

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**ANALISIS MOLECULAR DE UNA MUESTRA DE 53 CERDO CRIOLLOS DEL
DEPARTAMENTO DEL CHOCÒ, COLOMBIA, MEDIANTE 3 MARCADORES
MICROSATELITES**

POR:

ALEXANDER JOSÈ CALIX ROMERO

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

ANALISIS MOLECULAR DE UNA MUESTRA DE 53 CERDO CRIOLLOS DEL
DEPARTAMENTO DEL CHOCÒ COLOMBIA, MEDIANTE 3 MARCADORES
MICROSATELITES

POR:
ALEXANDER JOSÈ CALIX ROMERO

HECTOR DIAZ ANTUNEZ, MSc.
Asesor Principal

LUZ ANGELA ALVAREZ Phd.
Asesor (Colombia)

TESIS
PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

DEDICATORIA

A ti padre celestial por no desampararnos en ningún momento de mi vida por darme fuerza, salud, sabiduría, oportunidades y muchas bendiciones durante crece mi carrera universitaria y en todas parte que me encontraba; te amo y sigue derramando bendiciones.

A mis padres **ELA MARINA ROMERO DIAZ** y **MARVIN JAVIER CALIX** por ser tan especial y confiar en mí en todo momento.

A mi hermano del alma **MARVIN JOEL CALIX ROMERO** por su apoyo y colaboración en todo momento que lo moleste.

También para mi hermano del alma que Dios lo tenga en la gloria **OLMAN FERNANDO LAGOS HERNANDEZ** (el chino), que desde el cielo nos cuida y nos da fortaleza para seguir adelante. Siempre te recordare mi hermano.

A todos mis amigos que nunca dudaron de Mí, y a mi familia que siempre pasaron pendiente durante cada día de mi vida estudiantil.

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso por darme fuerza para lograr mis objetivos a diario y que nunca me desampara.

Con mis padres por la vida, por siempre creer en uno y hacer todo lo posible para que cumplamos nuestra metas.

Con mis abuelos, tíos y primos, por pasar pendiente en toda la evolución de la carrera universitaria.

Agradecido con todos mis amigos por darme apoyo moral y económico para poder llegar a lograr una mete importante de mi vida.

Familia Gutiérrez - Osorto, por ser las personas que con su sabiduría y su cariño, fueron los que me indujeron al buen camino.

A mis asesores **Héctor Leonel Alvarado, MSc. Héctor Díaz** y al **Phd. Carlos Ulloa**, por su apoyo y colaboración no solo como asesor de tesis sino como amigo y maestro.

A la Universidad Nacional de Agricultura, por ser mi alma mater donde me crie como profesional y darme la oportunidad de estudiar y toda mi vida estaré agradecida, te llevare en mi corazón.

A la parte administrativa y docentes por apoyarme desde el primer día de estadía en la Universidad hasta el final, por comprender y tolerar cosas buenas y malas de mi persona y a sus empleados de campo por ser amigos, colaboradores que siempre me brindaron su ayuda

cuando más lo necesitaba. A la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio de biología molecular y darme su apoyo en la ejecución del trabajo, al **P.hD Jaime Eduardo Muños** y la **P.hD Luz Ángela Álvarez** por brindarnos su conocimiento y su comprensión.

A la estudiante de doctorado **Julia Victoria Arredondo Botero**, por no ser ella mi tesis no hubiese sido un éxito, me dedico todo su tiempo en enseñarme y colabórame y se comportó como una madre en el tiempo que duro mi trabajo. Se le aprecia mucho.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, por mostrarme su apoyo y su amistad, por abrirme las puertas de su corazón como el de su hermoso país, por esos momentos que me regalaron demostrando que en el laboratorio no solo son compañeros sino también amigos, a ellos: **Juliana, Paula Rugeles, Jeison, Adriana, Nini, Angela Vinasco, Andres Posso, Jinethe Alexandra, Monica, la Dra. Yesenia, Liliana, Melina.**

CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	4
2. 1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
III REVISION DE LITERATURA	6
3.1 La Región Pacífica Colombiana	6
3.2 El cerdo criollo colombiano.....	6
3.3 Características morfológicas del cerdo criollo colombiano.....	7
3.3.1 Raza criolla Casco de Mula	7
3.3.2 Raza criolla Zungo	8
3.3.3 Raza criolla San Pedreño	9
3.4 El cerdo criollo del pacífico colombiano.	10
3.5 Importancia de los recursos zoogenéticos	10
3.6 Diversidad Genética.....	11
3.7 Marcadores moleculares (Microsatélites).....	12
3.8 Reacción en cadena de polimerasa	14
3.8.1 Desnaturalización del ADN doble cadena	15
3.8.2 Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras	15
3.8.3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.....	15
3.9 Electroforesis	16
3.10 Estudios de diversidad genética mediante el uso de Microsatélites	17
IV METODOLOGÍA	19
4.1 Localización.....	19

4.2 Materiales y equipo.....	19
4.3 Procedencia de las muestras de ADN	20
4.4 Extracción de ADN.....	21
4.5 Microsatelites.....	21
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4.7 Cálculos estadísticos	22
4.7.1 Número de alelos (NA):.....	22
4.7.2 Número promedio de alelos por locus (NPA).....	22
4.7.3 Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad Observada.....	23
4.7. 5 Equilibrio de Hardy y Weinberg.....	23
4.7.7 Índice de fijación (Fis).....	24
4.7.8 Índice de diferenciación (Fst):	24
V RESULTADOS Y DISCUSION	26
5.1 Extracción y cuantificación del ADN:.....	26
5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):	26
5.3 Resultados estadísticos	30
5.3.1 Numero de alelos.....	30
5.3.2 Numero Promedio de Alelos.....	31
5.3.3 Heterocigosidad observada y esperado así como el valor Fis.....	31
5.3.4 Diferenciación entre poblaciones:	32
5.3.5 Relación genética entre las agrupaciones analizadas.....	32
VI CONCLUSIONES.....	34
VII RECOMENDACIONES	35
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXÓS	40
Anexo 2.Imágenes del Cerdo Criollo de Pacifico Colombiano.....	42

Lista de cuadros

Nº Tabla	Descripción	Pág
Tabla 1: Muestras a utilizar		20
Tabla 2: Características de los Microsatelites a utilizar.		21
Tabla 3: Escala de valores de F_{st} y grados de diferenciación propuesta por		25
Tabla 4: Condiciones nuevas de amplificación para los marcadores Microsatelites.		27
Tabla 5: Programa utilizado para la amplificación de los primers.		28
Tabla 6: Números de alelos por locus encontrados en la investigación y reportes de trabajos realizados por Barrera <i>et al</i> 2007.....		30
Tabla 7: Valor estadísticos de la Diversidad Genética de los cinco grupos de cerdos analizados.		31
Tabla 8: Nei's (1978) unbiased minimum distance.		33

Lista de Figuras

No.	Contenido	Pag.
Figura 1:	Microsatelites. Ejemplo de un di-nucleótido A-C(n).....	12
Figura 2:	Muestras de ADN corridas en gel de Agarosa, calidad y cantidad.....	26
Figura 3:	Producto amplificado de PCR del Primer S0005 con sus condiciones adecuada, (Bp. 205 - 248).	27
Figura 4:	Amplificado del micro SW240 con sus condiciones ideales.	28
Figura 5:	Gel de poliacrilamida representando los cuatro alelos en la población de cerdos del Choco y comparando con las tres razas criollas existente en Colombia.	29
Figura 6:	Gel de poliacrilamida realizado para el micro S0005.	29
Figura 7:	Dendrograma de distancia genética de 53 muestras del cerdo criollo del Departamento de Chocó basado en el coeficiente de similitud de Dice Nei-Li (1978).	33

Calix Romero A.J. 2011. Análisis Molecular de una muestra de 53 cerdos criollos del Departamento de Chocó, Colombia, Mediante 3 Marcadores Microsatelites. Tesis Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. 52 pág.

RESUMEN

Una muestra aleatoria de 53 cerdos adultos no emparentados, procedente de los ríos Valle, Baudo y Dubasa, en el Departamento del Chocó perteneciente a la región del pacifico colombiana, fueron analizados utilizando 3 marcadores Microsatelites. Se midieron las variables; número de alelos (NA), numero promedio de alelos por locus (NPA), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho), índice de fijación (Fis), índice de diferenciación (Fst) y distancia genética de Nei. El ADN se extrajo mediante el protocolo de saltingOut. Los Microsatelites (S0005, SW240 e IGFI), fueron amplificados individualmente a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y los productos se corrieron en electroforesis vertical de gel denaturante de poliacrilamida al 4%. Con los resultados del conteo de bandas se realizó una matriz de datos en Excel y el análisis se realizó mediante el Software TFPGA versión 1.3. Todos los Microsatelites amplificados fueron polimórficos y se encontró un número de 5 alelos para los loci S0005 e IGFI, mientras que el locus sw240 presenta 4 alelos. El número promedio de alelos por locus (NPA) fue de 4.67. En los tres loci analizados, la agrupación del Chocó mostró desviación del Equilibrio Hardy Weinberg, presentando un déficit de heterocigotos, al haber una Ho significativamente inferior a la He($p < 0.05$). Así mismo, los altos valores de Fis obtenidos (0.52 en promedio) indican disminución de la heterocigosidad, atribuible a endogamia. La heterocigosidad observada Ho promedio en el grupo de cerdos criollos del Chocó fue de 0.32. En un análisis comparativo con una pequeña muestra de cada una de las tres razas criollas: Zungo, Casco de Mula y San Pedreño, se obtuvo un estadístico Fst, de 0.12, lo cual indica una moderada diferenciación genética entre las agrupaciones analizadas. La relación genética de los individuos más cercanos fueron la muestra de cerdos de la raza Zungo y las muestras comerciales provenientes de la granja (Palmira) y estos se agruparon a su vez con la raza San Pedreño. Se pudo observar también cercanía entre los cerdos criollos del Chocó y el grupo de la raza Casco de mula.

Palabras claves: Heterocigosidad, Microsatelites,

I INTRODUCCIÓN

La región pacífica colombiana está compuesta por cuatro departamentos (Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño), cuenta con extensas selvas muchas de ellas sin descubrir sus paisajes exóticos y su belleza escénica hace ser un lugar naturalmente hablando espectacular. El clima de esta zona diferente al resto del país ya que cuenta con una precipitación anual muy alta y temperaturas elevadas que hace esta zona diferente al resto del mundo (Gentry, 1982).

Su población está distribuida entre indígenas (10%), negros (85%) y mestizos provenientes del interior del país (5%); lo cual evidencia que la mayoría de habitantes de la región es una minoría étnica (Escobar, 2005). Según el IGAC (1999) reconoce al Chocó como el departamento más grande del pacífico posee una gran diversidad biológica y por tanto una importante fuente de recursos naturales que son valiosos en términos ambientales, sociales, culturales y económicos.

El sistema de vida de la comunidad negra de esta región está ligado a la oferta natural y ambiental, donde los sistemas tradicionales de producción están integrados por diversas actividades pecuarias, en los cuales la cría de cerdos criollos es fundamental.

Los primeros cerdos llegaron a América en el segundo viaje de Colón (1493) a la isla La Española (Pinheiro, 1976). En 1525 Rodrigo de Bastidas introdujo 300 cerdos de la raza Extremeña Lampiña o pelada al hoy departamento colombiano de Córdoba (Cabezas 1976). En la actualidad la población porcina se estima en 2.500.000 animales; en los sistemas de producción comercial se utilizan híbridos de las razas Landrace, Yorkshire, Duroc Jersey, Hampshire, Large White y Pietran, entre otros, y líneas comerciales trihíbridas y tetrahíbridas como PIC y Dekalb, mientras que en los sistemas de economía campesina se

emplean cruces de cerdos criollos con razas comerciales (Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2002).

En Colombia, en la actualidad se reconocen tres razas de cerdos criollos, los cuales descienden de los primeros cerdos traídos a América, según Pinheiro, (1976). Desde su traída a América; se adaptaron a zonas específicas y se caracterizan por altas tasas reproductivas, tolerancia a enfermedades parasitarias y supervivencia. Estos cerdos han desarrollado mecanismos de ajuste y adaptación al trópico que les permiten producir y reproducirse, contrarrestando factores adversos como son la alimentación deficiente, escasez de agua, enfermedades y manejo precario (Oslinger 2003).

El cerdo criollo del pacífico colombiano a pesar de ser tan importante para las comunidades rurales no se tiene un conocimiento seguro de él y no se considera como una raza criolla de Colombia, este tipo de cerdos no ha sido estudiado hasta el momento. Analizar este tipo de poblaciones desde el punto de vista molecular brindará bases para futuros programas de fomento y conservación.

Durante los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones ha tomado un gran auge, debido principalmente a la concientización del hombre sobre la necesidad de preservar dichos recursos genéticos. La importancia de la biodiversidad y su conservación quedó patente a partir de la cumbre de la Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, celebrada en Río de Janeiro (1992), estableciéndose entonces la necesidad de estudiar los diferentes componentes de la diversidad biológica.

Los recursos genéticos animales, ya se utilicen en la explotación agropecuaria, la cría convencional o la ingeniería genética, constituyen un patrimonio de inestimable valor. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción y productividad pecuaria y la agricultura sostenible, y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales (FAO, <http://fao.org/dad-is> 1992). [accion](#)

La utilización de marcadores moleculares como los Microsatelites nos permite hacer análisis de diversidad genética en estos animales de granja fundamentales para la seguridad alimentaria de los pueblos y así identificar y valorar estos recursos zoogenéticos que son patrimonio de las naciones.

Este trabajo consiste en el estudio de la diversidad genética del cerdo criollo proveniente de la rivera de los ríos Baudó, el Valle y Dubasa, del departamento de Chocó Colombia, mediante el uso de 5 marcadores moleculares Microsatelites.

II OBJETIVOS

2. 1 Objetivo General

- Analizar la diversidad genética de cerdos criollos provenientes de las riveras de los ríos Baudó, El Valle y Dubasa, en el Departamento del Chocó, Colombia, mediante el uso de 3 marcadores Microsatelites.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar las condiciones de corrida para los 3 marcadores moleculares Microsatelites en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.
- Cuantificar el número de alelos por locus, el porcentaje de Heterocigosidad, el equilibrio de Hardy y Weinberg, y el coeficiente de consanguinidad existente en las poblaciones de cerdo criollos del pacifico colombiano.
- Estimar la diferenciación genética entre el cerdo criollo colombiano y las otras tres razas Colombiana existentes.

III REVISION DE LITERATURA

3.1 La Región Pacífica Colombiana

La Región Pacífica está conformada por sólo cuatro departamentos que tienen costa sobre el Océano Pacífico: Chocó, con costa sobre el Océano Pacífico y sobre el Mar Caribe, Valle del Cauca, Cauca y Nariño.

Es una región con hermosos y exóticos paisajes naturales, muchos de ellos aún sin descubrir. Dentro de la Región Pacífico se encuentra la conocida Selva del Darién, en los límites con Panamá, con lugares aún vírgenes por sus características inexpugnables, en las cuales aún se descubren especies de Flora y Fauna sin clasificar.

El clima es de tendencia más cálido tropical que el resto del país, súper húmedo y con lluvias relativamente alta, con una de las mayores pluviosidades del mundo (precipitación promedio anual desde 700 mm en el sur hasta 12,717 mm en el norte) con régimen bimodal que comprende una primera temporada lluviosa desde abril a junio y una segunda temporada de septiembre a noviembre (zona norte) y octubre a diciembre (zona sur). Presenta gran cantidad de ríos cortos con alto caudal, con excepción del Patía y San Juan, relativamente largos (Escobar, 2006).

El departamento del Chocó, posee una gran diversidad biológica y por tanto una importante fuente de recursos naturales que son valiosos en términos ambientales, sociales, culturales y económicos. La vida de las comunidades negras de esta región, está estrechamente ligada a su oferta natural y ambiental, alrededor de la cual giran sus sistemas tradicionales de producción, integrados por actividades como minería, agricultura, pesca, caza, agro-

forestaría, piscicultura, avicultura y porcicultura entre otras, todas desarrolladas dentro de la categoría de economías de subsistencia (Ayala 2004 citado por Palacio-Mosquera).

La relación de las comunidades (negros, mestizos e indígenas) con el medio natural implica el uso y aprovechamiento de los recursos, y por tanto una inevitable modificación de los ecosistemas de la región (Mosquera *et al* 2008).

3.2 El cerdo criollo colombiano

Los cerdos criollos de América Latina tienen su origen en los cerdos ibéricos traídos por Cristóbal Colón, durante su segundo viaje. Según Pond (1974) los primeros cerdos llegaron a Haití en el año 1493. No cabe duda que otras importaciones se sucedieron en los años siguientes de la conquista española y que luego se repartieron en los extensos territorios que hoy constituyen el continente latinoamericano (Benítez y Sánchez 2001).

Estos animales, provenientes del *Sus scrofa mediterraneus* que pobló la región mediterránea de Grecia, Portugal, Italia y algunos países del Norte de África como Egipto, se desarrollaron en zonas de terrenos semiáridos próximos a las costas, con altitud hasta 700 metros y con temperaturas entre 10 y 18 °C. De estos cerdos se han derivado una gran variedad de razas célticas e ibéricas desaparecidas con el tiempo o absorbidas mediante cruzamientos. Actualmente, quedan unas pocas, entre las que sobresalen las Coloradas, Rubias, Negras y Manchado de Jabugo (Hernández *et al.*, 1997), las cuales en la actualidad conforman los rebaños que se explotan en España.

Se puede deducir que los cerdos de América derivan de las múltiples razas existentes en los siglos XV y XVI. Esto puede explicar la gran variedad de fenotipos existentes en todos los países.

Lamentablemente, no existen datos precisos sobre la población de cerdos locales en cada uno de los países y los datos oficiales generalizan, cuando sostienen que estas poblaciones son «mayoritarias». Es indiscutible que por sus características zootécnicas y por haber sido

explotados de manera tradicional, sin inversiones mayores de tiempo, recursos y tecnología, los cerdos locales no han sido objeto de muchos estudios que permitan conocer su verdadero potencial genético y su capacidad productiva (Benítez y Sánchez, 2001).

Los primeros cerdos llegados a eran pequeños, manejables, ágiles y rústicos. El cerdo y el caballo fueron los primeros animales domésticos que durante el descubrimiento tocaron suelo americano en el Caribe y luego en tierra firme (MADR, 2003). En el año 1525 fueron traídos a Colombia 300 cerdos de la raza española extremeña Lampiña o Pelada por Rodrigo de Bastidas al hoy Departamento de Córdoba (Peña y Mora, 1977).

El cerdo fue llevado por Bastidas a Santa Marta, por Heredia a Cartagena, Belalcazar al sur de Colombia y por Jorge Robledo al Valle del Cauca y a Antioquia cumpliendo dos funciones fundamentales: como provisión viva indispensable para los conquistadores y como iniciador de la industria animal en las diferentes colonias que se fundaron en el nuevo mundo (ACP, 2002). Con el cerdo ibérico entonces se realizó la colonización del nuevo mundo, sirviendo en la conquista del territorio y en el sostenimiento de las colonias españolas; el cruce de estos animales y su descendencia formaron lo que se denomina las razas criollas. (Velasco, SENA- CLEM, 2004).

Según Velasco (2004), desafortunadamente debido a la llegada de las razas llamadas MODERNAS y los cruces indiscriminados y no controlados de estas razas con nuestros cerdos criollos, estos han ido desapareciendo o han sido adsorbidos. En la actualidad se reconocen tres razas de cerdos criollos: la raza Zungo en la Costa Atlántica, la raza Casco de Mula en los Llanos Orientales y la raza San Pedreño en las zonas de Antioquia y Viejo Caldas (Barrera *et al.* 2007) razas que en la actualidad han sido caracterizadas desde el punto de vista zoométrico, zootécnico y molecular.

3.3 Características morfológicas del cerdo criollos colombiano

3.3.1 Raza criolla Casco de Mula

El cerdo criollo Casco de Mula es un tipo de cerdo con casco fundido semejante al casco equino. Es de tamaño mediano con una longitud corporal media de 80 ± 16 cm para hembras y 86 ± 19 cm para machos. La altura de la cruz tiene una media de 56 ± 8 en hembras y 61 ± 12 cm en machos. Su piel es lisa con animales policromos, de capas negras y coloradas en el 90% de su cuerpo. La trompa es mediana, rostro cóncavo, orejas grandes en forma recta y ligeramente caídas hacia delante, patas fuertes y cortas, anca caída y jamón relativamente escaso. Su cola es en forma de tirabuzón. En cuanto a la estructura corporal, poseen línea dorsal recta con la parte ventral (barriga) pendulosa o recta (Barrera *et al.* 2007).

La región donde se ubican los cerdos cascos de mula, en la zona de Piedemonte Llanero, posee un clima húmedo y templado con temperatura promedio entre 18 C y 20 C. por su parte, la zona de sabana de los llanos Orientales presentan climas tropicales, con temperaturas promedio de 27 C, lo que demuestra la gran capacidad de este cerdo rustico y prolífico para adaptarse a toda clase de clima principalmente de los cálidos húmedos (Barrera *et al.* 2007).

Las características del casco pueden traer beneficios a la piara nacional, desde el punto de vista sanitario como en el caso de fiebre aftosa, debido a que esta tipo de casco no permite infecciones interdigitales, como sucede en otras razas de cerdo (Velasco, SENA- CLEM, 2004).

3.3.2 Raza criolla Zungo

La raza Zungo es de color negro y escasa cantidad de pelo, usualmente poseen la piel arrugada aunque existen individuos de piel lisa. El hocico es de longitud mediana, orejas amplias rectas o en algunas ocasiones caídas, buena papada, cuerpo cilíndrico, grupa algo inclinada, extremidades finas y cortas. Su cola es recta. En cuanto a la estructura corporal, poseen línea dorsal recta o convexa con la parte ventral recta. La longitud corporal tiene una media de 67 ± 6 cm para hembras y 70 ± 8 para machos. La altura de la cruz tiene una media de 67 ± 5 cm y 75 ± 6 para machos y hembras respectivamente. Se considera que

existen dos tipos de cerdos Zungo: el choncho que es un animal en forma de esfera o redondeado y de tamaño pequeño y el tipo mediano de cuerpo rectangular (Barrera *et al.* 2007).

La zona en cual se desarrolla la raza Zungo corresponde a la Costa Norte del país, predominantemente el Valle del Sinù y la sabanas de Córdoba y Sincelejo; esta región va de la franja costera hasta las estribaciones de la Cordillera Occidental y posee temperaturas promedio de 28 C en la parte baja que bordea el mar y de 14 C en la Cordillera Occidental. El 96% de este territorio se clasifica como piso térmico cálido y posee una temperatura media de 29 C (Barrera *et al.* 2007).

3.3.3 Raza criolla San Pedreño

La raza San Pedreño es un cerdo tipo grasa de conformación y tamaño mediano, piel y pelo totalmente negros, aunque se presentan manchas blancas, cubierto de abundante pelo, patas cortas y finas, con pezuña débil. También hay un cerdo tipo carne con hocico más alargado, patas más largas y jamones mejor desarrollados. Los animales tienen orejas semi caídas y caídas. Su piel es generalmente lisa con cola en forma de tirabuzón. Tienen la línea dorsal recta, la longitud corporal es de 70 ± 7 y 75 ± 9 cm para machos y hembras respectivamente. La altura a la cruz tiene una media de 75 ± 5 cm hembras y de 80 ± 9 cm en machos (Barrera *et al.* 2007).

La raza San Pedreño se ha adaptado a zonas con clima muy variado debido a las condiciones geográficas de la zona del viejo Calda y Antioquia. En el norte y oriente predomina el clima frío, mientras que el suroeste y el Valle de Aburrà son de clima templado (Barrera *et al.* 2007).

El cerdo San Pedreño presenta un peso bajo al nacer (0.8 Kg), pero un tamaño de camada al nacer como al destete digno de tener en cuenta para los sistemas de producción de pequeña y mediana intensidad, representado por 10 y 9 lechones, respectivamente su adaptación se

refleja en el manejo tradicional que el campesino le dio durante muchos años, es decir, suelto, en pastoreo y sin mayor cuidado, con 15 camadas por cerda por año y sin problemas sanitarios fuertes, solo parasitismo ocasionales (Velasco, SENA-CLEM, 2004).

3.4 El cerdo criollo del pacifico colombiano

El cerdo criollo del Pacífico como recurso genético, es una especie desconocida en el territorio nacional, no es considerado como una raza colombiana y ha sido afectado por la escasa valoración económica y la ausencia de investigación en aspectos de caracterización, conservación y evaluación (Barrera 2007).

Según Ocampo y Leterme (2003), el sistema productivo local del cerdo criollo en el río Baudó (Departamento del Chocó- Colombia) alterna cultivos y bosque. La agricultura se basa en la producción de plátano y arroz principalmente, se caracteriza por usar mano de obra familiar, no se maneja el concepto de finca o parcela unificada, los cultivos se manejan de forma rotatoria y dispersa. Los autores encontraron tres sistemas de cría: suelto en el 75% de los casos, en chiquero y en trinchas.

El cerdo que permanece libre, se alimenta de frutos, especies forrajeras, tubérculos y cultivos de pancoger, por lo cual se generan en ocasiones conflictos entre vecinos. Las hembras presentan el primer celo a la edad promedio de 7.5 meses. En general, los cerdos criollos en esta región presentan menor tasa de crecimiento, menor proporción de carne y mayor espesor de grasa dorsal que los cerdos de razas mejoradas. Solo el 15% de la población presenta un plan de vacunación. Puede haber un alto grado de consanguinidad y en términos generales, no se llevan registros de producción.

3.5 Importancia de los recursos zoogenéticos

El uso sostenible, el desarrollo y la conservación de los recursos zoogenéticos a nivel nacional, regional y mundial es el objetivo primordial contemplado en el Plan Global de

Acción sobre los Recursos Zoogenéticos y la Declaración de Interlaken, que para ello establece como una de las áreas estratégicas prioritarias la caracterización, el inventario y el seguimiento de los riesgos asociados y las tendencias en relación con los recursos zoogenéticos (FAO, 2007).

Según la FAO, Recurso zoogenéticos son todas las especies, razas, líneas en general genotipos animales de potencial económico, uso científico o de interés cultural, que se usan o pueden ser usados en el futuro, en la producción de alimento o en la agricultura (Wainer, 1989).

3.6 Diversidad Genética

La diversidad genética es la variación que existe entre los individuos de todas las especies de la Tierra y es una de las formas de la diversidad biológica. Se refiere a la variación en la composición de la información genética o unidades hereditarias (genes) contenida en todas las especies vivientes, encontradas en un área específica y que pueden reproducirse entre sí a través del tiempo. Según Jiménez y Collada (2000), el conocimiento de la diversidad es necesario para los programas de conservación.

Existen dos tipos de variación genética: una diversidad neutral, es decir, que no se ve afectada por la selección natural, y una diversidad correspondiente a los caracteres con valor adaptativo. En los caracteres neutrales, las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencia de procesos aleatorios o direccionales, como la migración entre poblaciones y la deriva genética, mientras que el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación depende de su valor selectivo (Jiménez y Collada, 2000).

La función de la diversidad genética es la de mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia. La diversidad total de los recursos zoogenéticos permiten al ser humano sobrevivir en una amplia variedad de condiciones de producción, desde los trópicos cálidos y húmedos hasta

los desiertos áridos y las regiones árticas, extraordinariamente frías o montañosas (Zamudio, 2005).

Esta diversidad puede mantenerse disponible en programas de mejoramiento y conservación mediante la caracterización genética, que permite que se conozca el genotipo de un animal a partir de su ADN, extraído de muestras de sangre, pelos, tejidos o semen (Da Silva *et al.* 2007).

3.7 Marcadores moleculares (Microsatelites)

Los marcadores Microsatelites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (figura 1). Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994), ya que: son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son cien por ciento fiables, repetitivos y automatizables (Aranguren-Méndez y Jordana 2001).



Figura 1: Microsatelites. Ejemplo de un di-nucleótido A-C(n)

Según Aranguren (2002), Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad entre ellos la buena distribución a lo largo del

genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, y debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios.

El elevado polimorfismo que presentan los Microsatelites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos.

Para elegir el tipo de marcador a utilizar, éste debe presentar, además de las características anteriormente descritas, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductividad y precisión, no presencia de alelos “nulos”, información del genotipo transferiblemente rápida, no limitado únicamente a muestras sanguíneas frescas, que no requiera grandes cantidades de ADN, y que presenten una segregación independiente con los otros marcadores al ser combinados en la prueba (Aranguren-Méndez y Jordana. 2001).

En los estudios de genética poblacional, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, y obtener datos poblacionales, calcular las frecuencias alélicas, y a partir de estas estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock 1994 y Ponsuksili 1999).

Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y solucionaron el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores (Andrade y Solís 2007). Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Carrera, *et al.* 2004).

3.8 Reacción en cadena de polimerasa

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR que es un método *in vitro* de síntesis de ADN donde un segmento en particular de éste es específicamente amplificado (“multiplicado”) de una manera semi-conservativa (es decir que conserva las características de acuerdo al modelo de Watson y Crick, en el que describen que el ADN es un polímero formado por dos cadenas complementarias (cadenas anti paralelas).

Constituidos por unidades de desoxirribonucleótidos de cuatro bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y timina unidas al azúcar desoxirribosa) al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores estos son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar (Baca y Torres, 1995).

Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable, así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN. Uno de los problemas que enfrentó Mullis era que en cada ciclo había que añadir la enzima ADN polimerasa de la bacteria *Escherichiacoli*, ya que ésta se inactivaba con las temperaturas tan altas demandadas para la desnaturalización y exponer las bases nitrogenadas de sus nucleótidos, este problema fue resuelto con el descubrimiento de una bacteria (*Thermusaquaticus*) que vive en aguas termales junto a *geissersa* 75°C (Barrera y Rodríguez, 2004).

En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 94° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados (Kornblihtt y Satz, 1993).

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

3.8.1 Desnaturalización del ADN doble cadena:

En esta etapa la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La desnaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

3.8.2 Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras:

En este paso los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C)

3.8.3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa:

Esta etapa se le conoce como elongación, aquí se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'- 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxirribonucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Lozada, 2005.).

Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Obtener el mismo resultado utilizando las técnicas clásicas de clonado llevaría varios días de tedioso trabajo. Por otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha, mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Es, por lo tanto, un instrumento extremadamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco (Kornblihtt y Satz, 1993).

3.9 Electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza (García, 2000).

Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatografía basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García, 2000).

Durante una electroforesis el voltaje se mantiene constante por lo que la movilidad de la molécula dependerá de su carga, forma y tamaño: a mayor carga neta, la molécula migrará más rápido; a su vez, a mayor fricción, la movilidad será menor. La electroforesis se utiliza en bioquímica como un método de separación de proteínas analítico más que preparativo, es decir, es un método útil para la visualización y separación de preparaciones de proteínas en pequeña escala y no a gran escala. Tiene la ventaja de que ayuda al analista a determinar rápidamente cuántas proteínas existen en una preparación en particular o el grado de pureza de una preparación proteica específica (Hernández, 1999).

La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada de un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen ambos al electrolito y están unidos a los electrodos del generador de corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. La distancia de migración se mide en relación un marcador interno. Las placas son reveladas con sales de plata, azul de Coomassie, o reactivos en particular (Morales, 2008.).

3.10 Estudios de diversidad genética mediante el uso de Microsatelites

Groenenet *al.* (2003), utilizaron 50 marcadores Microsatelites ubicados en todos los cromosomas, excepto el 18, en muestras de ADN individual y mezclado de 72 poblaciones de cerdo europeo, usando secuenciador automático. Encontraron que la utilización de muestras mezcladas de ADN de toda una población, reduce drásticamente el número de genotipos a desarrollar y por tanto ahorra tiempo y dinero.

Siendo igual de efectiva a la individual, sin embargo requiere una adecuada selección de los sets de Microsatelites para evitar la sobre posición de alelos y usar muestras de ADN mezcladas teniendo en cuenta criterios como el grado de tartamudeo, el brillo de los picos en el secuenciador automático y la ausencia de alelos que difieran solo en un par de bases, logrando identificar alelos individuales y calcular correctamente la frecuencia de los alelos de acuerdo al área bajo el pico.

Martínez *et al.* (2005), analizaron la variabilidad genética del cerdo criollo cubano en 93 muestras de ADN extraído a partir de pelo de las variedades Lampiño y Entrepelado, en la provincia de Granma y La Habana, mediante 20 Microsatelites propuestos por FAO, se compararon con cerdos de las razas Duroc y Hampshire. Todos fueron polimórficos, con un número promedio de alelos de 8.2; casi todos fueron informativos de la raza ($PIC > 0.5$), considerándose útiles para determinar la variabilidad genética de la raza. Encontraron una heterocigosidad media esperada de 0.6535 y una observada de 0.6335, valores superiores a los reportados previamente para el cerdo ibérico y en general, para 11 razas porcinas europeas, pero inferior a datos reportados para 4 razas porcinas chinas.

Con un F_{st} de -0.0012, determinaron que no hay diferenciación entre las poblaciones de cerdos Lampiños y Entrepelados. Mediante el cálculo de la distancia genética de Nei (1972), encontraron mayor cercanía del cerdo criollo cubano con la raza Hampshire, que con el cerdo ibérico, pues a pesar de ser descendiente suyo, la deriva de ambas razas por 500 años y la influencia de razas como Hampshire y Duroc las han diferenciado.

La diversidad genética ha sido estudiada mediante la técnica molecular RAMs (RandomAmplifiedMicrosatellites) en 35 cerdos criollos colombianos (Zungos, San Pedreño, Casco de Mula) y en una muestra de animales de tipo comercial. Se encontraron 46 loci polimórficos, la heterocigosidad fue de 0.2016 y de 0.3058 ± 0.0433 el Fst. El árbol de distancias de Nei definió bien las razas Zungo y San Pedreño, las cuales se alejaron del resto de los individuos. Los cerdos Casco de Mula se agruparon con los comerciales, lo que indicó la presencia de introgresión con razas foráneas (Oslinger *et al.* 2007).

Martínez, Rodero y Vega-Pla (2000) hicieron un estudio de las principales variedades de cerdos del Tronco Ibérico mediante 25 microsatélites en 217 animales de las variedades Retinto Extremeño, Retinto Portugués, Entrepelado, Mamellado, Torbiscal, Silvela, Lampiño y Dorado Gaditano. Además de algunos ejemplares de Manchado de Jabugo y Duroc. Todos los loci fueron polimórficos y encontraron entre 8 y 10 alelos en la mayoría de los marcadores. El locus más informativo fue el CGA, con un valor de PIC y heterocigosidad esperada por encima de 0.9, indicando un alto nivel de variabilidad genética. Encontraron claras diferencias entre la raza Duroc y el cerdo Ibérico y variedades bien definidas como el Torbiscal, Retinto Portugués y Lampiño, así como cercanía entre las variedades Retinto Extremeño, Entrepelado y Silvela y diferencia de estas tres con el resto de variedades.

Barrera *et al.* (2007), analizaron muestras de 114 animales de las razas criollas Zungo (ZU), Casco de Mula (CM) y San Pedreño (SP) y de las especializadas Landrace, Duroc Jersey y Yorkshire. Identificaron 256 alelos en 19 marcadores Microsatelites. El árbol de distancias genéticas mostró que las razas Yorkshire y Landrace formaron un primer grupo, cercano al Duroc Jersey. Las razas criollas formaron tres grupos separados de los cuales la raza San Pedreño fue el menos distante de las razas foráneas.

IV METODOLOGÍA

4.1 Localización

La investigación se realizó en los laboratorios de Genética y Biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en el Departamento del Valle del Cauca, en la ciudad de Palmira (Latitud 03° 31'48'' N y 76° 18' 13'' O), ubicada a 1001 m.s.n.m y con una temperatura promedio de 23°C, con precipitaciones medias que alcanzan al año valores de 2.000 mm a 2.100mm.(Microsoft ® Encarta ®,2008).

La sede está ubicada en la carretera 32 sobre la carretera que conduce a la población de Candelaria y el Bolo. En sus alrededores se encuentran la Corporación de Investigación Agropecuaria (Corpoica) y el Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT) (Londoño 2003).

4.2 Materiales y equipo

Como material genético se utilizaron 53 muestras recolectadas del cerdo criollo del pacifico colombiano del departamento de Choco.

Materiales: puntas para micro pipetas, agarosa, Tris base, DNTP,s, Isopropanol, Agua tipo HPLC, Bromuro de etidio, Taq ADN polimerasa, ADN de cerdo, NaCl, nitrato de plata, y etanol.

Equipo: Centrifuga, balanza, tijeras, papel aluminio, marcador, termociclador, agitador, cámara extractora, micro pipeta, cámara de flujo, auto clave, cámara electroforesis, transiluminador, probeta, tubos falcón y tubos de reacción.

4.3 Procedencia de las muestras de ADN

Se trabajó con 53 muestras de sangre (5 ml extraídos de la vena yugular) de machos y hembras no emparentados, provenientes de los ríos Baudó, El Valle y Dubasa, en el departamento del Chocó. Las muestras fueron transportadas refrigeradas en tubos vacutainer con EDTA.

Las muestras testigo, de las razas Zungo, Casco de mula y San Pedreño, provenían de sangre de animales puros, almacenada en el banco de ADN de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

Tabla 1: Muestras a utilizar

Origen	Raza	número de individuos
Chocó (Ríos Baudó, El Valle y Dubasa)	“Criollo Chocó”	53
Departamento de Cordoba	Zungo	3
Departamento de Antioquia	San Pedreño	3
Departamento del Meta	Casco de mula	3
Granja Mario Gonzales Aranda (UNAL Palmira)	Mezcla de razas comerciales (Pietran, Largewhite y Yorkshire)	3

Fuente: Elaboración propia

4.4 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN por medio del protocolo de “SaltingOut” (Miller et al. 1988), (Anexo No. 1)

La concentración y la calidad del ADN extraído se determinó mediante la visualización en geles de agarosa al 0.8%, comparándolo con patrones del fago lambda, que le permite determinar de manera adecuada la concentración de ADN.

4.5 Microsatelites

Se utilizaron 5 Microsatelites de un panel recomendado por la FAO (Food and Agriculture Organization) para el programa de Medición de la Diversidad Recursos Genéticos animales de granja (MoDAD) y las regiones específicas que contienen Microsatelites serán amplificadas individualmente a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Tabla 2: Características de los Microsatelites a utilizar.

Microsatelite s	Secuencia de cebadores 5´-3´	Ubicación cromosoma l	Tamaño o (pb)	Temperatur a de annealing (°C)
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	5q	205- 248	55
Sw240	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	2p	96-115	55
IGFI	GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTCTGCATAACTTGAACC T	5q	197-209	55

Fuente: <http://www.projects.roslin.ac.uk/pigbiodiv/markers.html>

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se prepararon los cocteles para PCR, con dNTPs, $MgCl_2$, Cebador Forward, Cebador Reverse, Taq Polimerasa, Agua miliQ y BSA. Se realizó la PCR en el termociclador PTC'100, con un programa específico ajustado para la amplificación de cada Microsatelites ya que cada uno amplifica en condiciones adecuadas de temperatura y concentraciones diferentes de Magnesio.

Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de Agarosa al 1,4%, corridos a 80 voltios por 45 minutos y teñidos con Bromuro de etidio, sustancia q se intercala entre la base del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con la luz ultravioleta (Padilla *et al*) observados en un transiluminador y comparados con un marcador de pares de bases para determinar que el amplificado correspondiera al peso esperado en pares de base.

Estos productos amplificados fueron vistos en gel de agarosa al 1.4% para verificar la calidad del fragmento.

Para observar la separación de las bandas, se realizó electroforesis vertical en gel denaturante de poliacrilamida al 4%, observando de esta manera el desplazamiento de los segmentos que difieren pocos en el números de pare de bases. La visualización de las bandas se realizó por tinción de nitrato de plata. Posteriormente se organizó una matriz donde se determinaban los alelos correspondientes a cada individuo en cada locus

4.7 Cálculos estadísticos

4.7.1 Número de alelos (NA):

Es la cantidad de alelos encontrados en un loci.

4.7.2 Número promedio de alelos por locus (NPA)

Es el número de alelos contabilizados en todos losloci, dividido por el número total de loci:

$$n = (1/K) \sum ni \text{ (Con } i \text{ desde 1 hasta } K)$$

Siendo **K** el número de loci, y **ni** el número de locus en cada loci.

4.7.3 Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad Observada.

Es la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos escogidos al azar, sean diferentes entre sí.

Se pueden realizar 3 tipos de cálculos:

1. Un locus j con 2 alelos: $h_j = 1 - p^2 - q^2$
2. Un locus j con i alelos: $h_j = 1 - \sum p_i^2$
3. Promedio de varios loci: $H = \sum h_j / L$

Siendo **h_j** la heterocigosidad en cada locus, **p** y **q** las frecuencias alélicas, **H** la heterocigosidad promedio para varios loci y **L** el número total de loci.

Esta He, si hacemos su promedio para todos los loci, obtendremos una medida de la variabilidad genética de una población. Su valor varía entre 0 y 1, y se maximiza cuando varios alelos poseen frecuencias similares. La heterocigosidad promedio esperada para varios loci se calcula al restar 1 a las frecuencias esperadas de homocigotos de un locus, la operación se repite para todos los loci y luego se hace su promedio.

4.7. 5 Equilibrio de Hardy y Weinberg

El teorema de Hardy – Weinberg es una formulación matemática que muestra que la frecuencia de los diferentes alelos en población ideal de tamaño infinito no cambie en el tiempo a menos que actúen fuerzas evolutivas y por lo tanto la mayoría de inferencias sobre la diversificación de las poblaciones se realizan en base al sentido en la desviación de la frecuencia génica observadas respecto a la esperada bajo el equilibrio que se refiere el teorema de HW (Caujape 2006).

4.7.7 Índice de fijación (Fis)

El índice de fijación (Fis) cuantifica la consanguinidad de los individuos en las sub-poblaciones a las que pertenecen. Este parámetro también se conoce como coeficiente de consanguinidad, porque ofrece una medida de la reducción de heterocigosidad de un individuo debida al apareamiento consanguíneo no aleatorio dentro de una población. Aunque Fis se calcula para cada locus analizado, su valor operativo es la media a través de los loci (Caujape 2006).

Según Wright (1931), los valores de Fis pueden tomar los siguientes valores:

Si el valor Fts es positivo, las poblaciones tienen un defecto de homocigotos, el cual puede ser debido a la consanguinidad o a la selección, o además puede explicarse a la presencia de alelos nulos que den la impresión falsa de defectos de heterocigotos, consanguinidad o efectos Wahlund, es decir, por la existencia de la estructura poblacional que no se tenía en cuenta.

Si el valor de Fis es negativo, la población presenta un exceso de heterocigotos, que puede ser explicado por una inmigración conducente a la heterogamia, selección a favor de individuos heterocigotos (selección sobredominante), reproducción cruzada obligada o algún mecanismo de autoincompatibilidad en la reproducción sexual de las especies. El Fis es el único parámetro de estructuración poblacional que interviene en el cálculo de la tasa de reproducción cruzada (Posso 2011).

4.7.8 Índice de diferenciación (Fst):

El Fst cuantifica la consanguinidad de las sub-poblaciones en la relación a la poblaciones total de la cual forma parte, se interpreta como la proporción de la variación total atribuible a la diferenciación entre poblaciones (Caujape, 2006).

Tabla 3: Escala de valores de F_{st} y grados de diferenciación propuesta por Wright 1978

Valor del F_{st}	Grado de diferenciación
0 – 0.05	Poca diferenciación genética
0.06 – 0.15	Moderada diferenciación genética
0.16 – 0.25	Alta diferenciación genética
Mayor de 0.25	Gran diferenciación genética

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Extracción y cuantificación del ADN:

La aplicación del protocolo Saltingout permitió extraer ADN de buena calidad a partir de la sangre total. Esto se verificó en geles de agarosa al 0,8%, (Foto 2.) estableciendo la concentración mediante comparaciones con ADN de concentraciones conocidas del fago Lambda. El ADN se diluyó a una concentración de 10 ng/μL, que es la concentración reportada en trabajos de este tipo. La cuantificación se realizó por comparación visual de la intensidad de las bandas por tres personas para obtener un promedio final.

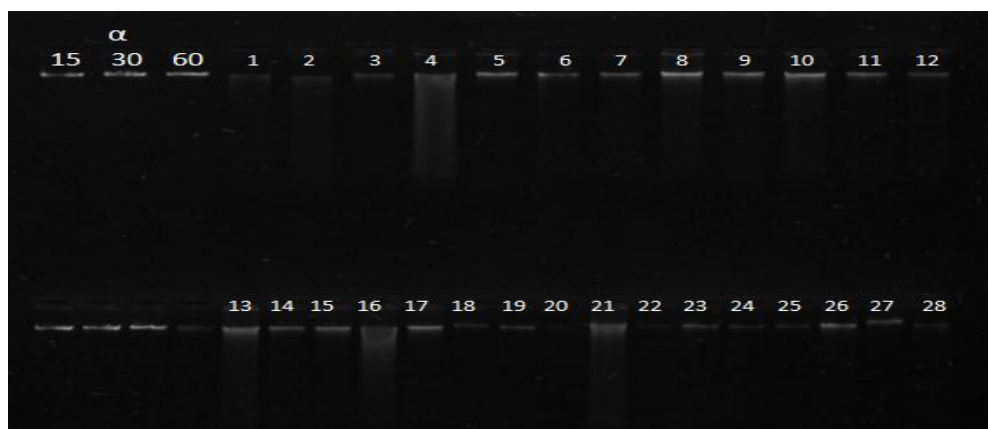


Figura 2: Muestras de ADN corridas en gel de Agarosa, calidad y cantidad.

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Los primers seleccionados fueron amplificados en condiciones diferentes que lo que reporta la literatura, el número de muestras se redujeron a 5 para realizar ensayos y modificar las condiciones de temperatura como de los reactivos, pero se obtuvieron resultados exitosos

después de varios ensayos realizados. En la figura 3 se puede observar los resultados de los micros amplificados.

Tabla 4: Condiciones nuevas de amplificación para los marcadores Microsatelites.

Compuestos	Inicio	Final
MaCl ₂	25 mM	2.5mM
dNTPs	1.25 mM	0.2 mM
Buffer	10 X	1 X
P1	10 pM/μl	10 pM/μl
P2	10 pM/μl	10 pM/μl
ADN	10 ng/μl	10 ng/μl
BSA	10 mg/ml	0.6 mg/ml
Tag	5 μl	0.5 μl
H ₂ O		
Volumen total		25 μl

Se utilizó BSA como reactivo por los buenos resultados obtenidos en trabajos anteriores, siendo el BSA una proteína extraída del suero bovino que ayuda a relajar el ADN inactivado por los inhibidores de la Taq polimerasa.

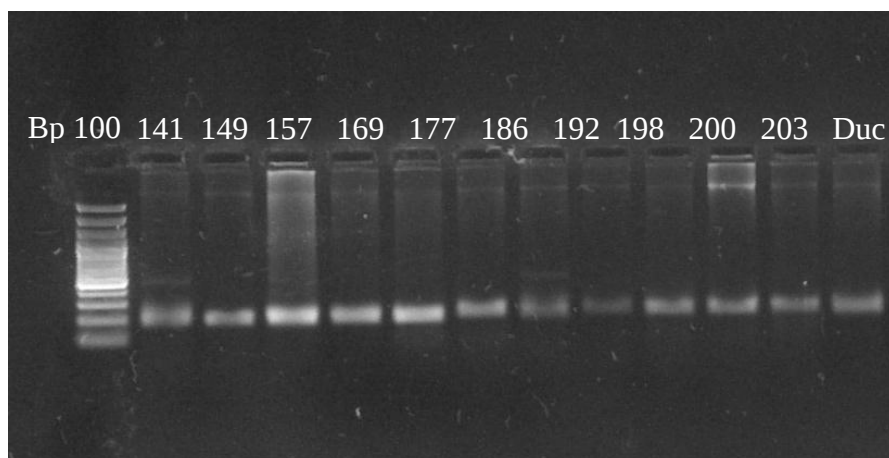


Figura 3: Producto amplificado de PCR del Primer S0005 con sus condiciones adecuada, (Bp. 205 - 248).

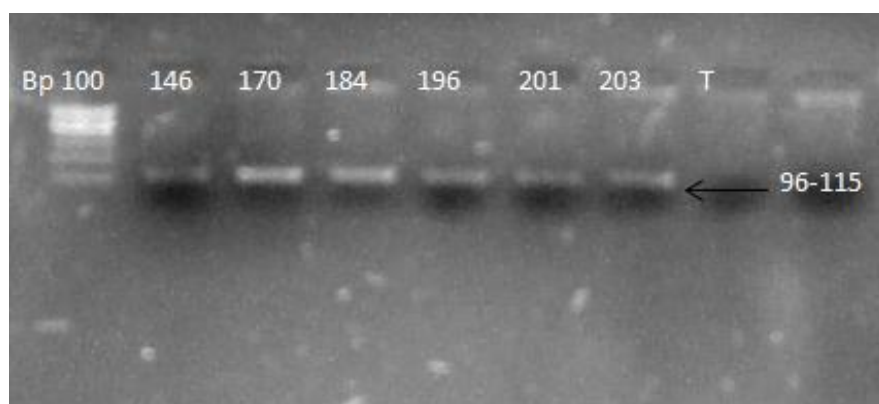


Figura 4: Amplificado del micro SW240 con sus condiciones ideales.

Para obtener una mejor visualización por medio de la separación de las bandas amplificadas de cada primer, las temperaturas utilizadas para cada uno de los cebadores de los cuales obtuvieron excelentes resultados fue la siguiente:

Tabla 5: Programa utilizado para la amplificación de los primers.

Ciclos	Temperaturas (°C)			Tiempo (cebador)
	S0005	SW240	IGFI	
Desnaturalización inicial	95	95	95	5 min
Desnaturalización	95	95	95	30 seg.
Hibridación	55	55	60	45 seg.
Extensión	72	72	72	1.5 min.
37 ciclos desde paso 2				
Extensión final	72	72	72	10 min.
16 ÷				
END				

La temperatura de annealing, tal como lo reporta la literatura fue de 55°C para los micros s0005 y sw240, pero el IGFI solo amplificó adecuadamente a 60°C.

Con el Microsatelite S0090 no se logró obtener ninguna amplificación, con el SW24 se dieron amplificaciones inespecíficas, que por la premura del tiempo no se pudieron corregir.

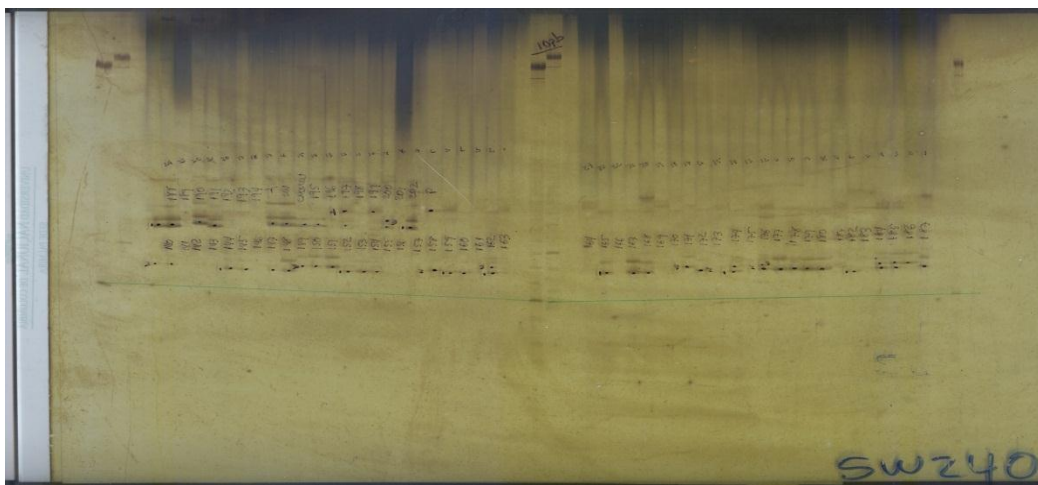


Figura 5: Gel de poliacrilamida representando los cuatro alelos en la población de cerdos del Chocó y comparando con las tres razas criollas existente en Colombia.

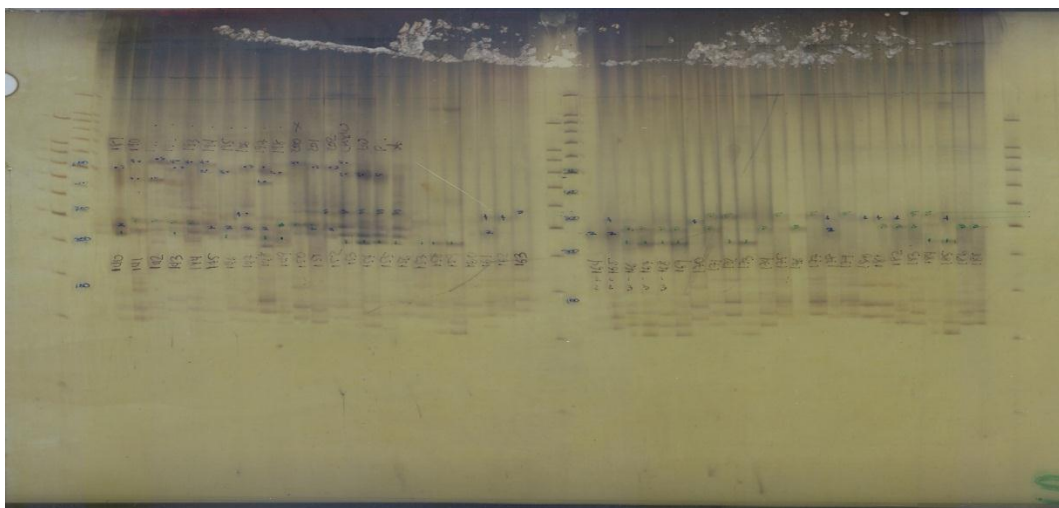


Figura 6: Gel de poliacrilamida realizado para el micro S0005.

En esta imagen podemos observar la distribución de los locis polimórficos existente para el primer S0005.

5.3 Resultados estadísticos

5.3.1 Numero de alelos

Se encontró un número de 5 alelos para los loci s0005 e IGFI, el locus sw240 presentó 4 alelos, estos resultados fueron inferior a lo reportado Barrera et al (2007), que corresponde a 9 alelos para el locus s0005 en las razas criollas colombianas Zungo y Casco de mula, y 8 para el San Pedreño, para el sw240 en ambas razas reportan 6 alelos y para el San Pedreño 7. El número de alelos encontrado también es inferior a lo reportado en cerdos criollos de otros países. Pérez (2006) en cerdo criollo cubano, reportó 7 alelos para el IGFI y 9 para el sw240. Martínez y Vega (2007) analizaron la diversidad genética del cerdo ibérico y reportaron para los locus IGFI 8, para el s0005 18 y para el sw240 8 alelos.

En estudios realizados con cerdos chato murciano puro y cruzado, en España (Peinado et al, 2003) se encontró un número inferior de alelos para el IGFI (4 alelos), sw240 (2) e igual para el s0005 (5). Además Revidatti (2009) reportó un número mayor de alelos para el s0005 (17) y sw240 (5), pero igual número de alelos para el IGFI (4).

Cabe aclarar que los datos anteriormente reportados corresponden a estudios realizados con tamaños de muestra mayores.

Tabla 6: Números de alelos por locus encontrados en la investigación y reportes de trabajos realizados por Barrera *et al* 2007.

Razas	# de alelos micros		
	S0005	SW240	IFGI
CCP	5	4	5
Zungo	9	6	-
CM	9	6	-
SP	8	7	-

5.3.2 Numero Promedio de Alelos

El NPA (Número promedio de alelos por locus) fue de 4,67, inferior al promedio reportado por Barrera, et al. (2007), de 6,54 en todas la razas criollas existente en Colombia.

5.3.3 Heterocigosidad observada y esperado así como el valor Fis.

En la tabla número7 se observa los valores de la heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada y el coeficiente de variación (Fit) en el grupo de cerdos criollo del Departamento de Chocó, Zungo, Casco de Mula, San Pedreño y el Grupo de las razas comerciales.

Tabla 7: Valor estadísticos de la Diversidad Genética de los cinco grupos de cerdos analizados.

	Criollo Chocó (n=54)			Zungo (n=3)			San Pedreño (n=3)			Casco de mula (n=3)			Comerciales (n=3)		
	Ho	He	Fis	Ho	He	Fis	Ho	He	Fis	Ho	He	Fis	Ho	He	Fis
S0005	0.50	0.78*	0.36	0.33	0.73	0.55	0.00	0.67	1	0.00	0.53	1	0.33	0.33	-
SW240	0.15	0.65*	0.77	-	-	-	0.50	0.50	-	0.50	0.83	0.39	-	0.53	1
IGFI	0.30	0.55*	0.45	-	-	-	-	-	-	0.67	0.73	0.08	-	-	-
Promedio	0.32	0.66	0.52	0.11	0.24	0.18	0.17	0.39	0.33	0.39	0.70	0.49	0.11	0.29	0.33

En la tabla siete también se observa valores de los testigos que son bajos debido al reducido número de muestras y a la ausencia de algunos datos (ausencia de bandas). En las muestras de Zungo no fue posible estimar desviaciones del equilibrio HW para los micros sw240 e IGFI, en las muestras de San Pedreño y cerdos Comerciales no se pudo estimar para el primer IGFI al haber solo un alelo por locus.

En los tres loci analizados, la agrupación de cerdos criollos del Departamento de Chocó mostró desviación del Equilibrio Hardy Weinberg, presentando déficit de heterocigotos, al haber una Ho significativamente inferior a la He($p < 0.05$). Así mismo, los altos valores de Fis obtenidos (0.52 en promedio) indican disminución de la heterocigosidad, atribuible a

endogamia; el valor de dicho coeficiente fue muy superior a lo reportado por Barrera, *et al.* (2007) para las tres razas criollas colombianas (0.29 en Zungo, 0.26 en San Pedreño y 0.17 en Casco de mula). La heterocigosidad observada H_o promedio en el grupo de cerdos criollos del Departamento de Chocó fue de 0.32, inferior a lo reportado por Barrera *et al.* (2007) para las tres razas criollas colombianas (0.55).

5.3.4 Diferenciación entre poblaciones:

El test exacto de Raymond and Rousset (1995), que determina la diferenciación génica y genotípica entre las poblaciones, mostró valores de p altamente significativos ($p < 0.05$) entre el cerdo criollo del Departamento de Chocó y las razas Zungo San Pedreño, Casco de mula y comerciales.

El estadístico F_{st} , indicador de la diferenciación entre grupos para todos los loci fue de 0.12, lo cual indica una moderada diferenciación genética entre las agrupaciones analizadas.

El análisis de las muestras del Chocó vistas como individuos de tres ríos o regiones distintas (no tan separados geográficamente), que son los ríos Baudó, El Valle y Dubasa, generó un F_{st} de 0.03 indicando que realmente los animales de los tres ríos del Chocó se comporta como una sola población.

5.3.5 Relación genética entre las agrupaciones analizadas

El análisis realizado con el coeficiente de Dice Nei-li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA, permite indagar (con muy pocos datos) la relación genética de los cuatro grupos de razas criollas colombianas y uno de razas comerciales, permitiendo definir la cercanía existente entre dichos grupos de cerdos, ver en la figura 7.

Tabla 8: Nei's (1978) unbiased minimum distance.

Population	1	2	3	4	5
1	*****				
2	0,1699	*****			
3	0,1722	0,1833	*****		
4	0,0790	0,3519	0,4347	*****	
5	0,1984	0,0296	0,0500	0,4315	*****

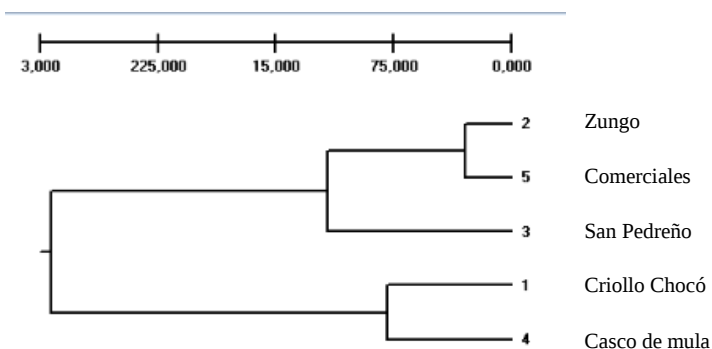


Figura 7: Dendrograma de distancia genética de 53 muestras del cerdo criollo del Departamento de Chocó basado en el coeficiente de similitud de Dice Nei-Li (1978).

Los individuos más cercanos fueron los del grupo de cerdos de la raza Zungo y las muestras comerciales provenientes de la granja (Palmira) y estos se agruparon a su vez con la raza San Pedreño. Se pudo observar también cercanía entre los cerdos criollos del Departamento de Chocó y el grupo de la raza Casco de mula.

VI CONCLUSIONES

1. En vista del bajo número de alelos observados y el bajo porcentaje de Heterocigosidad de los tres Microsatelites analizados se aprecia baja diversidad genética para el grupo de cerdo criollo del Departamento del Chocó, Colombia.
2. La población de cerdos criollos del Departamento de Chocó mostro desviación del Equilibrio de Hardy y Weinberg. Así mismo, un alto índice de fijación F_{is} que revela un déficit de heterocigotos, atribuible muy posiblemente a efectos de endogamia.
3. El análisis de la muestra de cerdos de los tres ríos o regiones distintas (no tan separados geográficamente), generó un F_{st} de 0.03 indicando que realmente los animales de los tres ríos del Departamento de Chocó se comporta como una sola población.
4. Con el bajo número de Microsatelites y de muestras para comparar, la información generada aun no es confiable y es prematuro sacar conclusiones con respecto a la diversidad genética de los cerdos criollos del Departamento de Chocó. El trabajo se realizó con la finalidad de hacer un ejercicio académico en el que se logró la adquisición de conocimientos y destrezas en cuanto a la aplicación práctica de la técnica molecular de marcadores Microsatelites, el empleo del software TFGA y el análisis de sus resultados; se resalta también la contribución que este trabajo practico hace al estudio que se está llevando a cabo actualmente con un total de 19 marcadores Microsatelites en cerdos criollos del toda la región Pacífica colombiana.

VII RECOMENDACIONES

1. Premura del tiempo: no alcanza para un trabajo de este tamaño.
2. Para realizar un trabajo de diversidad genética hay que procurar utilizar el número de muestras que recomienda por la FAO (de 30 a 50 individuos) para obtener datos comparativos más precisos y con un número de Microsatelites no menos de 20.
3. Utilizando BSA pudimos obtener mejores resultados en la amplificación de los Microsatelites utilizados en la técnica PCR.
4. Honduras posee un gran potencial biológico y el estudio de la diversidad genética es una herramienta para dar a conocer la importancia de sus especies y utilizarlas en un futuro en programas de mejoramiento Fito y zoogenéticos.

VIIIBIBLIOGRAFÍA

Andrade, AT; Solís, RL. 2007. Marcadores moleculares. *La ciencia y el hombre. México. 18(1).*

ARANGUREN, J. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación. (2002). Universidad Autónoma de Barcelona. Programa de Doctorado de Producción Animal.

Baca, BE; Torres, AG. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. UNAP, México. 3(23): pp. 16-21.

BARRERA, G. MARTÍNEZ, R. ORTEGÓN, Y. MORENO, F. VELASQUEZ, H.

BENITEZ, O. SANCHEZ, M. (2001). Los cerdos locales en los sistemas tradicionales de producción. Estudio FAO producción animal y sanidad animal 148. FAO: Roma Italia. P. 1-4.

Barrera, HA; Rodríguez IP. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. (En línea). Ciencia UANL, México. 7(003): pp. 323-335.

Carrera, A; Helguera, M; Picca, A; Salomón, N. 2004. Marcadores moleculares. Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Argentina. V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.). Parte II, Cap. 4. Pp. 61-68.

CAUJAPE, J. 2006. Brujula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. EXEGEN Ediciones. Las Palmas de Gran Canaria. España. Pp.132.

DA SILVA, A. ALVES, A. REZENDE, S. ALBUQUERQUE, S. (2007). Utilización de Marcadores Moleculares Asociados a Características de Adaptación y de Producción en Razas Criollas de Brasil. Redbio VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología agropecuaria. Viña del Mar. Chile. 2007 http://www.redbio.org/encuentros/redbio2007/Presentaciones%5CArthur_Mariante.pdf.

ESCOBAR, J. (2006). Primera aproximación al problema de las basuras marinas en el Pacífico colombiano. Comisión Permanente del Pacífico sur- CPPS. Secretaría ejecutiva del plan de acción del Pacífico sudeste. Plan de acción para la protección del medio marino y áreas costeras del pacifico sudeste. 2006.

FAO. (2007). The Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration on Animal Genetic Resources. International technical conference on animal genetic resources for food and agriculture. Interlaken, Switzerland, 3 – 7 September 2007.

García, HP. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIAV, Cuba. 1(2): pp. 31-41.

GROENEN, M.A.M. JOOSTEN, R. BOOSCHER, M-Y. AMIGUES, Y. RATTINK, A. HARLIZIUS, B. VAN DEL POEL, J.J. CROOIJMANS, R. (2003) The use of microsatellite genotyping for population studies in the pig with individual and pooled DNA samples. Archivos de Zootecnia. 52: 145-155. (2003).

Hernández, GM. 1999. Método de caracterización de proteínas: electroforesis en gel de poliacrilamida. UNA, Costa Rica. Práctica 3. Pp. 34-42.

Kornblihtt, AL; Satz, ML. 1993. La reacción en cadena de polimerasas. El método y sus aplicaciones. Ciencia hoy, revista de divulgación científica y tecnológica de la asociación Ciencia Hoy. 4(23).

Lavaire, EL. 2009. Establecimiento de un banco de ADN de la colección nacional de aguacate de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).

Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura, Honduras. Pp.55.

Londoño, A. 2003. Ubicación del campus universitario. UNAL, CO. Página web de la Universidad Nacional de Colombia.(www.palmira.unal.edu.co).

Lozada, MM. 2005. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Monografías, Biología. 12 pp.

Morales, IB. 2008. Electroforesis. Instituto Evandro Chagas, México. 1-4 pp.

Perez, E. (2006) Caracterización genética del cerdo Criollo Cubano utilizando microsatélites, una contribución a la conservación de la diversidad genética de la raza. XVI FORUM DE CIENCIA Y TECNICA UNIVERSIDAD DE GRANMA-FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA.

Martinez, A. Vega, J.L. (2007) Caracterización genética de la diversidad interracial del cerdo ibérico. Diputación de Córdoba, Universidad de Córdoba. España.

MUÑOZ, J.E. MORILLO, A. MORILLO, Y. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Revista Acta Agronómica*. Vol 57, No 4

MAGNI, C. (2005). Principios de genética de poblaciones: introducción, conceptos básicos y herramientas de medición de la diversidad genética. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

MARTINEZ, A. RODERO, A. VEGA, J.L. (2000). Estudio con microsatélites de las principales variedades de ganado porcino del tronco ibérico. Universidad de Córdoba España. *Archivos de zootecnia*. Junio, año/vol. 29 número 185-186.

MARTÍNEZ, A. PÉREZ-PINEDA, E. VEGA-PLA, J. BARBA, C, VELÁZQUEZ, F Y DELGADO, J. (2005). Caracterización genética del cerdo criollo cubano con microsatélites (2005).

MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO RURAL (2003) Situación de los recursos zoogenéticos en Colombia. En [ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Colombia.pdf](http://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Colombia.pdf).

OCAMPO, L. LETERME, P. (2003) Caracterización de los sistemas de producción porcinos en la cuenca del río Baudó. Departamento del Chocó- Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

OSLINGER, A., ALVAREZ, L. A., ARIZA, F., MORENO, F., POSSO, A., MUÑOZ, J. E. (2007). Diferenciación de las razas de cerdos Zungo, San Pedreño y Casco de Mula con la técnica RAMS (RandomAmplifiedMicrosatellites). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20:4, 2007. P. 533.

PEÑA M.; MORA C. (1977). Historia de Colombia. Norma. Bogotá.

Region Pacifica Colombiana en línea consultada el 16 de junio del 2011 disponible en <http://www.colombianparadise.com/destinos/pacifico.html>

PEREZ, J. ABUABARA, Y. (2007). Cerdo Criollo Colombiano. Caracterización racial, productiva y genética. CORPOICA. P. 41.

ANEXÓS

Anexo 1 Protocolo de Salting Out para la extracción de ADN propuesto por Miller et al. 1988.

1. Tomar entre 0.2 y 0.5 ml de sangre total y agregarla en 0.5 ml de solución lisis en un tubo de ependorf, de 1.5 ml.
2. Mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
4. Voltear suavemente en tubo para descartar el sobrenadante y evitar que se salga al precipicio, escurrir en una servilleta limpia.
5. Adicionar 1 ml de solución de lisis I y mezclar por inversión, hacer vortex hasta desbaratar lo más posible el pellet o usar una punta resistente para desbaratar.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min. Descartar en sobrenadante.
7. Repetir el paso 5 y 6 hasta conseguir un pellet de color totalmente blanco o transparente (2 o 3 veces más).
8. Agregar al precipitado 400µl de solución de lisis II y 20 µl de proteinasa K (10ng/µl).
9. Incubar por 30 min. y a 56 C y hacer vortex se puede dejar por más tiempo e incluso hasta el siguiente día.
10. Agregar 300µl de solución de NaCl 5 M, hacer vortex por 30 a 60 segundos y luego centrifugar a 14000 rpm por 12 min.
11. Pasar 350µl de sobrenadante a un tubo nuevo de ependorfco 900µl de etanol absoluto frio, mezclar suavemente por inversión observar la malla de DNA, este paso se deja hasta el siguiente día a -20c.
12. Centrifugar a 14000 rpm por 12 min.
13. Descartar suavemente el sobrenadante para evitar perder el pellet.
14. Agregar 1 ml de etanol al 70% mezclar por inversión por 2 min y centrifugarlo a 14000 rpm por 5 min.
15. Descartar suavemente el sobrenadante y dejar secar el pellet por 20 min en la cabina de extracción de gases.
16. Adicionar 100 µl de solución TE 1X, si el pellet es aun viscoso, agregar más de la solución.
17. Dejar para la determinación de la concentración al menos 5 min a 37 C o toda la noche a temperatura ambiente.

Anexo 2.Imágenes del Cerdo Criollo de Pacifico Colombiano.



Figura 8: Sistema de producción del cerdo criollo del pacifico colombiano utilizado por los pobladores del departamento del Chocó, Colombia.



Figura 8: el cerdo criollo del departamento de Chocó, Colombia también se encuentra en libertad y se desplaza de una comunidad a otra porque no tiene un control.