*	1957
CSJ-H-4784	Risaralda, Santa Rosa de Cabal	*	1972
CSJ-H-4770	Antioquia, San Carlos	*	
CSJ-H-4782	Antioquia, San Pedro	*	1985
CSJ-H-4783	Antioquia, Yolombó, La Cancana	*	1988
CSJ-H-4755	Antioquia, Amalfi, Río Riachón	*	1988
CSJ-H-4754	Antioquia, Santa Rosa de Osos	*	1966
CSJ-H-4750	Antioquia, La Ceja	*	
CSJ-H-4749	Antioquia, Belmira	*	1964
CSJ-H-4807	Antioquia, San Pedro, La Lana	*	1994
CSJ-H-4752	Antioquia, Sopetran	*	1999
CSJ-H-4753	Antioquia, Santa Rosa de Osos, San Isidro	*	1998
CSJ-H-4751	Antioquia, Andes	*	*
CSJ-H-4747	Antioquia, Sonsón	*	*
CSJ-H-4748	Antioquia, La Ceja	*	*



Código de Colección	Procedencia	Colector	Año de Colecta
CSJ-H-4780	Antioquia, San Pedro	*	1984
CSJ-H-4779	Antioquia, Medellín, Santa Elena	*	1960
CSJ-H-4781	Antioquia, San Pedro	*	1965
MHN-UC-0082	Caldas, Manizales, Barrio Centenario	Gina María Duque	2002
MHN-UC-0057	Caldas, Manizales	*	*
MHN-UC-R-0001	Caldas, Samaná, Selva de Florencia	José Vicente Rueda	1992
MHN-UC-0081	Caldas, Manizales	Jesús Vélez Estrada	1985

* No se tiene información.