

01673



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

829.

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL CERDO PELÓN MEXICANO (Sus scrofa) MEDIANTE EL USO DE MARCADORES GENÉTICOS A NIVEL ADN.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN PRODUCCIÓN ANIMAL: GENÉTICA

PRESENTADA POR

FRIDA SALMERON SOSA

ASESORES:

DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES

DR. PEDRO OCHOA GALVAN

268633



México, D.F.

Octubre de 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Oscar Cortés Salmerón

Por ser el motor que le da mayor impulso a mi vida, gracias hijo por tu paciencia, sacrificio y comprensión en las duras jornadas, este trabajo también fue tuyo.

A mis Padres Gloria S. y Esteban A.S.

Por haber hecho de mí todo lo que soy, por su cariño y por esta hermosa vida, con todo mi amor.

A Oscar

Por ser el compañero de mi vida. Gracias por nuestro hijo, por tu amor y por esta paz que ha transformado nuestras vidas.

A Rogelio Alonso

Por tu amistad, apoyo, paciencia y por los enormes conocimientos que adquirí a tu lado.

A mis queridos hermanos

Adriana, Arcelia, Esteban y Gloria por todo su cariño, por ser tan solidarios y por todo lo que compartimos en la vida, con todo mi amor.

A todos mis amigos

A todos aquellos que de cualquier forma me han hecho sentir su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina -UNAM, a cargo del DR. Rogelio Alonso Morales. Mi más sincero agradecimiento por la ayuda que todos los que integran este laboratorio me brindaron.

Gracias al CONACYT ya que este trabajo fue financiado por donativo al proyecto No.0114P-B9506.

Gracias por su financiamiento a PAPIIT proyecto No. IN2007976.

Gracias a los MC Raúl Ulloa Arvizu y al MC Clemente Lemus por su gran desempeño en el análisis de los resultados, por su ayuda y por su amistad, en realidad este trabajo también lo es de ustedes.

Gracias al Dr. Carlos Sosa Ferreira por su apoyo en el desarrollo de las fórmulas iniciales para el cálculo de los IS.

Gracias a mis colegas:, Antonio Santibañez. Senovio Avellaneda y a Efrén Estrada, por que sin su gran ayuda para la colección de muestras este trabajo no hubiera sido posible

Gracias Dr .Pedro Ochoa por el apoyo que me ha brindado siempre.

Gracias a Lupita Sánchez y a Belém Huerta, en docencia y laboratorio respectivamente ,porque sin su ayuda desinteresada no hubiese sido posible este trabajo.

Declaración

La autora da consentimiento a la **División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México** para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Frida Salmerón Sosa', written over a diagonal line.

Frida Salmerón Sosa

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS Y DISCUSION	24
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31
CUADROS, GRAFICAS Y FIGURAS	36

RESUMEN

SALMERON SOSA FRIDA. Análisis de la Diversidad Genética en el cerdo Pelón Mexicano (*sus scrofa*) mediante el uso de Marcadores Genéticos a nivel ADN. Bajo la dirección de los PhD Rogelio Alejandro Alonso Morales y Pedro Ochoa Galván.

La diversidad genética fue analizada, utilizando huellas genéticas de ADN en experimentos tipo southern y empleando como sonda el oligonucleótido sintético (GGAT)₅, que reveló patrones polimórficos de bandas. A partir de la frecuencia de bandas presentes y bandas compartidas se midió el índice de similitud (IS), heterocigocidad (He), y la distancia genética existente dentro y entre poblaciones en 3 poblaciones de cerdo Pelón Mexicano (PG, PN1, PN2) y 2 poblaciones de raza Landrace (L1, L2). Se observó que poblaciones de CPM tienen en general mayor variabilidad genética y valores más bajos de IS. Los valores de IS fluctuaron entre 0.31 y 0.58. Los valores medios de He estimados presentaron un rango entre 0.41 y 0.80, donde se observó una correlación negativa con el IS ($r=-0.97$, $p<0.005$). En las poblaciones de CPM y L1 se observaron valores altos de heterocigocidad. Las mayores distancias genéticas, se observaron entre las poblaciones de Cerdo Pelón Mexicano y Landrace. Se observó que los Cerdos Pelón Mexicano de las diferentes regiones se agruparon juntos en un dendograma de relaciones genéticas.

Genetic Diversity Analysis in the Mexican Hairless Pig (*sus scrofa*) using DNA Genetic Markers.

Summary

The genetic diversity in the Mexican hairless pig was analyzed, by DNA fingerprinting.

This was revealed by southern blot experiments using as probe the synthetic oligonucleotide GGAT₅. This probe showed a complex and polymorphic banding pattern that was used as genetic markers. Estimating the frequency of individual bands and assessing the shared bands between individual it was obtained a similarity index (SI), a heterozygosity value (He) and genetic distances existent within and between populations.

It was studied 3 Mexican hairless pig populations from different regions (PG PN1, PN2) and 2 Landrace breed populations (L1, L2). It was observed that the Mexican hairless pig populations (CPM) in general showed lower SI values (0.31 to 0.58) than the Landrace populations. The average He values were between 0.41 to 0.80. A negative correlation between SI and He was observed ($r = -0.97$, $p < 0.05$). The highest heterozygosity values were observed on CPM and L1 populations. The largest genetic distances were among the Mexican Hairless pig and Landrace populations. The Mexican Hairless pigs of the different regions were grouped together in a dendrogram depicting genetic relationships. This study suggested the Mexican Hairless pig conform genetically heterogeneous populations distantly related to modern pig breeds.

INTRODUCCIÓN

El cerdo juega un papel muy importante dentro del marco nutricional, esto está determinado por sus características biológicas; un corto ciclo reproductivo, rápido ritmo de crecimiento así como una alta capacidad para transformar el alimento que consume en proteína (Cenobio, 1993).

Por otro lado, el cerdo es similar al ser humano en su fisiología, pues desarrolla úlceras estomacales y enfermedades circulatorias parecidas a las que sufre el hombre. Es importante señalar que el cerdo es más semejante al ser humano que los animales comunes de laboratorio (como el ratón, la rata y el perro) por lo tanto puede ser un conveniente modelo experimental en medicina o farmacología. Es un animal que sin duda junto con los primates puede contribuir al desarrollo y conocimiento de la Biología humana (Baldizon, 1971).

El papel que juega en la alimentación es sin duda en estos momentos importante, ya que el consumo de carne de cerdo en México en los últimos años se ha incrementado. En la actualidad el consumo per cápita de carne de cerdo en el país es de 19 kg. al año; y la mayor proporción de este consumo es en áreas urbanas ya que la porcicultura rural tiene una economía principalmente de autoconsumo. Se estima que de los tipos de explotaciones porcinas que existen en México, el 30% son explotaciones tecnificadas; 30% semitecnificadas; y 40% de traspatio (Rojas, 1994).

En las regiones tropicales el sistema de producción es básicamente de traspatio (Rojas, 1994) y el tipo de cerdo más utilizado es una variedad nativa conocida como Cerdo Pelón Mexicano por lo que representa una alternativa en la porcicultura de esta zona porque son animales de gran rusticidad que aprovechan gran cantidad de plantas forrajeras, frutas, raíces, tubérculos y subproductos agrícolas; razón por la que son explotados bajo un sistema de pastoreo poco tecnificado, en el que por lo regular no se les aplica ningún tipo de prevención contra las enfermedades más comunes, por que se piensa que presentan alta resistencia a las enfermedades de manera natural (Cárdenas; 1966; Castro 1981; Cenobio, 1993).

Debido a la constante introducción de razas mejoradas de cerdos en las explotaciones porcícolas, el cerdo pelón mexicano esta en peligro de extinguirse como grupo genético puro, principalmente por los cruzamientos con razas mejoradas, además debido a que el cerdo Pelón es considerado una variedad no mejorada y sin atributos comerciales, ya que hasta ahora ha sido criada sin programas de selección ni cruzamientos sistematizados (Salinas, 1996) por lo que estos cerdos dejan de ser utilizados como pié de cría. Sin embargo se debe considerar que su constitución genética es un recurso único y no renovable. La cuestión general que plantea esta situación es si esta variedad debería o no ser conservada y un argumento a favor es que no conocemos que tipo de

animales necesitaremos en el futuro, por lo tanto es necesario conservar toda la variación genética disponible como una forma de asegurarnos contra el futuro desconocido (Nicholas, 1990). En segundo lugar es muy probable que las poblaciones de cerdos pelones posean algunas características útiles determinadas genéticamente, especialmente en lo que se refiere a resistencia a enfermedades y a la adaptación a las condiciones climáticas extremas del trópico (Cárdenas, 1966; Castro, 1981; Cenobio, 1993).

Estas poblaciones constituyen recursos genéticos valiosos, porque son reservorios de diversidad genética única que podrían enriquecer y renovar en un futuro la variabilidad genética de las líneas comerciales de cerdos. El cerdo Pelón puede representar una base importante para el mejoramiento de animales comerciales que se deseen introducir a condiciones tropicales mediante la creación de líneas sintéticas, o como punto de partida para la creación de nuevas razas porcinas autóctonas mejoradas

REVISIÓN DE LITERATURA

Los actuales cerdos indígenas mexicanos son conocidos con el nombre de Pelón Mexicano, Cuino y Pata de Mula (Flores, 1977).

Una hipótesis aceptada por la mayoría es que el ganado porcino no existía en América a la llegada de los conquistadores. De acuerdo a ello no existían individuos del género *Sus* en América antes del año 1492, sin embargo en 1965 se realizó el estudio de un cráneo de suideo encontrado bajo la lava del Pedregal de San Angel, México D.F. en el que fue utilizado el método de carbono 14 radioactivo para determinar su antigüedad. Dicho estudio concluyó que el cráneo examinado pertenece al período preclásico (aproximadamente 500 años antes de Cristo) y que se trata de un individuo del género *Sus*, de tipo cóncavo y de características similares a las especies asiáticas o gran semejanza a los cráneos de los actuales tipos cóncavos, muy diferente al del jabalí americano (pecarí) y al jabalí europeo, sugiriendo inclusive el nombre de *Sus pedregalensis* sp. para esta especie. Razón que hace suponer que existió un tipo de cerdo en México antes de la llegada de los españoles a América y pensar acerca de su posible origen autóctono (Medina, 1965).

Una de las primeras especies animales introducida en la Nueva España fue el cerdo, el cual fue transportado a México por órdenes de Cortés en el año de 1522, proveniente de las islas de Cuba, Santo Domingo y Puerto rico. Todo parece indicar que de España llegaron cerdos ibéricos napolitanos y célticos, y probablemente en la famosa Nao de China, o bien antes, cerdos asiáticos, que actualmente tienden a desaparecer y que se conocen como cuinos (Vásquez, 1973). Por lo anterior se piensa que el cerdo pelón mexicano descende de una mezcla de cerdos de tipo ibérico, céltico y napolitano con cerdos de tipo asiático, perdiéndose y diluyéndose los grupos originales (Flores, 1977), de acuerdo con lo anterior como resultado de una extensa revisión, Salinas en 1996, apoya la hipótesis de que el cerdo Pelón Mexicano proviene de las razas traídas por los españoles durante la conquista.

El cerdo pelón mexicano poco a poco fue poblando el centro de la República y las costas del Golfo de México y del Pacífico principalmente, lugar donde todavía se le encuentra (Flores, 1977). Actualmente se localiza en el Golfo de México y costas del Pacífico Mexicano en los estados de Veracruz, Tabasco, Yucatán, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco, Colima, y Nayarit, entre otros (Rojas, 1994; Salinas, 1996; Tello y Cisneros, 1990).

Después de más de cuatrocientos años de haber sido introducido, el cerdo pelón mexicano está perfectamente adaptado a las zonas tropicales donde se encuentra. Tomando en cuenta que han pasado varios siglos de adaptación de este cerdo y su localización en el país se considera una variedad local (Vásquez, 1973).

Caracterización Morfofisiológica Del Cerdo Pelón Mexicano

Existen tres tipos de cerdo criollo Mexicano: Pelón Mexicano, Pata de Mula y Cuino, los tres actualmente considerados en peligro de extinción (FAO, 1994, Loftus, 1993)

Aunque el cerdo Pelón Mexicano es heterogéneo morfológicamente en este estudio se mencionan los rasgos más sobresalientes que algunos autores observaron.

El cerdo Pelón Mexicano se caracteriza por ser de color grisáceo, gris pizarra o negro pizarra, con ausencia de cerdas en toda la superficie de la piel (Cárdenas, 1966), al parecer hay marcada dominancia de los genes que dan la piel sin cerdas y en cruzamientos dirigidos con otras razas la segregación de esta característica se ha observado en más de un 80% en las crías de la primera generación (Salinas, 1996; Tello y Cisneros, 1990). Esta carencia de cerdas en la piel, facilita en la matanza su limpieza. También el hecho de carecer de pelo los hace más resistentes a la infestación de ectoparásitos (como piojos) que son comunes en las zonas donde este animal se desarrolla (Rojas, 1994).

Su cabeza es de tamaño medio en relación con el cuerpo, de perfil rectilíneo, frente angosta subcóncava en su línea media, cara larga y afilada, hocico recto y estrecho, ojos grandes y vivaces de color oscuro, las orejas de tamaño medio y dirigidas hacia adelante y hacia abajo tapando ligeramente los ojos (Cárdenas, 1966; Salinas, 1996).

Cuello corto, ancho y musculoso en su unión con la cabeza, y el cuerpo, con papada en las regiones laterales e inferior, el cuerpo es de talla mediana con una alzada promedio de 58 cm en adulto (Cárdenas 1966; Rojas, 1994). Aunque Salinas (1996) menciona que los machos tienen una alzada de 75 a 80 cm y las hembras de 65 a 70cm con una longitud de 1.40 a 1.50m. El pecho es angosto, costillares curvos, el perfil del cuerpo es convexo, dorso ligeramente rectilíneo (Cárdenas 1966; Salinas, 1996). La grupa es caída con poco desarrollo muscular, el jamón es pequeño y descarnado, la línea ventral es convexa, los miembros son fuertes y largos, la cola esta bien implantada y larga, aproximadamente de 15 a 20 cm Su tren posterior es más alto que el anterior (Cárdenas, 1966; Castro, 1981).

Otras medidas zoométricas reportadas en la literatura son: perímetro torácico 98.05cm; longitud de la grupa 26.81cm y anchura de la grupa 21.21cm (Cárdenas, 1966). El cerdo pelón es un animal que se ha orientado a la producción de grasa por el tipo de alimentación a la que ha sido sometido, aunque de acuerdo con un estudio al respecto Cárdenas (1966), concluye, por las medidas corporales e índices zoométricos obtenidos en su estudio, que el cerdo Pelón es de tipo longilíneo y su conformación los hace aptos para la producción de carne.

Las cerdas no son prolíficas, se han observado camadas de 8 animales en promedio (Rojas 1994). Cenobio (1993), reporta que el número de lechones nacidos vivos en promedio es de 6.548 y el promedio de lechones destetados es de 3.83; Castro (1981) reporta como tamaño de la camada al nacer una estimación que fluctúa de 6.43 a 7.58 cerdos en promedio. Tello y Cisneros (1990) observaron un tamaño de camada de 7.5 lechones y 6 lechones destetados en promedio. Al revisar datos al respecto en algunas razas comerciales Trujillo y colaboradores (1994) reportan tamaños de camada de 9.41 en Landrace, 8 en Yorkshire, y 9.37 para Duroc. Rosas (1992) reporta como promedio de tamaño de camada en cerdos Landrace 8.86 lechones y 9.35 lechones para la raza Yorkshire. Otras características reportadas en el cerdo Pelón Mexicano son: conversión alimenticia, 3.847; peso final a los 180 días, 71.25 Kg; consumo de alimento a 180 días, 226.7kg; ganancia de peso total, 60.14 Kg; peso al nacimiento, 1.098 Kg; peso al destete 6.19 Kg; porcentaje de supervivencia en lactancia 82.77% (Tello y Cisneros, 1990).

En 1971 se realizó un estudio sobre los parámetros hematológicos del cerdo Pelón Mexicano, con una muestra de 38 animales, y no se encontraron diferencias con los valores reportados en otras razas de cerdos comerciales (Baldizon, 1971).

El cerdo Pelón Mexicano corresponde a la especie *Sus scrofa domesticus*, con 38 cromosomas (18 pares autosómicos, y un par sexual), Rodríguez y colaboradores (1994) estudiaron la morfología cromosómica de 14 cerdos Pelón Mexicano, y al respecto reportan que no observaron aberraciones cromosómicas estructurales; pero sí alteraciones numéricas en 3 de los 14 animales en estudio, encontraron presencia de poliploidías que variaron del 1-5% en los núcleos observados, pero concluyeron que este animal presenta un cariotipo igual al de otras razas de cerdos comerciales y que el porcentaje de poliploidías encontradas es compatible con la vida.

Se ha observado que algunos animales presentan un gen de carácter dominante que origina sindactilia (Rojas, 1994).

Por otro lado, el conocimiento sobre la variabilidad genética en el cerdo pelón es nulo, no se conoce que tan homogéneos son los distintos grupos poblacionales en las diferentes regiones geográficas. No hay información acerca de que tan parecidas o distantes son genéticamente las diferentes poblaciones de cerdo Pelón, así como tampoco se sabe que tan diferentes son éstos de las razas comerciales, y existen dudas sobre su origen.

Es importante conocer la variabilidad genética en estos animales para poder tomar decisiones respecto a su preservación. De modo que si la diversidad es grande, las medidas para su preservación se dictarían en base a la necesidad de conservar poblaciones de diferentes lugares. Por lo contrario, si la diversidad es pequeña se podría conservar una población menos numerosa y de cualquier zona geográfica.

El empleo de marcadores genéticos hipervariables a nivel ADN es uno de los recursos metodológicos para evaluar la diversidad genética en poblaciones animales (Stamp, 1987). Actualmente, cada vez más esquemas de análisis y mejoramiento genético tradicionales en diversas especies animales proponen la incorporación de información genética a nivel molecular (Botstein y colaboradores, 1980). En este sentido, la utilización de marcadores genéticos se empieza a emplear como una poderosa herramienta en selección; conocimiento del genotipo de los individuos; mapeo genético, estimación del grado de parentesco; etc., por citar algunos ejemplos (Dentine, 1992).

Con las nuevas oportunidades utilizando técnicas de biología molecular para observar polimorfismos contenidos en loci específicos, algunos investigadores han sugerido que eventualmente la información genética a nivel molecular podría reemplazar completamente a los registros de comportamiento productivo (Dentine 1992).

ADN (Acido Desoxirribonucleico)

Existen distintos tipos reconocidos de ADN en las células de los mamíferos, el tipo más común de ADN, 70%, es el formado por secuencias de copia única. Estas secuencias están dispersas por todo el genoma, la mayoría de los genes forman parte de este ADN.

Un segundo tipo de ADN es el denominado ADN repetitivo-disperso. Las secuencias que se repiten se denominan unidades de repetición, estas se encuentran intercaladas entre los segmentos de ADN de copia única, y están igualmente dispersas por todo el genoma. De este ADN hay dos tipos dependiendo de la unidad de repetición, los mini y microsátélites, los cuales están formados por repetidos en tandem. Se tienen además los repetidos de copia única, entre los cuales se encuentran los retrotransposones como las secuencias SINES y LINES.

El restante ADN se denomina ADN satélite debido a que su densidad es diferente de la del resto del ADN. El ADN satélite se puede obtener cuando el ADN total de la célula se somete a una centrifugación en gradiente de densidad en cloruro de cesio u otro compuesto semejante. Este proceso separa el ADN total en diversas fracciones de acuerdo con su proporción de guanina (G) + citocina (C); debido a que los pares de base G-C son más pesados que los pares A-T. El ADN rico en G-C llegará más lejos a través de un gradiente de cloruro de cesio. El ADN satélite es altamente repetitivo lo que quiere decir que consta de una o varias unidades de repetición organizadas en forma de tandem, cada una de las cuales está repetida muchas veces (hasta 10^6). El ADN satélite no está

disperso por el genoma, se encuentra en las regiones de heterocromatina constitutiva, localizado en casi todos los centrómeros (Nicholas, 1990).

En resumen se puede concluir que el genoma de los mamíferos en general está formado por aproximadamente: 70% de ADN de copia única; 20% de ADN repetitivo-disperso; 10% de ADN satélite (datos referentes al genoma humano ya que no hay estudios semejantes en otros animales domésticos).

El análisis molecular de los genomas de organismos eucariotes ha mostrado que existen diversas y abundantes poblaciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear con extensa variabilidad. Esta diversidad existente a nivel del ADN, inicialmente fue detectada como polimorfismo en fragmentos de restricción (Dentine, 1992, Botstein y colaboradores, 1980, Stam, 1987) y ha sido propuesta como la fuente de un gran número de marcadores genéticos que se requieren para establecer un mapa genético de alta resolución del genoma humano (Botstein y colaboradores, 1980). Estos métodos diseñados para implementar a gran escala programas de genotipificación en humanos pueden ser adaptados al genoma de algunas especies como bovinos, aves y cerdos. (Dentine 1992).

Las secuencias de ADN que exhiben hipervariabilidad genética son generalmente secuencias de baja complejidad que se encuentran altamente repetidas, organizadas en tandem y dispersas por el genoma, Estas secuencias se caracterizan por presentar un extenso polimorfismo genético (Nakamura y colaboradores, 1987).

Un grupo de estas secuencias son conocidos como "minisatélites". Estas secuencias de ADN son muy ricas en las bases guanina y citocina (62%) y presentan unidades de repetición de 9-64 pares de bases que llegan a extenderse por varios kilobases. La secuencia básica de repetición en muchos minisatélites es GGGCAGGANG. Existen diversas familias de minisatélites las cuales a su vez forman numerosas subfamilias que son altamente polimórficos: el 70% de éstos loci tienen más de 3 alelos (Armour y Jeffreys, 1992; Jeffreys y colaboradores, 1991). La manera de revelar el polimorfismo de los minisatélites es a través de experimentos de tipo "southern blotting", que consisten en digerir el ADN (una vez que ha sido extraído de las células) con una o varias enzimas de restricción; mediante electroforesis en gel, los distintos fragmentos de ADN resultantes se separan y ordenan por tamaño (se obtiene así un barrido difuso) Los segmentos del ADN se transfieren a una membrana de nylon que posteriormente se hibrida utilizando una sonda génica marcada con radioactividad u otros medios. La sonda busca y se "ancla" en las secuencias complementarias a la secuencia de la sonda (hibridación) (Jeffreys y colaboradores, 1991). El resultado es sumamente complejo, ya que llegan a detectarse de 20 a 50 bandas diferentes. Puesto que estas bandas son sumamente polimórficas en las poblaciones y en su conjunto generan patrones exclusivos de un individuo, estos han sido llamados huellas digitales del ADN o "DNA Fingerprints". Estos son patrones multilocus, ya que cada una de las

bandas reveladas representa un locus genético distinto donde se alojan diversos alelos miembros de una familia particular de minisatélites. Debido a que estos patrones de bandeo multilocus son sumamente complejos es muy difícil reconocer los diferentes alelos que corresponden a las decenas de loci independientemente detectados y realizar un análisis genético directo. sin embargo, estos patrones de bandeo multilocus han sido usados en el ser humano con gran éxito en medicina forense, pruebas de paternidad, determinación de cigocidad en gemelos, análisis de ligamiento genético, estudios de trasplantes de tejidos, entre otras aplicaciones (Armour y Jeffreys, 1992; Jeffreys y colaboradores, 1991; Epplen y colaboradores, 1991; Gilbert y colaboradores, 1991; Georges y colaboradores, 1988)

La huella genética de ADN ("fingerptinting") es un método apropiado de Genética Molecular para estudiar poblaciones genéticas por las siguientes razones: a) Los minisatélites no son seleccionados porque no influyen en la viabilidad, lo cual da como resultado un alto grado de polimorfismo en los loci; b) La mayoría de los minisatélites están dispersos al azar en el genoma; c) Las huellas genéticas de ADN proporcionan más información en un solo ensayo (Mannen, 1993).

Algunos minisatélites como M13, pUCJ, y pSP2.5RI han sido utilizados como sondas que revelan en cerdos huellas genéticas de ADN que ha sido digerido con la enzima HaeIII (Georges y colaboradores, 1988).

Si los minisatélites se clonan y emplean como sondas en hibridación southern a alto rigor, es posible identificar locus específico (Armour y colaboradores, 1990, Nakamara y colaboradores, 1987). En este caso el análisis genético es más fácil, ya que uno podría identificar los alelos que componen un sólo loci, por esto muchas veces se prefiere emplear sondas locus-específicas altamente polimórficas.

Otro grupo de secuencias altamente polimórficas son las conocidas como microsátélites (Darmanac y colaboradores, 1991; Epplen, 1988), éstas son secuencias altamente repetidas, dispersas por todo el genoma y organizadas también en tandem que presentan unidades de repetición de 2-5 pares de bases y por presentar un alto grado de polimorfismo genético, se les conoce también como Variantes en el Número de Repetidos en Tandem (VNTR's) (Nakamara y colaboradores, 1987; Epplen y colaboradores, 1991). Al igual que los minisatélites, cuando los microsátélites se utilizan como sondas en hibridación genómica tipo "southern blot" revelan "huellas genéticas del ADN" que se observan como patrones de bandas polimórficas, semejantes a un código de barras (Jeffreys y colaboradores, 1991).

Debido a que los microsátélites comúnmente se extienden por regiones no mayores de 200 pares de bases, los microsátélites también pueden detectarse fácilmente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Jeffreys y colaboradores, 1988).

Actualmente más de 300 microsátélites locus específicos han sido reportados en el genoma porcino y se han utilizado como marcadores en

la elaboración del mapa genético de esta especie (Roher y colaboradores 1994).

Los mini y microsátélites se encuentran presentes en todos los organismos eucariotes (Epplen, 1988; Georges y colaboradores, 1988). Igualmente, estas secuencias han sido detectadas en los animales domésticos y se están empezando a emplear en un gran número de aplicaciones. Las investigaciones y aplicaciones actuales del ADN hipervariable en animales domésticos se pueden enlistar entre los más sobresalientes se encuentran: Identificación y registro de individuos (Dunnington y colaboradores, 1990^b; Buitkamp y colaboradores, 1991); Análisis de paternidad y estudio de descendencia (Yassouridis y colaboradores, 1989); estudios poblacionales del grado de consanguinidad y heterogeneidad genética. (Dunnington y colaboradores, 1990^a; Gilbert y colaboradores, 1991); mapeo de mutaciones e identificación de portadores (Davis y colaboradores, 1988; Dunnington y colaboradores, 1990^b); valoración de distancias genéticas entre líneas o razas (Dunnington y colaboradores, 1990^a; Gilbert y colaboradores, 1991); conocimiento de la diversidad genética existente en poblaciones, así como el grado de parentesco con otras (Buitkamp y colaboradores, 1991; Gilbert y colaboradores, 1991); medición del grado de introgresión genómica en programas de cruzamiento y selección genética (Hillel y colaboradores, 1990); mapeo genético (Kuhnlein y colaboradores, 1991.); determinación del origen evolutivo de poblaciones, identificación de marcadores genéticos asociados a rasgos productivos y su empleo en selección animal (Dentine, 1992; Dunnington y colaboradores, 1990^b; Haley, 1991; Stam, 1987, Yassouridis y Epplen, 1989) .

Las Huellas genéticas de ADN han sido utilizadas en diferentes estudios de variabilidad genética por varios genetistas: en 1991 Dunnington y colaboradores compararon poblaciones con 31 y 16 generaciones de selección divergente en aves White Plymouth Rocks y White Leghorns respectivamente; Gilbert, y colaboradores (1991) realizaron un estudio de parentesco, diversidad genética y consanguinidad en poblaciones de leones africanos; Wetton y colaboradores (1987) calcularon coeficientes de similitud en un estudio demográfico de poblaciones silvestres de gorriones; Ellegren y colaboradores (1992) compararon la variabilidad genética en cuatro razas de caballos; Habersfeld y colaboradores (1992) estimaron distancias genéticas en cruzamientos de aves Plymouth Rock, por mencionar algunos ejemplos.

Diversidad Genética

Desde el punto de vista zootécnico el término raza se utiliza para designar un conjunto de animales que perteneciendo a la misma especie, poseen cierto número de caracteres morfológicos y fisiológicos semejantes transmisibles por herencia, ya que poseen identidad génica en aquellos caracteres étnicos que se consideran imprescindibles. (Berruecos, 1972; Aparicio, 1987)

El parecido del genoma dentro de poblaciones, y la diferencia del mismo entre ellas es el resultado de diferentes procesos de selección ya sea natural o sistematizada.

La diversidad genética se describe como la variación debida a la constitución genética, existente entre y dentro de poblaciones, que puede ser estudiada y evaluada por medio de diferentes métodos, la variabilidad genética es muy importante por que da al individuo capacidad de adaptación a diferentes medios ambientes (Kotzé y Muller, 1994)

Anteriormente para estudiar la diversidad existente se utilizaban experimentos clásicos denominados pruebas de comportamiento al azar, donde todos los factores ambientales se estandarizaban para todos los grupos genéticos en estudio (proporcionando mismo manejo, alojamiento y dieta a todos los individuos) de tal manera que las diferencias entre los animales eran adjudicadas únicamente al material genético de los individuos en estudio. Actualmente con la llegada de nuevas técnicas de biología molecular es posible evaluar de manera específica y directa esta diversidad, algunos métodos como Índice de Similitud, Heterocigocidad estimada, y Distancia genética han sido empleados de manera sistemática en los últimos años.

El término distancia genética se describe como el grado de diferencias genómicas entre poblaciones o individuos que son medidas por alguna cantidad numérica, de este modo el número de sustituciones de nucleótidos por sitio o número de substituciones génicas se considera una medida de distancia genética. Sin embargo, es usual referirse a la diferencia de genes como una medida de estimación de frecuencias alélicas (Nei, 1987).

El concepto de distancia genética inicialmente fue utilizado en estudios evolutivos, otros conceptos de estimación de diferencias en las medidas de poblaciones ya se habían desarrollado a principios de este siglo. Los métodos desarrollados fueron primeramente para clasificación de poblaciones en términos de características cuantitativas. Más tarde se implementaron estos métodos desde el punto de vista estadístico (Nei, 1987)

En 1964 Cavalli Sforza y Edwards construyeron el árbol evolutivo de las razas humanas en términos de las frecuencias génicas y para construirlo utilizaron una distancia genética basada en una transformación angular de frecuencias génicas sugerida por R.A. Fisher, al publicarse este estudio muchos genetistas se interesaron en este problema y varias medidas de distancias genéticas fueron propuestas (Nei 1987).

Nei (1987), propuso una medida de distancia genética con la cual se podía estimar el número de sustituciones de nucleótidos por locus entre dos poblaciones, utilizando esta medida de distancia intentó relacionar la dinámica de la frecuencia génica poblacional a la sustitución de nucleótidos en los genes.

Posteriormente surgió la clasificación de las medidas de distancias genéticas en dos grupos: medidas para clasificar poblaciones y medidas para estudios evolutivos. En las medidas de distancia genética para clasificación de poblaciones, la distancia propuesta originalmente por Czekanowski en 1909 fue establecida para características cuantitativas, pero puede ser utilizado para datos de frecuencias génicas. La diferencia media de Czekanowski es:

$$C_Z = 1/m \sum_{i=1}^m |X_i - Y_i|$$

Donde:

X_i y Y_i corresponden a las frecuencias génicas del i -ésimo alelo en un locus de la población X y Y respectivamente.

m = número de alelos.

La medida de Manhattan es una versión de la medida anterior

$$C_M = \sum_{i=1}^m |X_i - Y_i|$$

Ambas medidas son distancias métricas, su desventaja radica en que su valor máximo depende del número de alelos, además si no hay alelos compartidos entre las poblaciones estudiadas el valor de C_M es siempre 2 y es necesario realizar un ajuste de manera que su valor se sitúe entre 1 y 0

$$C_M \text{ ajustado} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^m |X_i - Y_i|$$

El Coeficiente de Semejanza Racial de Pearson (CRL) es una medida de distancia que fue propuesta originalmente para características cuantitativas que se estima:

$$CRL = 1/m \sum_{i=1}^m [(\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2 / (u_i/n_x + v_i/n_y)] - 2/m$$

Donde: \bar{x}_i y u_i corresponden a la i -ésima media y desviación estándar de la característica de la población x respectivamente.

\bar{y}_i y v_i corresponden a la i -ésima media y desviación estándar de la característica de la población y respectivamente.

n_x y n_y son el número de individuos examinados en las poblaciones x y y respectivamente.

m es el número de características utilizadas.

La distancia de Mahalanobis (D^2) fue propuesta como una extensión del coeficiente de Pearson, en el caso de que las características utilizadas estuvieran correlacionadas, pero esta forma modificada ha sido utilizada para datos de frecuencias génicas. Considerando m características cuantitativas, y X_i y Y_i son las medias de la i -ésima característica en las poblaciones X y Y respectivamente. Bajo el supuesto de que las varianzas

(vii) y covarianzas (v_{ij}) de las características son las mismas para las dos poblaciones, denominando a la matriz de varianzas y covarianzas como V . La distancia de Mahalanobis D^2 se define como:

$$D^2 = \sum_{y=1}^m \sum_{j=1}^m v_{ij} (\bar{x}_i - \bar{y}_i)(\bar{x}_j - \bar{y}_j)$$

Donde: v_{ij} es el elemento de i -ésimo renglón y la j -ésima columna de la matriz inversa de V

Por lo tanto D es la distancia geométrica entre dos poblaciones representadas en un espacio dimensional m . Si se divide esta D^2 entre m se obtiene el equivalente del coeficiente de Semejanza Racial de Pearson. Algunos autores han modificado D^2 para datos de frecuencias génicas. Otra medida de distancia es la propuesta por Rogers la cual supone que hay m alelos para un locus :

$$DR = \left[\frac{1}{2} \sum_{i=1}^m (x_i - y_i)^2 \right]^{1/2}$$

Donde : x_i y y_i son las frecuencias del i -ésimo alelo en las poblaciones x y y respectivamente.

Cada frecuencia alélica puede tener un valor de entre 0 y 1, de este modo es posible representar poblaciones X y Y en un espacio dimensional $- m$, que permite una interpretación geométrica simple. Cuando los datos de frecuencias génicas para muchos loci están disponibles, el promedio de este valor puede ser utilizado. Así como esta distancia puede ser utilizada para clasificación de poblaciones, también puede ser útil en la construcción de árboles filogenéticos, sin embargo no es proporcional al número de sustituciones de nucleótidos. Cuando se trabaja con poblaciones ambas polimórficas que no comparten alelos comunes, este valor puede ser mucho menor que 1. (Nei 1987).

Hoezel y Bancroft (1992), mencionan que cuando la Variación de ADN es medida directamente, los métodos de análisis se basan en varios supuestos: a) Los nucleótidos se distribuyen al azar en el genoma; b) La variación se produce solamente por sustitución de base; c) Las proporciones de sustitución son las mismas para todos los nucleótidos; d) Todas las bandas relevantes o fragmentos pueden ser detectadas, y bandas similares no son registradas como idénticas. Ellos definen "Distancia genética" como una medida de diversidad genética entre poblaciones expresada como una función de la frecuencia genotípica y presentan varias fórmulas que han sido propuestas, entre ellas algunas descritas por Nei, para analizar la variación genética en dos poblaciones X y Y , para lo cual hay que considerar primero la probabilidad de identidad de dos genes elegidos al azar para un locus (j_k) donde:

$$j_x = \sum x_i^2 \qquad j_y = \sum y_i^2$$

Donde: X_i y Y_i son las frecuencias de el i -ésimo alelo para un locus dado en las poblaciones X y Y respectivamente. Si hay dos alelos en este locus con frecuencias p y q entonces:

$$j = p^2 + q^2$$

La probabilidad de identidad de un gen para el mismo locus en poblaciones X y Y es:

$$j_{xy} = \sum X_i Y_i$$

La identidad normalizada entre poblaciones X y Y con respecto a todos los loci es:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde J_{xy} , J_x , y J_y son las medias aritméticas de, j_{xy} , j_x , y j_y respectivamente.

La distancia genética entre poblaciones X y Y entonces se define como:

$$D = -\ln (I)$$

En teoría, la relación entre D y tiempo es $t = 0.5 a D$ Donde: a es la proporción promedio del cambio detectable por locus por año. (Nei, 1987 da un estimado de $a = 10^{-7}$) y nótese que D no es un estimado de secuencia diferente.

Otras medidas para evaluar la variabilidad genética son las estimadas a partir del análisis de las bandas obtenidas a través de experimentos tipo southern blot, que revelan patrones de bandeo denominados huellas genéticas de ADN, como el promedio de diferencias porcentuales (PDP), el Índice de Similaridad o de Similitud (IS) y Heterocigocidad (He).

Gilbert et al (1991) propone el valor de diferencia porcentual promedio de los valores de bandas compartidas (DP), el cual se obtiene mediante la fórmula de diferencia porcentual:

$$DP = (F_{ab} / F_a + F_b) \times 100$$

donde:

F_{ab} representa el número de bandas que difieren entre dos individuos (a y b).

F_a es el número total de bandas en el individuo a .

F_b es el número total de bandas en el individuo b .

PDP es el promedio de valores DP en pares de comparaciones de todos los individuos en estudio y puede ser considerado como una aproximación de Heterocigocidad. (Gilbert et al (1991).

PDP es el complemento del valor definido como BC (Bandas Compartidas), método descrito por Jeffreys et al (1985), Lynch (1990)

y Mannen (1993). En general esta estimación consiste en obtener el nivel de bandas compartidas (BC) definido como la proporción del número común de bandas entre dos individuos y se calcula:

$$BC = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

Donde:

N_{ab} es el número de bandas compartidas entre los individuos N_a y N_b .

$N_a + N_b$ es el número total de bandas registradas en los individuos N_a y N_b .

Método a partir del cual se calcula el Índice de Similitud entre dos individuos para estimar el valor promedio de este Índice dentro y entre poblaciones.

El IS se puede utilizar de manera práctica estimándose entre los sementales y las hembras reproductoras disponibles en las explotaciones para poder elegir progenitores con valores menores de IS para aumentar el nivel de heterosis en los descendientes.

Stephens y colaboradores (1992) estimaron Heterocigocidad (He) utilizando huellas genéticas de ADN y establecen que cada banda observada en una huella genética se considera un alelo dominante y estimaron cada frecuencia alélica (x_k) a partir de la frecuencia de ocurrencia de la k -ésima banda (S_k) considerando los supuestos de que las bandas que conmigran juntas son los mismos alelos; que su modo de herencia es de dominancia completa y que estos genotipos están en equilibrio Hardy-Weinberg, entonces:

$$x_k = 1 - (1 - S_k)^{1/2}$$

quedando la fórmula de estimación de la Heterocigocidad como:

$$He = (2n / 2n - 1) \left[1 - \left(\frac{\sum_{k=1}^A x_k^2}{\sum_{k=1}^A x_k} \right) \right]$$

Donde: A = Número total de bandas observables en el gel.

n = Número de individuos.

De acuerdo a lo anterior, si cada banda del patrón de huellas genéticas se considera un alelo dominante, en equilibrio Hardy-Weinberg, entonces p es la frecuencia génica del alelo dominante, q es la frecuencia génica del alelo recesivo, donde la suma de las frecuencias genotípicas de todos los alelos es igual a:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

donde $2pq$ corresponde a la frecuencia de los heterocigotos. Entonces se puede decir que S_k en términos de la ecuación corresponde a $p^2 + 2pq$, debido a que no se puede distinguir un genotipo homocigoto dominante de un heterocigoto debido a que ambos individuos expresan la misma banda y por lo tanto la frecuencia del homocigoto recesivo, q^2 , es $1 - S_k$.

Con la estimación de estas frecuencias, puede ser calculada la distancia genética estandarizada de Nei, existente entre dos poblaciones como se ha mencionado ya.

Saitou y Nei, 1987 desarrollaron el método de "Neighbour Joining, que utiliza una matriz de relación de distancias estandarizadas de Nei, 1987, en la construcción de dendogramas para hacer un estudio más completo de la diversidad genética.

HIPÓTESIS

Debido a su posible origen Ibérico-asiático y a que la selección sistematizada ha sido escasa en el cerdo Pelón Mexicano, existe una gran heterogeneidad genética entre los grupos de este cerdo, así como una gran distancia genética entre éstos y los cerdos de razas comerciales. Además debido a que han existido cuellos de botella poblacionales, la variabilidad genética intrapoblaciones es baja.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

- 1) Evaluación como Marcadores Genéticos de diversos minisatélites y microsátélites para estudios genéticos en el cerdo utilizando huellas genéticas de ADN.
- 2) Estudio de la Variabilidad genética presente en estas poblaciones de cerdos nativos.
- 3) Estudio de las distancias genéticas entre diversas poblaciones del Cerdo Pelón Mexicano y razas de cerdos comerciales.

HIPÓTESIS

Debido a su posible origen Ibérico-asiático y a que la selección sistematizada ha sido escasa en el cerdo Pelón Mexicano, existe una gran heterogeneidad genética entre los grupos de este cerdo, así como una gran distancia genética entre éstos y los cerdos de razas comerciales. Además debido a que han existido cuellos de botella poblacionales, la variabilidad genética intrapoblaciones es baja.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

- 1) Evaluación como Marcadores Genéticos de diversos minisatélites y microsateélites para estudios genéticos en el cerdo utilizando huellas genéticas de ADN.
- 2) Estudio de la Variabilidad genética presente en estas poblaciones de cerdos nativos.
- 3) Estudio de las distancias genéticas entre diversas poblaciones del Cerdo Pelón Mexicano y razas de cerdos comerciales.

MATERIAL Y METODOS

Muestras.- Se colectaron 150 muestras totales de sangre de Cerdo Pelón Mexicano y de cerdos de razas comerciales de algunos estados de la República Mexicana: Guerrero (Municipios Cd Altamirano y Tlalchapa), Querétaro (Amazcala), Guanajuato (Salamanca), Jalisco (Los Altos) y Nayarit (Municipios: San Diego, Quiviquinta, Huajicori y Tamarindo) así como los cerdos Pelón Mexicano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM.

Del total de muestras colectadas sólo se utilizaron 68 muestras (que cumplieron los requisitos de no parentesco) 34 de cerdos Pelón Mexicano y 34 de razas comerciales, Landrace n=18 (L), Yorkshire n=5 (Y), Hampshire n=2 (H), Duroc n=5 (D) y Large White n=4 (LW), de ambos sexos.

Para evaluar los niveles de diversidad genética se empleó análisis de Huellas Genéticas de ADN o "DNA fingerprints" en experimentos tipo "southern" blot, cuyo proceso se describe a continuación.

Obtención de ADN Genómico Total.- A partir de la sangre se purificó el ADN genómico total.- A 500ml de sangre se agregó 1ml de ddH₂O (agua bidestilada estéril) y se centrifugó por 5 minutos a 4° C, se resuspendió la pastilla utilizando una solución de lisis a base de 10 mM Tris Hcl pH 8.0, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA y 0.5% SDS; se agregó la enzima ARNasa 10 µg/ ml y se incubó a 37°C por 30 min. enseguida se incubó a 50°C con proteinasa K 100 µg/ ml; por 3hr y 1 hr a 60°C, se adicionó solución NaCl 6 M, se centrifugó por 5 min a 4°C, y finalmente el ADN contenido en el sobrenadante se precipitó en un volumen de isopropanol, y se centrifugó por 5 minutos, la pastilla de ADN fue lavada dos veces con alcohol al 70%, finalmente la pastilla de ADN se suspendió en solución 1mM EDTA.

Digestión del ADN Genómico.- Se realizó la digestión de 20 µg de ADN a una concentración final de 0.01 µg/ µl agregando spermidina 1mM (concentración final) y 10 U de HaeIII, (cuyo sitio de reconocimiento es el palíndromo GGCC y corta las cadenas de ADN en el centro de la simetría produciendo extremos o bordes romos) en el buffer recomendado por los proveedores, incubando toda la noche a 37° C (técnica propuesta por Sambrook y colaboradores, 1989). Para monitorear la reacción se tomaron 20 µl de la mezcla de restricción a la cual se añadió 0.250 µg de ADN de fago Lambda (control). Al término de la incubación el control se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la digestión.

Transferencia Tipo Southern Blot.- Una vez digerido el ADN genómico, se corrieron 6 µg de cada muestra en un gel de agarosa al 1% de 25 cm de largo durante 40 horas a 50 volts (2000 hr/volts finales). Se empleó como marcador de pesos moleculares ADN de fago

Lambda digerido con BSTE II. El ADN contenido en este gel fue despurinado con una solución de HCl al 0.2 N por 10 minutos, desnaturalizado (con 1.5 M NaCl y 0.5 N NaOH) y neutralizado (con 1.5 M NaCl y 0.5 M Tris Hcl pH 8.0). durante 30 minutos respectivamente y de inmediato transferido a una membrana de nylon utilizando una unidad de presión controlada "posiblot" (Stratagene) con solución 10XSSC.

Minisatélites y Microsatélites que fueron evaluados.- A continuación se muestra un cuadro que contiene la información de los oligonucleótidos sintéticos que se utilizaron como sondas genéticas bajo diferentes condiciones de hibridación para la detección de secuencias polimórficas en ADN genómico de cerdo.

OLIGONUCLEOTIDO	TIPO	SECUENCIA
MI3	Minisatélite	5'-GAGGGTGGNGGNTCT
33Core	Minisatélite	5'-GGAGGWGGGCAGGWRG
YNZ 22	Minisatélite	5'-CTCTGGGTGTSGTGC
GGAT ₅	Microsatélite	5'-GGATGGATGGATGGATGGAT
CAC ₇	Microsatélite	5'-CACCACCACCACCACCACCAC
CA ₁₀	Microsatélite	5'-CACACACACACACACACACA

S = G o C W = A o T R = A o G N = A, T, C, o G

Marcado Radioactivo de las sondas.- Los oligonucleótidos se marcaron en el extremo 5' por una reacción de fosforilación (Sambrook y colaboradores, 1989) utilizando γ ³²P ATP (> 6000 Ci/mmole) 10 pmol; oligonucleótido 60 μ Ci pmol (27ng/mer); T4 polinucleótido Kinasa (5U); buffer Kinasa 10X (1X) y H₂O bidestilada desionizada estéril cbp 50 μ l. Una vez hecha la mezcla se incubó a 37°C por 30 min. posteriormente se le adicionaron 50 μ l de ddH₂O y se filtró por columna de Sefarosa (G25) con el objeto de eliminar el ATP que no se incorporó a la sonda. Las sondas marcadas se hibridaron con las membranas utilizando 1 X 10⁶ cuentas radioactivas por minuto/ ml utilizando como mínimo 25 ml. para cada membrana de 20 x 25 cm.

Hibridación, Lavado y Autorradiografía.- Las membranas que contenían el ADN genómico de las muestras fueron hibridadas con las diferentes sondas marcadas bajo diferentes condiciones, éstas se describen a continuación:

Buffer de Prehibridación e Hibridación.- Se utilizó el buffer 6X SSC, 1% SDS y 125 mM pirofosfato de Na como solución constante a la cual se le adicionaron las variantes a continuación enumeradas, que dieron origen a las cuatro soluciones de hibridación que se probaron: 1) 0.2% de leche en polvo; 2) 100 μ g/ ml de ADN de esperma de salmón; 3) Leche y ADN de esperma de salmón; 4) Sin leche y sin ADN de esperma de salmón.

Temperatura.- Se prehibridó e hibridó a dos temperaturas (42° y 45°C)

Condiciones de lavado.- El lavado de la membrana hibridada se realizó con una solución 6X SSC, 0.1% SDS; a cuatro diferentes temperaturas 42, 45, 50 y 60° C; con 5 lavados; por 15 minutos.

La hibridación y condiciones de lavado se realizaron con todas las combinaciones de los factores antes descritos para cada una de las sondas marcadas.

Autorradiografía.- Las exposiciones de la membrana se llevó a cabo con placa radiográfica (Kodak X-Omat) y doble pantalla amplificadora a -20° C por un tiempo de 12, 24 y 48 horas.

La sonda marcada (con sus condiciones de hibridación) que se consideró válida para trabajar las muestras en serie para su análisis posterior fue la que reveló patrones de bandas polimórficas o huellas genéticas de ADN.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de los experimentos tipo Southern, se corrieron 5 geles con 20 muestras de ADN por gel y se obtuvieron las huellas genéticas de ADN de aproximadamente 100 individuos, quedando analizables: 88 muestras totales. La distribución de las muestras en cada uno de los geles se describe a continuación:

GEL	CARRILES	GRUPO GENETICO	PROCEDENCIA
1	2-8	L1	Querétaro
1	9-22	P N2	Huajicori Nay.
2	2-16	P N2	Huajicori Nay.
2	17-21	P N5	Quiviquinta Nay.
3	1-7	P N2	Huajicori Nay.
3	8-14	P N1	San Diego Nay.
3	15-17-18	P N4	Tamarindo Nay.
3	16	P N2	Huajicori Nay.
4	2-6	LW	Salamanca Gto.
4	7-9	L	Altos Jalisco
4	12-17	D	Altos Jalisco
4	18-19	H	Altos Jalisco
4	20-21	Y	Abasolo Gto.
5	2-3	P U	UNAM
5	4-15	P G	Guerrero
5	16-21	L2	UNAM
5	22-23	H	UNAM

P =Pelón Mexicano, N= Nayarit, L= Landrace, LW =Large White, D= Duroc, H= Hampshire, Y= Yorkshire, U= Universidad Nacional Autónoma de México, G= Guerrero.

Evaluación y Análisis de la Información de los Patrones de Bando de cada Individuo

Una vez obtenidas las huellas genéticas de cada individuo, estas imágenes fueron digitalizadas por medio del paquete de cómputo UVP *Grab-IT*. Los patrones de bando de cada individuo fueron analizados con el programa de cómputo *Gel Works* (GW1D para Windows), el cual lleva a cabo el registro de cada una de las bandas presentes en el patrón de todos los individuos. Una vez que se han formado los carriles o líneas para identificar el patrón de cada individuo, el programa le asigna a las bandas coordenadas para localizarlas físicamente, luego lleva a cabo la detección automática por densidad, de las bandas y lo presenta en forma de un diagrama donde se puede observar que el eje de las *y* corresponde a la intensidad de la banda y el eje de las *x* a la distancia de migración de la banda en el gel. A continuación el programa marca los límites de cada banda para ser considerada como la misma en otros individuos. Los patrones de bando de cada individuo fueron estandarizados por pesos moleculares de acuerdo al patrón de referencia utilizado en cada gel (fago Lambda digerido con BSTEII) para llevar a cabo un análisis global de toda la información. Posteriormente se forma un carril de referencia y el programa forma dos perfiles, uno perteneciente al perfil del individuo y otro al perfil de referencia que corresponde a la línea de referencia constituida por los pesos moleculares marcados en el gel, en estos perfiles el programa incorpora cada banda nueva que encuentra en los individuos a la línea de referencia, inmediatamente se asignan todos los pesos moleculares de las bandas (ver figura 1) y se estima el índice de movilidad relativa de cada banda, una vez realizado este proceso el programa lleva a cabo la comparación del patrón de bandas del carril o línea de referencia con la totalidad de los individuos. Para el análisis de los patrones de bandas se seleccionaron las bandas de un peso molecular mayor de 2.3 Kb por considerarse las más informativas (de tal manera que se identificaron y analizaron un total de 68 diferentes bandas en los animales del estudio).

Evaluación de la Diversidad Genética.

Metodología Estadística

Para el análisis de la diversidad genética se estimaron: Índices de Similitud promedio dentro y entre grupos Heterocigocidad, y Distancias genéticas estandarizadas de Nei.

Índice de Similitud .-El Índice de Similitud (IS) consiste en dividir el número de bandas compartidas de dos individuos entre el promedio de bandas totales que presentan esos dos individuos.

Inicialmente se calcularon los niveles de bandas compartidas (BC) definidos como la proporción del número común de bandas entre dos

individuos y se calcularon según Lynch (1990), Mannen y colaboradores (1993) de la siguiente manera:

$$IS = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

donde:

N_{ab} es el número de bandas compartidas entre los individuos N_a y N_b .
 $N_a + N_b$ es el número total de bandas registradas en los individuos N_a y N_b .

El IS fue calculado entre todos los animales comparables. Se conformó una matriz de relación cuyos elementos son la mediana de los IS entre dos grupos genéticos, la cual fue utilizada para construir un dendograma usando como regla de ligamiento el promedio aritmético no ponderado UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

Heterocigocidad.- Se estimaron las frecuencias génicas de los alelos p y q bajo los supuestos de que cada banda del patrón de huellas genéticas se considera un alelo dominante (p) y que estos genotipos están en equilibrio Hardy-Weinberg, donde: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

En un perfil de huellas genéticas no es posible distinguir los alelos de cada locus por lo tanto se supone que una banda determinada (S_k) corresponde a la suma de la frecuencia del homocigoto dominante y el heterocigoto.

Las frecuencias alélicas X_k se calcularon a partir de las frecuencias de cada banda (S_k). se puede decir que S_k corresponde a $p^2 + 2pq$, debido a que no se puede distinguir un genotipo homocigoto dominante de un heterocigoto debido a que ambos individuos expresan la misma banda y por lo tanto la frecuencia del homocigoto recesivo, q^2 , es $1 - S_k$.

La Heterocigocidad (He) se estimó según Stephens y colaboradores (1992) como:

$$H = \left\{ \frac{2n}{2n-1} \right\} \left\{ 1 - \left(\frac{\sum_{k=1}^A X_k^2}{\sum_{k=1}^A X_k} \right) \right\}^{1/2}$$

donde: $X_k = 1 - \{ 1 - (S_k) \}^{1/2}$

A = Número total de bandas.

n = Número de individuos.

El cálculo de las frecuencias alélicas se realizó utilizando lenguaje de matrices según Ulloa (1997) con el programa de cómputo *MATLAB*.

Distancias Genéticas.- A partir de las frecuencias, se calcularon las distancias genéticas estandarizadas de Nei (1987), para analizar la variación genética en dos poblaciones X y Y , para lo cual se consideró la probabilidad de identidad de dos genes elegidos al azar para un locus (j_k) donde:

$$j_x = \sum x_i^2 \qquad j_y = \sum y_i^2$$

Donde: X_i y Y_i son las frecuencias de el i -ésimo alelo para un locus dado en las poblaciones X y Y respectivamente. Como se consideraron dos alelos en este locus con frecuencias p y q entonces:

$$j = p^2 + q^2$$

La probabilidad de identidad de un gen para el mismo locus en poblaciones X y Y fue:

$$j_{xy} = \sum X_i Y_i$$

La identidad normalizada entre poblaciones X y Y con respecto a todos los loci se calculó:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde J_{xy} , J_x , y J_y = las medias aritméticas de, j_{xy} , j_x , y j_y respectivamente. La distancia genética entre poblaciones X y Y se calculó como:

$$D = -\ln (I)$$

Empleando el paquete *Phylip 3.5c* (Felsenstein 1995) se construyeron dendogramas con el método bootstrapping que tiene varios módulos. Inicialmente se estimaron con el módulo GENDIST las distancias genéticas estandarizadas de Nei (D) (Nei, 1987). Después se utilizó el módulo de NEIGHBOUR que emplea el procedimiento "Neighbour Joining" (Saitou y Nei, 1987) mismo que utiliza como matriz de relación las distancias estandarizadas de Nei. Posteriormente con el objeto de contar con una estimación de la confiabilidad de la topología del dendograma, se generaron 1000 réplicas con el módulo SEQBOOT que evalúa la confiabilidad de la topología, y finalmente se elige el mejor árbol con el módulo CONSENSE.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las 6 sondas evaluadas, la que reveló el mayor número de bandas polimórficas fue GGAT₅ bajo las condiciones de hibridación 6X SSC, 1% SDS y 125 mM pirofosfato de Na sin leche y sin ADN de esperma de salmón, a 42° C con 2 horas de prehibridación en la membrana y 12 horas de hibridación con GGAT₅ marcada con γ ³²P ATP (1x10⁶ cpm/ml), siendo la condición de lavado más favorable, con la solución 6XSSC al 0.1 % de SDS, 5 lavados de 15 minutos cada uno a 42 °C , realizándose tres exposiciones, de 12, 24 y 48 hrs a -20°C con placa radiográfica (Kodak X-Omat) y dos pantallas amplificadoras por cada membrana trabajada (figuras 6 y 7).

Por otro lado el análisis de los resultados obtenidos se presenta a continuación (excepto el gel 4 que no se pudo integrar al análisis conjunto por problemas en el patrón de referencia, debido a lo anterior, en algunos cuadros aparecen todas las poblaciones y en otros no, el número mínimo de observaciones por población para ser analizadas fue $n \geq 4$).

En el **cuadro 1** se muestra el número de bandas totales y compartidas que se observaron en los individuos en todos los experimentos. Solo se consideraron bandas de un tamaño arriba de 2300 pb.

El total de bandas diferentes identificadas por individuo por población varió de 27 a 46 que correspondieron a los grupos de cerdos Duroc (D) y cerdo Pelón de Huajicori (PN2) respectivamente. Se identificaron un total de 68 bandas diferentes. Con estos datos se pone de manifiesto el gran número de marcadores genéticos que pueden ser detectados por medio de huellas genéticas de ADN. El número promedio de bandas totales por individuo varió de 11.5 a 21.41; al respecto Kuhnlein y colaboradores (1990) realizando estudios con huellas genéticas de ADN en aves encontraron un número promedio de bandas totales por individuo de 11.

El grupo genético que mostró el coeficiente de variación (C.V.) mayor de bandas totales fue Landrace (L) (de Los Altos de Jalisco) con 34.17%, en cambio donde se observó el menor C.V. fue en la raza Duroc (D) con 11.19%. El C.V. como medida de variación relativa expresa a la desviación estándar como un porcentaje de la media que permite comparar la variación proveniente de experimentos diferentes, que es el caso de estas poblaciones que se trabajaron en diferentes geles. De esta manera las variaciones pueden ser comparadas y se observó que en las poblaciones L, LI (Landrace de Querétaro) y PN2 (Cerdo Pelón de Huajicori Nayarit), existió mayor variación en el número total de bandas observadas lo que indica mayor polimorfismo en estos grupos con respecto a los demás. Este polimorfismo observado es mayor que el reportado por Georges y colaboradores (1988) y Mannen y colaboradores

(1993). En promedio en todas las poblaciones se observó que en individuos no relacionados, aleatoriamente se pueden encontrar 14.4 ± 1.3 bandas.

En el caso de bandas compartidas (BC) su número varió en un rango de 3.53 a 12.60 correspondientes al grupo PN1 (cerdo Pelón de San Diego Nayarit) y L2 (Landrace UNAM) estos valores de bandas compartidas son indicadores de la existencia de material genético común entre dos individuos y se emplea para el cálculo del índice de Similitud. El grupo que tuvo el coeficiente de variación mayor fue L con 50.49% seguido por PN2 con 48.28% los valores más bajos de C.V. fueron Large White (LW) con 12.92% y D con 15.89%, Estos valores muestran que los grupos L y PN2 son más heterogéneos dentro de grupo que los grupos LW y D ya que los niveles del C.V. pueden ser útiles en la evaluación de la variación genética.

Parece que en general las poblaciones del cerdo Pelón Mexicano tienen un número mayor de bandas diferentes; aunque en promedio por individuo, es muy parecido a otras poblaciones.

El **cuadro 2** muestra las posiciones y frecuencias de las bandas exclusivas (que se definen como aquellas bandas que únicamente fueron observadas en una población aunque sin estar necesariamente en todos los individuos. Es muy interesante notar que en general los cerdos de los grupos PG (Pelones de Guerrero) y PN2 mostraron un mayor número de bandas exclusivas (3 bandas cada grupo) y en las razas comerciales solo L2 mostró 3 bandas exclusivas y 7 bandas con una frecuencia de 100%. Al respecto surge la idea de que estas bandas exclusivas pueden indicar presencia de características comunes y exclusivas de cada grupo genético. Con respecto al grupo L2 es interesante observar que bandas con frecuencias de 1 podrían ser el resultado de una fuerte presión de selección o indicadores de que son poblaciones cerradas donde posiblemente se ha practicado consanguinidad y podrían ser utilizadas como marcadores genéticos de un grupo particular, o como una medida para estimar contribuciones de contenido genómico de las poblaciones parentales a través de su estudio detallado. Esto concuerda con lo reportado por Kuhnlein y colaboradores (1990) que evaluaron consanguinidad por medio de huellas genéticas de ADN en 7 líneas de pollos con diferentes grados de consanguinidad. Ellos observaron una asociación entre la frecuencia de la banda y el grado de consanguinidad, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.996 ($p < 0.01$) indicando que existe dependencia entre la frecuencia de las bandas y la consanguinidad que puede ser representada por una aproximación lineal. Con respecto a la frecuencia de 1 en las bandas de L2, Haberfeld y colaboradores (1992) estimaron distancias genéticas a partir de huellas genéticas de ADN en diferentes cruzamientos en aves White Plymouth Rock, en este estudio utilizaron bandas "línea específica" o bandas que aparecían con una frecuencia de 1.0 en una población. Analizando la intensidad relativa de las bandas monomórficas o únicas demostraron que existe una asociación muy alta $r=0.993$ entre el promedio de intensidad de la banda

monomórfica y la contribución de contenido genómico de las poblaciones que les dieron origen, y que las huellas genéticas de ADN son una medida efectiva para estimar estas contribuciones a través del estudio de bandas únicas.

En el **cuadro 3** se presentan los promedios de Índices de Similitud (IS) basados en el número de bandas compartidas y el grado de Heterocigocidad (He) estimada a partir de la frecuencia de bandas en los diferentes grupos genéticos de cerdos.

En lo que respecta al IS el valor más alto se encontró en los cerdos L2 y D (0.58 y 0.54 respectivamente) estos valores altos indican un mayor número de bandas compartidas lo que se traduce como un porcentaje mayor de material genético similar, por lo tanto nos indican que son grupos genéticamente más homogéneos. Lo anterior sugiere que puede tratarse de poblaciones con una alta presión de selección, ó poblaciones muy cerradas que posiblemente han caído en la práctica de consanguinidad.

El valor IS mínimo observado fue de 0.31 correspondiente a PN1, se puede decir que valores bajos son indicadores de que los individuos son genéticamente más heterogéneos otros valores similares se observaron en PN2 (0.38) y L1 (0.39). Resulta complicado hablar de valores altos o bajos porque son pocas las publicaciones donde se marcan estos límites. Dunnington y colaboradores (1991) realizaron comparaciones de huellas genéticas de ADN mediante bandas compartidas (BS), entre dos líneas de aves seleccionadas de modo divergente por 31 generaciones. Con respecto al peso corporal, encontraron un nivel promedio que consideraron como bajo, de bandas compartidas (BC) entre estas dos líneas de 0.15 (con rangos de 0.09 a 0.21). Por otro lado observaron el nivel de BC entre dos líneas divergentes de una misma raza, por ejemplo entre líneas de la misma población base original, pero separadas por selección divergente dentro de poblaciones cerradas, este nivel medio de BC estimado fue de 0.51, con un rango de 0.43 a 0.56 y fueron considerados como niveles moderados. El nivel relativamente alto de BC fue encontrado entre poblaciones parentales y poblaciones F1 con un promedio de BC de 0.65 con un rango desde 0.58 hasta 0.71. Por otro lado Wetton y colaboradores (1987) estimaron BC en varias familias de gorriones, utilizando distinto número de hembras y progenie en los diferentes tipos de familia y concluyeron que un valor de BS medio de 0.723 es un valor alto y se considera dentro del rango de padres.-progenie.

En la **figura 2** el gráfico de caja muestra las medianas del Índice de Similitud (IS) obtenidos de 61 muestras analizadas inicialmente en cinco geles, donde se puede observar como varió el IS por grupo poblacional. El mayor valor de IS (0.57) se observó en L2 y en D, y el valor mínimo de IS (0.26) se estimó en PN1. Los grupos en los que se observó mayor variación para IS fueron L3 y PG. Los grupos con menor variación fueron LW, D, y en L2.

En **figura 3** muestra las medianas de los valores del IS(-) con las muestras que se analizaron de manera conjunta y se puede observar un rango de valores desde 0.26 (PN1) hasta 0.57 (L2), dentro de cada caja se observa el 50% de valores alrededor de la mediana de cada grupo, cuyos rangos son (0.27-0.46) para L1 n=7; (0.45-0.62) en L2 n=5; (0.42-0.60) para PG n=9; (0.19-0.40) en PN1 n=6 y para PN2 n=19 (0.25-0.48). Se pudo observar que en general las poblaciones de cerdo Pelón tienen valores más bajos de IS y mayor variación con respecto a los cerdos comerciales.

Al estimar los C.V del IS (ver cuadro 3) se observó que la población con una mayor variación dentro de grupo fue PN2 con un CV de 39.47% que es congruente con un IS bajo. La población con la variación menor observada dentro de grupo fue D con un CV de 12.96%. Esto concuerda con un IS mayor, lo que indica que en la población estudiada de cerdos D éstos son genéticamente más homogéneos. En el cuadro 3 se presentan también los valores estimados de Heterocigocidad (He). Los valores fluctuaron entre 0.41 y 0.80. Se encontró que los valores de IS tienen una correlación negativa muy alta ($r = -0.97$, $p < 0.005$) con los valores He nos indica que $1-IS$ puede ser utilizado como un estimador de heterocigocidad; al respecto Hillel y colaboradores (1989) concluyen que el nivel de heterocigocidad puede ser estimado por el nivel promedio de bandas compartidas.

Por igual las poblaciones de cerdos criollos tienen CV mayores, lo que nos habla de su gran heterogeneidad.

Los valores más altos de He se observaron en PN1 (0.80), PN2 con (0.76). Es interesante observar que los valores más altos se encontraron en los cerdos Pelones Mexicanos, lo que sugiere que son poblaciones cruzadas o que las poblaciones son muy diversas genéticamente ya que efectivamente estos animales no han estado sujetos a un proceso de selección sistematizado. Lo anterior puede quedar más claro al estudiar que tantas bandas, en los cerdos Pelones Mexicanos, son compartidas con las razas comerciales, lo que se analiza con detalle en los datos que se muestran en el cuadro 4.

Por otro lado los valores más bajos de He se observaron en L2 (0.41) lo que sugiere una reducción en la heterogeneidad genética que podría explicarse como resultado de algún tipo de selección, o al uso de un número reducido de sementales como progenitores. Contrariamente a lo observado en L1 (0.72) que puede indicar el uso de un gran número de líneas familiares como pies de cría o el resultado de cruzamiento con otras razas. Con la excepción de L1, las poblaciones de razas comerciales tienen valores de He menores que los valores de He encontrados en los grupos de cerdo Pelón. Además estos grupos tienen valores de IS más dispersos.

El **cuadro 4** muestra los Índices de similitud estimados por el método de bandas compartidas dentro de grupo y entre grupos genéticos. Estos valores fueron derivados del análisis de geles integrados y

estandarizados a través de pesos moleculares. En este cuadro los valores en la diagonal corresponden al valor de IS dentro de cada grupo genético. El grupo que resultó ser más homogéneo por tener el valor más alto de similitud ($IS = 0.57$) fue el grupo L2 lo que indica que se trata de una población cerrada donde posiblemente en algún momento se ha practicado consanguinidad. Por otro lado los valores más bajos de IS correspondieron a los cerdos pelones de San Diego Nay. (PN1), con IS de 0.26.

En lo que corresponde a los IS estimado entre grupos, los resultados en general arrojan como valores de similitud más altos: 0.43, entre cerdos PG y cerdos L2; así como 0.42 entre cerdos PN2 y cerdos L2, lo que indica, que cierta proporción de bandas en los cerdos Pelones Mexicanos es compartida con L2.

Por otro lado, los valores, entre grupos más bajos de IS se observaron entre cerdos PN1 y cerdos PG, 0.29, y de 0.28 entre los cerdos PN1 y los cerdos L1. Parece que los cerdos PN1 son el grupo más heterogéneo con respecto a todos los grupos y que en general los cerdo Pelones son más distantes entre sí. Lo que concuerda con lo observado por Kotzé y Muller (1994) que en su estudio de relaciones genéticas realizado en ganado bovino sudafricano, concluyeron que existe mayor diversidad genética en el ganado autóctono que en el ganado originario de Europa y Asia. Por otro lado Ellegren y colaboradores (1992) emplearon huellas genéticas de ADN que utilizaron en la comparación de cuatro razas de caballos y concluyeron que los patrones de bandeo en dos individuos no relacionados de la misma raza son en promedio más similares que entre razas.

De acuerdo a todo lo anterior se puede observar que hay diferentes grados de relación genética entre los individuos dentro de las poblaciones y entre ellas. El IS se puede aplicar para estimar relación genética entre individuos lo que concuerda con lo reportado por Mannen y colaboradores en 1993. Stephens y col. (1992) estimaron heterocigocidad mediante huellas genéticas de ADN utilizando una sonda multilocus. Sus resultados indican que el índice de similitud es un estimador ascendente parcial (sesgado) de la homocigocidad poblacional, y concluyen acerca de H_e que al asumir que los alelos con minisatélites son independientes en cada loci, el H_e esta estimando el grado en que los alelos son heterocigotos para los loci en las poblaciones.

El cuadro 5 presenta las distancias genéticas estandarizadas de Nei, estimadas en todos los grupos separados. Las distancias estimadas con los valores más altos se observaron entre los cerdos Pelones de Tlalchapa Gro. y los Pelones de Quiviquinta Nay. (0.181) y entre los cerdos Pelones de Quiviquinta y los Pelones de la UNAM (0.173). Es interesante notar que los valores mayores de distancias genéticas se observaron entre los grupos de cerdos Pelones lo que sugiere que estos grupos se encuentran genéticamente más alejados.

Respecto a las distancias genéticas con valores más pequeños estimados son las calculadas entre los cerdos Landrace de Qro. y los Pelones de

Huajicori Nay. (0.021) y la observada entre los Pelones de San Diego Nay. y los Pelones de Huajicori (0.022). Estos valores indican una menor distancia genética entre estos grupos, pues a medida que esta distancia se acerca a cero se puede decir que la cercanía genética es mayor.

En el **cuadro 6** se presentan las distancias genéticas estandarizadas de Nei entre poblaciones de cerdos Landrace y cerdos Pelones estimadas a partir de las frecuencias de las bandas obtenidas de la información integrada de todos los geles, datos que fueron estandarizados mediante sus pesos moleculares para ser analizados de manera conjunta. Se observó que el valor de distancia genética menor fue entre L1 y PN2 (0.0177), los grupos que resultaron más alejados genéticamente L2 y PN1, con un valor de distancia genética estimada de 0.141. Lo que se puede apreciar mejor en la **figura 4** que muestra el dendograma de distancias genéticas estandarizadas de Nei construido por el método de "Neighbor Joining" a partir de las frecuencias estimadas de bandas entre poblaciones de Cerdo Pelón Mexicano y cerdos de raza Landrace. En este dendograma se muestra como los cerdos Pelones se agrupan juntos, y los cerdos Landrace forman un grupo aparte. Se encontró que los grupos más alejados a nivel DNA son Landrace de la UNAM y Landrace del Bajío, con una distancia de 0.9805, y dentro del grupo de los cerdos Pelones, los grupos más alejados son San Diego Nay. y Guerrero con una distancia de 0.3944. La distancia más pequeña encontrada fue de 0.01767 entre Landrace del Bajío y pelones de Huajicori Nayarit.

El **cuadro 7** muestra las distancias estandarizadas de Nei entre grupos genéticos de diferentes razas comerciales donde el valor mínimo de distancia genética observado fue de 0.098 que se observó entre los grupos Duroc y Landrace. El valor máximo se encontró entre los grupos Yorkshire y Hampshire, y Yorkshire y Large White con un valor de 0.29 en ambos casos. Es interesante observar que en general las distancias genéticas estimadas en estos grupos fueron mayores que las observadas entre los grupos de cerdos Pelones, lo que puede ser un indicador de que estos grupos son más cercanos entre ellos, lo que se puede apreciar en la **figura 5** que presenta el dendograma de distancias genéticas estandarizadas de Nei estimadas a partir de frecuencias de bandas entre poblaciones de cerdos de diferentes razas comerciales (construido por el método de "Neighbor Joining"). En este dendograma se encontró mayor distancia genética entre Hampshire y Yorkshire (0.29239). La distancia genética más pequeña se observó entre Landrace y Duroc (0.09757) es interesante observar como las razas L y Y agrupan juntas y separadas de D y H.

CONCLUSIONES

- La sonda GGAT₅ puede emplearse como una herramienta para obtener patrones de huellas genéticas de ADN que pueden ser utilizadas para evaluar la diversidad genética en porcinos.
- Los cerdos Pelones son muy distantes genéticamente entre sí y con respecto a los cerdos de razas comerciales.
- Los cerdos Pelones son más heterogéneos a nivel de ADN que la mayoría de las razas comerciales analizadas en este estudio.
- Debido a su gran diversidad dentro y entre grupos de cerdos Pelones su preservación deberá incluir al mayor número posible de regiones y fenotipos.
- En los grupos de cerdos L hay diferentes grados de relación genética entre individuos de las diferentes poblaciones, al haberse observado una población más similar (L2) y otra con alto grado de He (L1).
- La gran diversidad genética encontrada en las poblaciones de cerdo Pelón al nivel de huellas genéticas, sugiere un gran potencial de estas poblaciones en cuanto reservorio de biodiversidad con aplicaciones comerciales.
- El estudio con huellas genéticas en poblaciones de razas comerciales reveló que éstas son en general menos heterocigóticas y con valores altos de IS. Aunque hay poblaciones individuales muy heterogéneas, probablemente debido a cruzamientos.

LITERATURA CITADA

- Aparicio M. J.B.: El Cerdo Ibérico. Premio de Investigación .Universidad de Córdoba , España. (1987).
- Armour, J.A. and Jeffreys, A.J.: Recent advances in minisatellite biology. Febsletters. 307 (1):113-115 (1992).
- Armour, J.A., Povey, S., Jeremiah, S. and Jeffreys, A.J.: Sistematic cloning of minisatellites from ordered array charomid libraries. Genomics. 8 (3):501-512.(1990).
- Baldizon, S.O.: Contribución a la determinación de algunos valores hemáticos normales del cerdo "Pelón Mexicano". Tesis de Licenciatura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México (1971).
- Berruecos, V.J.M.: Mejoramiento Genético del Cerdo. Primera edición .Edit. Arana. México (1972).
- Botstein, D., White, R.L., Skolrik, M. and Davis, R.W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polimorphism. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.(1980).
- Buitkamp, J., Ammer, H. and Geldermann, H.: DNA Fingerprinting in domestic animals. Electrophoresis 12(2-3):169-174.(1991).
- Cárdenas, P.C.: Introducción al Estudio Zoométrico del Cerdo Pelón Veracruzano. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (1966).
- Castro, G.E.M.: Importancia que ejercen algunos factores ambientales y el efecto del semental sobre el tamaño y peso de la camada al nacimiento y al destete en el Cerdo Pelón Mexicano. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (1981).
- Cenobio, S.L.: Evaluación del Comportamiento Reproductivo de un lote de cerdas Pelón Mexicano en la Etapa de lactancia en el Altiplano. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (1993).
- Davis, W., Harbitz, I., Frier, R., Stranzinger, G. and Hauge, J.G.: Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chomosomal assignement using a linked probe. Anim. Genetics. (19):203-212.(1988).

- Dentine, M.R.: Marker-Assisted Selection in Cattle. Anim. Biotech. 3(1):81-93.(1992).
- Darmanac, R., Nizetic, D., Lennon, G.G., Beitverda, A. and Lehrach, H.: W (A or T) sequences as probes and primers suitable for genomic mapping and fingerprinting. Nucleic Acids Research. 19(21):5839-5842(1991).
- Dunnington, E.A., Gal, O., Plotsky Y, Haberfeld A., Kirk T., Golgberg A., Lavi U., Cahaner A., Siegel, P.B., and Hillel, J.: DNA fingerprinting of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. Anim. Genet. 21:247-257 (1990)^a.
- Dunnington, E.A., Gal, O., Siegel, P.B., Haberfeld, A., Cahaner, A., Lavi, V., Plotsky, Y. and Hillel, J.: Deoxyribonucleic Acid Fingerprint Comparisons Between Selected Populations of Chickens. Poult. Sci. 70:463-467(1990)^b.
- Ellegren H., Andersson L, Johansson M. & Sandberg K.: DNA fingerprinting in horses using a simple (TG)_n probe and its application to population comparisons. Anim. Genet. 23:1-9. (1992).
- Epplen, J.T.: An simple repeated GATCA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. J. Heredity 79(6):409-417(1988).
- Epplen, J.T., Ammer, H., Epplen, C., Kammerbaver, C., Mitreiter, R., Roewer, L., Schwaiger, W., Steimle, V., Zischler, H. and Albert, E.: Oligonucleotide fingerprinting using simple repeat motifs: a convenient ubiquitously applicable method to detect hypervariability for multiple purposes. Experientia Supplementum. 58:50-69(1991).
- F.A.O.: Boletín de información sobre recursos genéticos animales. FAO-UNEP (1994).
- Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791. (1985).
- Flores, M. J.: Orígenes probables de los cerdos Mexicanos, características generales, zometría, distribución, población probable actual y futuro. Porcira 56: 37-46 (1977).
- Gilbert D. A., Packer C., Pusey E., Stephens J.C., and O'Brien S. J.: Analytical ADN fingerprinting in lions: parentage, genetic diversity, and kinship. J. Hered. 82:378-386. (1991).

- Georges, M., Lequarre, A.S., Castelli, M., Hanset, R. and Vassart, G.: DNA fingerprinting in domestic animales using four different minisatellites probes. Cytogenetics and Cell. Genet. 47(3):127-131.(1988).
- Haberfeld A., Dunnington E.A., & Siegell P.B.: Genetic distances estimated from DNA fingerprinting in crosses of White Plymouth Rock chickens. Anim. Genet. 23:167-173. (1992)
- Haley, C.S.: Use of DNA fingerprints for the detection of major genes for quantitative traits in domestic species. Anm. Genet. 22:259-277(1991).
- Hoelzel A.R. and Bancroft D.R.: Molecular Genetic Analysis of populations, (Statistical analysis of variation). IRL Press Oxford N.Y. U.S.A. p 297-305. (1992).
- Hillel, J., Schaap, T., Haberfeld, A., Jeffreys, A.J., Plotzky, Y., Cahaner, A. and Lavi, V.: DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. Genetics. 124(3):783-789(1990).
- Jeffreys, A.J, Wilson V., and Thein S.L.: Individual-specific fingerprints of human DNA. Nature 316:76-79, (1985).
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neuman, R. and Keyte, J.: Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards D.N.A. fingerprinting of single cells. Nucleic Acids Research. 16(23):10953-10971,(1988).
- Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Patel, I. Armour, J.A., Macleod, A., Callick, A., Gray, I.C., Neumann, R, Gibbs, M. and Crosier, M.: Principles and recent advances in human DNA fingerprinting. Experientia.Supplementum. 58:1-19.(1991).
- Kotzé A., and Muller G. H.: Genetic relationships in Southern African cattle breeds. 5th World Congress Genetics Applied to Livestock Production, Guelph. 21:413-416. (1994).
- Kuhnlein, V., Zadworny, D., Gavora, J.S., and Fairfull, R.W.: Identification of markers associated with quantitative trait loci in chickens by DNA Fingerprinting.In: DNA fingerprinting approaches and applications ed. by Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J. and Wolff R. Birkhauser Verlag Basel/ Switzerland.(1991).
- Loftus R., Scherf B.: World watch list for domestic animal diversity. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (1993).

- Lynch M.: The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7:478-484. (1990).
- Mannen H., Tsuji, S., Mukai F., Goto N., and Ohtagaki. : Genetic Similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J.of Heredity*. 84:166-169. (1993)
- Medina. G.J.A.: Estudio Craneológico de un Suideo del Preclásico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. (1965).
- Nakamara.Y., Leppert.M., Hoff.M., Kumlin.E., and White.R.: Variable number of tandem repeat (VNTR) marker for human gene mapping. *Science* 235:1616-1622.(1987).
- Nei M. : *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. (1987).
- Nicholas,F.W.: *Genética Veterinaria.*, primera edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. (1990) 413-435
- Rodríguez I.,Hernandez G.R., Trujillo O.M.E y Rodarte C.L.F.: Estudio comparativo de la morfología cromosómica del cerdo Pelón Mexicano. *Genética y Mejoramiento Animal*. *Animal Breeding and Genetics*, p.276 (1994).
- Rosas G.M.E.: Comportamiento productivo de cerdas Yorkshire y Landrace con camadas puras y cruzadas. Tesis de Maestría en Producción Animal :Area Genética. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México (1992).
- Roher G. A., Alexander L.J., Keele J.W.,Smith T.P. and Beattie C.W.: A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136:231-245 (1994).
- Rojas,C.: Comparación del comportamiento productivo durante la lactancia entre cerdos de raza Pelón Mexicano e Híbrido de Yorkshire con Pelón Mexicano y Landrece con Pelón Mexicano en el Altiplano. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (1994).
- Saitou N. and Nei M.: The Neighbour-joining Method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*4:406-425. (1987)

- Salinas R. G.: Caracterización del cerdo Pelón Mexicano: Estudio recapitulativo. Tesis de Licenciatura, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (1996).
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular cloning. A laboratory manual. Second edit. Cold Spring Harbor NY. Cold Spring Harbor Press. (1989).
- Stam, P.: Marker genes in selection. Anim. Genetics. (18) supplement 1:97-99 (1987).
- Stephens J.C., Gilbert D.A., Yuhki N., and O'Brien S.J.: Estimation of heterozygosity for Single- Probe Multilocus DNA fingerprints. Mol. Biol. Evol. 9:729-743, (1992).
- Tello R. A. y Cisneros G.A.A.: Evaluación del comportamiento alimenticio y reproductivo del cerdo Pelón Mexicano en estabulación. Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma de Nayarit, México (1990).
- Trujillo O.M.E., Toledo A., Hernández G.R.: Correlación entre el número de lechones nacidos vivos, muertos y total en la duración del parto. Memorias del XXIX Congreso Nacional de la AMVEC, Puerto Vallarta México. (1994).
- Ulloa A.R.: Estimación de distancias genéticas entre varias poblaciones de ganado criollo mexicano utilizando marcadores moleculares. Tesis de doctorado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. (en proceso) (1997).
- Vásquez P.C.G.: Historia de los animales domésticos de México, su origen autóctono o su introducción al país. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México. (1973)
- Wetton J. H., Carter R. E., Parkin D. T. and Walters D.: Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature. 327:147-149. (1987).
- Yassouridis, A. and Epplen, J.T.: On paternity determination from multilocus DNA profiles. Electrophoresis 12:221-226. (1989).

Cuadro 1. Estadísticas de las Bandas totales detectadas (BT) y compartidas (BC) por población.

Población	Número de Individuos	Bandas Totales	Media BT	Error estándar	C:V. (%) BT	Media BC	Error estándar	C:V. (%) BC
LW	4	32	14.25	1.03	14.46	6.50	0.42	12.92
D	5	27	13.40	0.67	11.19	7.30	0.52	15.89
L	6	29	11.50	2.45	34.17	5.13	1.06	50.49
L1	7	36	11.86	1.11	32.04	4.70	0.79	44.26
L2	5	43	21.41	1.66	17.28	12.60	1.43	25.40
PG	9	41	13.66	0.72	15.89	6.42	0.88	41.12
PN1	6	35	11.50	0.67	14.26	3.53	0.58	39.94
PN2	19	46	13.58	0.67	21.58	5.24	0.58	48.28
Total	61	68	13.90	1.14	23.17	6.43	0.98	42.93

LW = Large White D = Duroc L = Landrace Altos Jal. L1 = Landrace de Querétaro L2 = Landrace de la UNAM PG = Cerdo pelón Mexicano de Guerrero PN1 = Cerdo pelón Mexicano de San Diego Nayarit PN2 = Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit.

Cuadro 2.- Bandas exclusivas de población y bandas con frecuencias de 1.0 en Cerdos de Razas comerciales y cerdos Pelón Mexicano.

Grupo Genético*	Posición de las bandas exclusivas en orden descendente dentro del gel	Posición de cada una de las bandas con frecuencia de 1.0
LW		
D		
L	1	
L1	30	
L2	3	51, 58,
	6	59, 62,
	8	65, 67 y 68
PG	11	
	19	
	41	
PNI	26	
	13	
PN2	21	
	23	

* Nomenclatura como en cuadro 1.

Cuadro 3. Estimaciones de Índice de Similitud (IS) y el grado de Heterocigocidad (He) obtenidas dentro de cada población.

Población	Individuos	IS medio	Error estándar	C.V. %	He
LW	4	0.46	0.03	13.04	0.55
D	5	0.54	0.03	12.96	0.53
L	6	0.44	0.07	38.64	0.63
L1	7	0.39	0.05	35.90	0.72
L2	5	0.58	0.05	18.97	0.41
PG	9	0.46	0.06	36.96	0.66
PN1	6	0.31	0.03	38.71	0.80
PN2	19	0.38	0.03	39.47	0.76

LW= Large White D= Duroc L= Landrace de los Altos Jal. L1= Landrace de Querétaro L2=Landrace de la UNAM PG= Cerdo pelón Mexicano de Guerrero PN1= Cerdo pelón Mexicano de San Diego Nayarit PN2= Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit.

CUADRO 4.- de Indices de Similitud estimados por el método de bandas compartidas dentro y entre poblaciones¹.

Poblaciones	L1	L2	PG	PNI	PN2
L1	0.37	0.37	0.37	0.28	0.38
L2		0.57	0.43	0.30	0.42
PG			0.43	0.29	0.33
PNI				0.26	0.30
PN2					0.37

PG = Cerdo pelón Mexicano Guerrero PNI = Cerdo pelón Mexicano de San Diego Nayarit PN2 = Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit L1 = Landrace de Querétaro L2 = Landrace de la UNAM

¹ Valores de la diagonal muestran las medianas del IS dentro de cada población, y los valores arriba de la diagonal presentan las medianas del IS entre las poblaciones.

CUADRO 5.- Valor de las Distancias Genéticas Estandarizadas de Nei entre las poblaciones de Cerdos estudiadas a partir de las frecuencias de las bandas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PG1	PG2	PN1	PN2	PN3	PN4	PN5	PU	L2	L1
1	0									
2	.07847	0								
3	.10239	.04497	0							
4	.09048	.05506	.03872	0						
5	.10570	.04548	.02150	.03543	0					
6	.10584	.06388	.03552	.05169	.04002	0				
7	.18080	.15722	.15663	.07785	.15575	.14926	0			
8	.11060	.05169	.03342	.06177	.04087	.05952	.17272	0		
9	.16708	.10620	.13015	.09425	.14060	.13439	.12244	.13327	0	
10	.09797	.04088	.03063	.02089	.03241	.04090	.11793	.04227	.09079	0

PG1 = Cerdo pelón Mexicano de Tlalchapa Guerrero PG2 = Cerdo pelón Mexicano de Altamirano Guerrero PN1 = Cerdo pelón Mexicano de San Diego Nayarit PN2 = Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit (gel de abril) PN3 = Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit (gel de mayo) PN4 = Cerdo pelón Mexicano de Tamarindo Nayarit PN5 = Cerdo pelón Mexicano de Quiquinta Nayarit PU = Cerdo pelón Mexicano de la UNAM L1 = Landrace de Querétaro L2 = Landrace de la UNAM

CUADRO 6.- Valores de las Distancias Genéticas Estandarizadas de Nei entre las poblaciones de Cerdos estimadas a partir de las frecuencias de las bandas.

	PG	L1	L2	PN1	PN2
PG	0				
L1	0.03644	0			
L2	0.11157	0.9805	0		
PN1	0.03944	0.03297	0.14081	0	
PN2	0.03484	0.01767	0.10980	0.02711	0

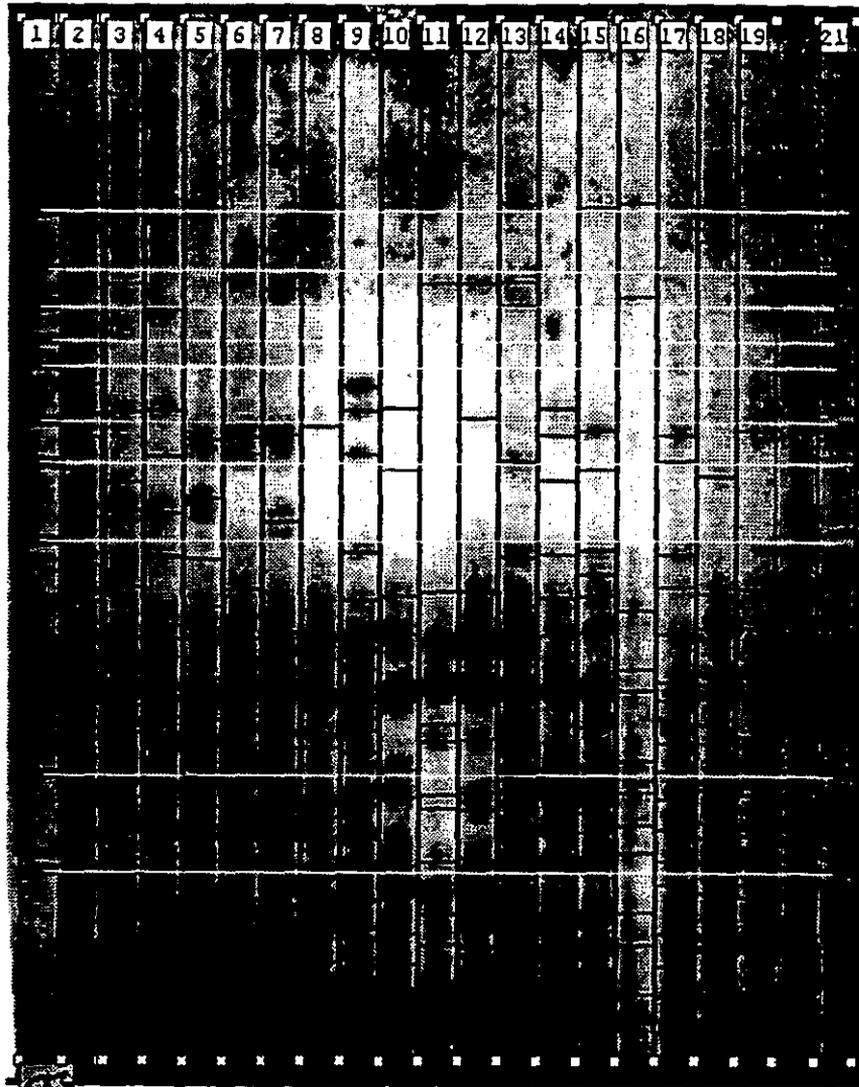
PG = Cerdo pelón Mexicano de Guerrero L1 = Landrace de Querétaro L2 = Landrace de la UNAM PN1 = Cerdo pelón Mexicano de San Diego Nayarit PN2 = Cerdo pelón Mexicano de Huajicori Nayarit.

CUADRO 7.- Valores de Distancias Genéticas Estandarizadas de Nei entre poblaciones de Cerdos comerciales estimadas a partir de las frecuencias de las bandas.

	LW	L	D	H	Y
LW	0.00000				
L	0.12499	0.00000			
D	0.11671	0.09757	0.00000		
H	0.13493	0.13053	0.14727	0.00000	
Y	0.28756	0.22937	0.24796	0.29239	0.00000

LW = Large White L = Landrace D = Duroc H = Hampshire Y = Yorkshire

Huellas genéticas de cerdo Pelón



asignando pesos moleculares.
Figura 1.

Huellas genéticas digitalizadas en proceso de análisis con Gel Works

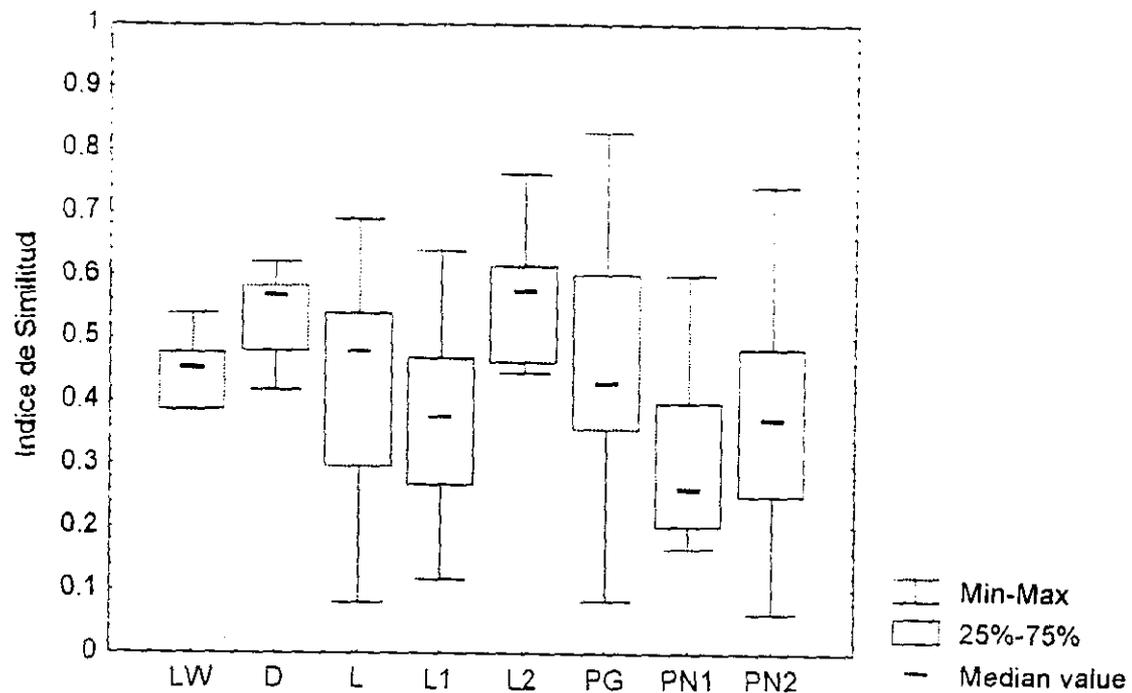


Figura 2- Indices de Similitud estimados en grupos de Cerdo Pelón y Cerdos de razas comerciales.
LW Large White , **D** Duroc, **L** Landrace de Los Altos de Jalisco. **L1** Landrace Querétaro, **L2** Landrace UNAM , **PG** Cerdo Pelón Mexicano de Guerrero, **PN1** Cerdo Pelón Mexicano de San Diego Nayarit, **PN2** Cerdo Pelón Mexicano de Huajicori Nayarit

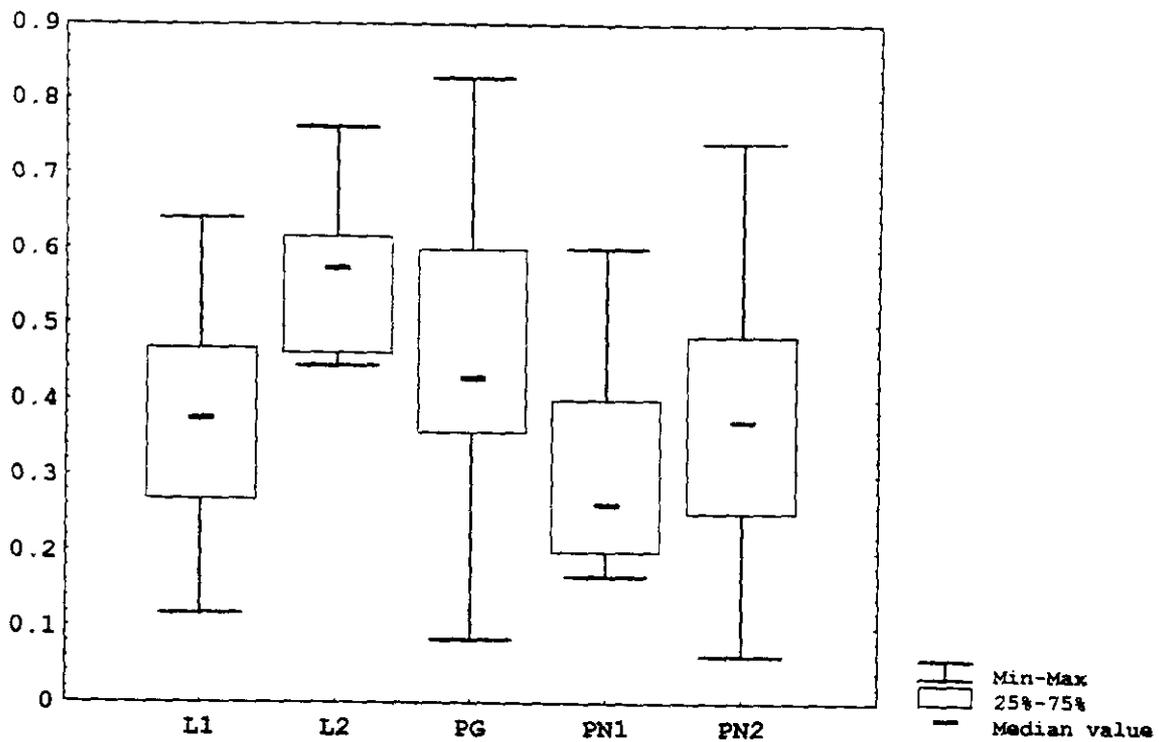


Figura 3.- Índice de Similitud estimada en grupos de cerdo pelón y Landrace.

L1 Landrace Querétaro, **L2** Landrace UNAM, **PG** Cerdo Pelón Mexicano de Guerrero, **PN1** Cerdo Pelón Mexicano de San Diego Nay., **PN2** Cerdo Pelón Mexicano de Huajicori Nay. El gráfico de caja muestra las medianas y la distribución del Índice de Similitud (IS) estimado a partir de bandas compartidas en grupos de cerdos Landrace y Pelón Mexicano. El mayor valor de IS se observó en L2 y el valor mínimo de IS se encontró en PN1 de San Diego, Nayarit.

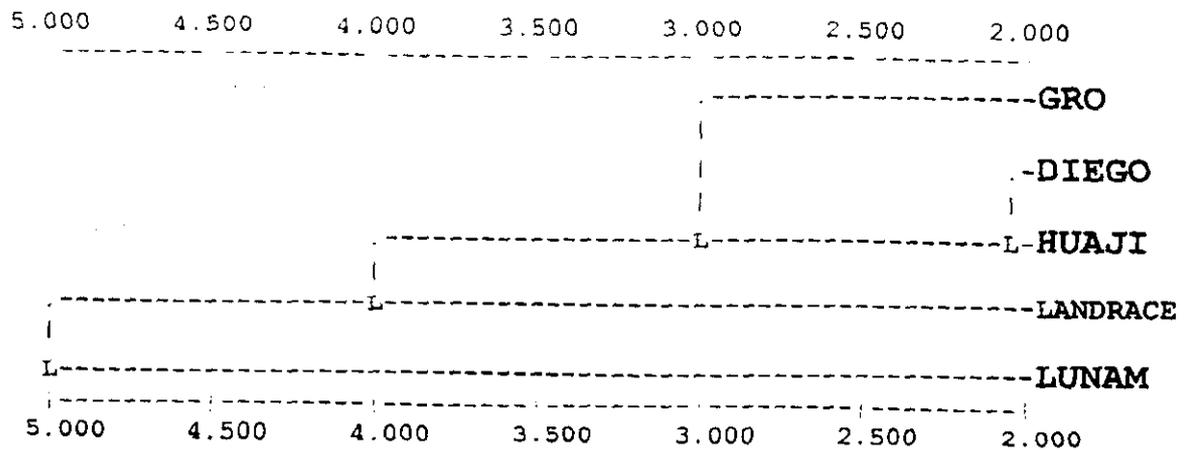


Figura 4- Dendrograma de distancias genéticas estandarizadas de Nei estimadas a partir de frecuencias de bandas entre poblaciones de Cerdo Pelón Mexicano y cerdos de raza Landrace(presentadas en el cuadro 6), dendrograma construido por el método de Neighbor Joining (geles integrados)

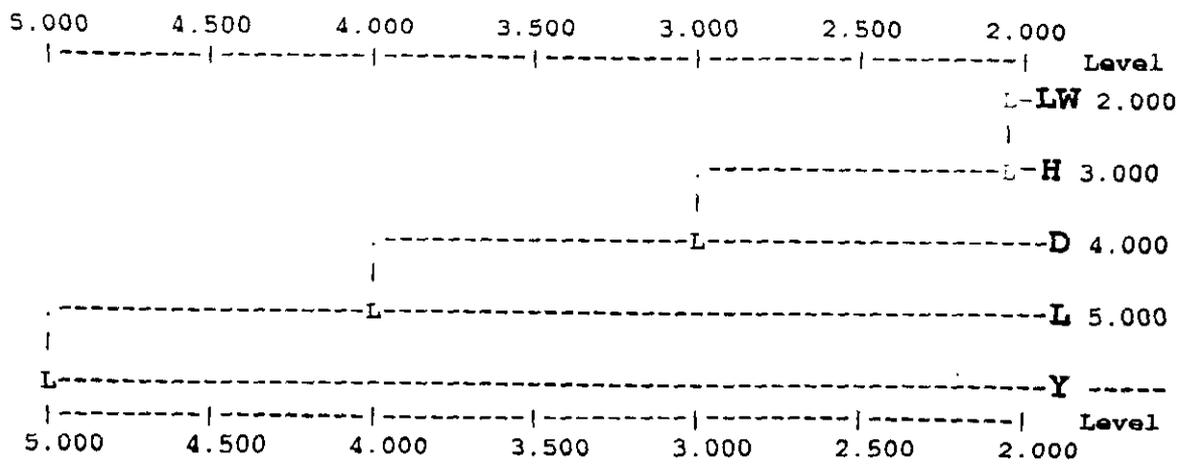


Figura 5.- Dendrograma de distancias genéticas estandarizadas de Nei estimadas a partir de frecuencias de bandas entre poblaciones de cerdos de diferentes razas comerciales (presentadas en el cuadro 7), dendrograma construido por el método de Neighbor Joining.

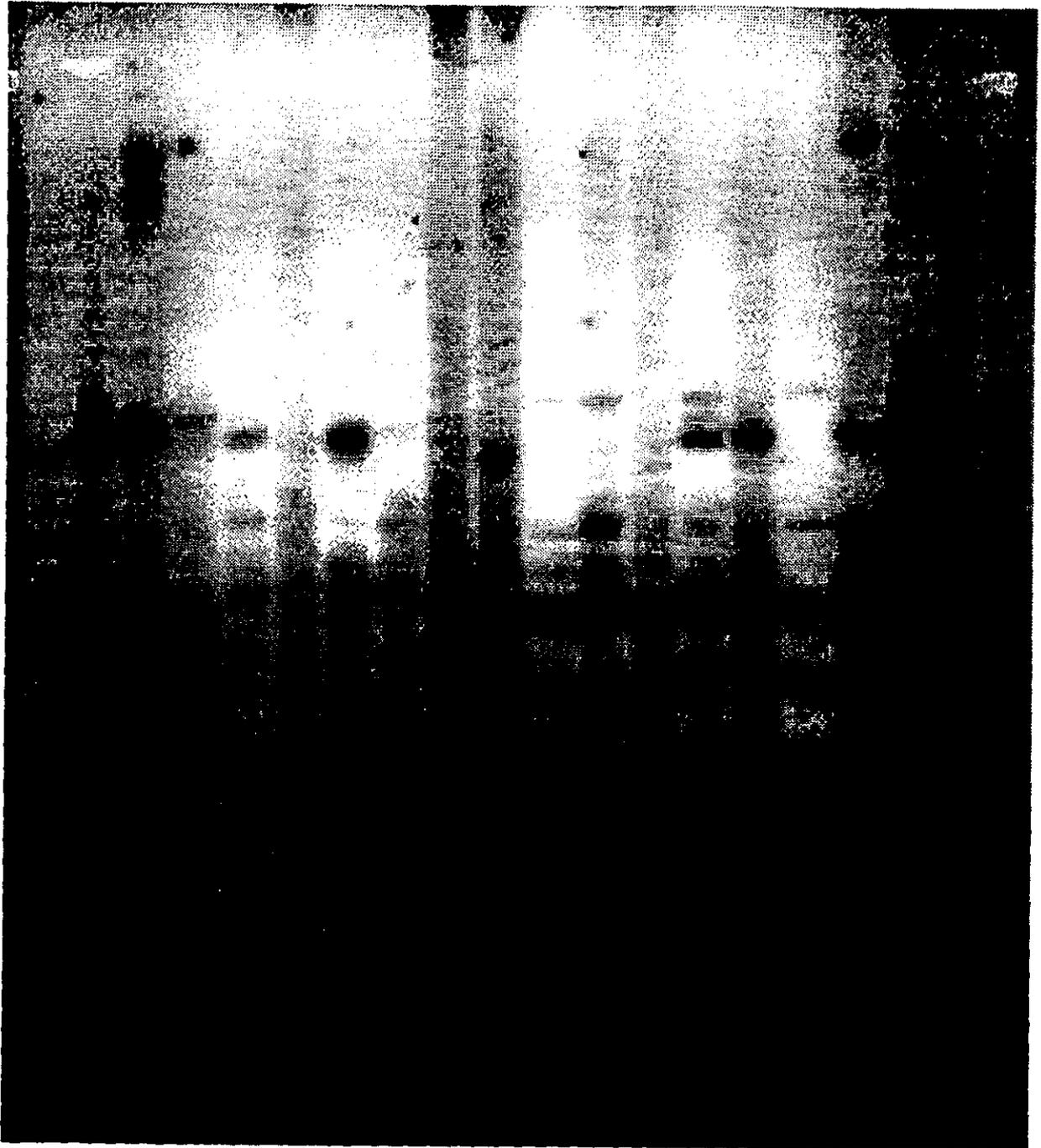


Figura 6. Huellas genéticas de ADN de cerdos Pelones Mexicanos, reveladas a partir de la hibridación con la sonda GGAT₅.

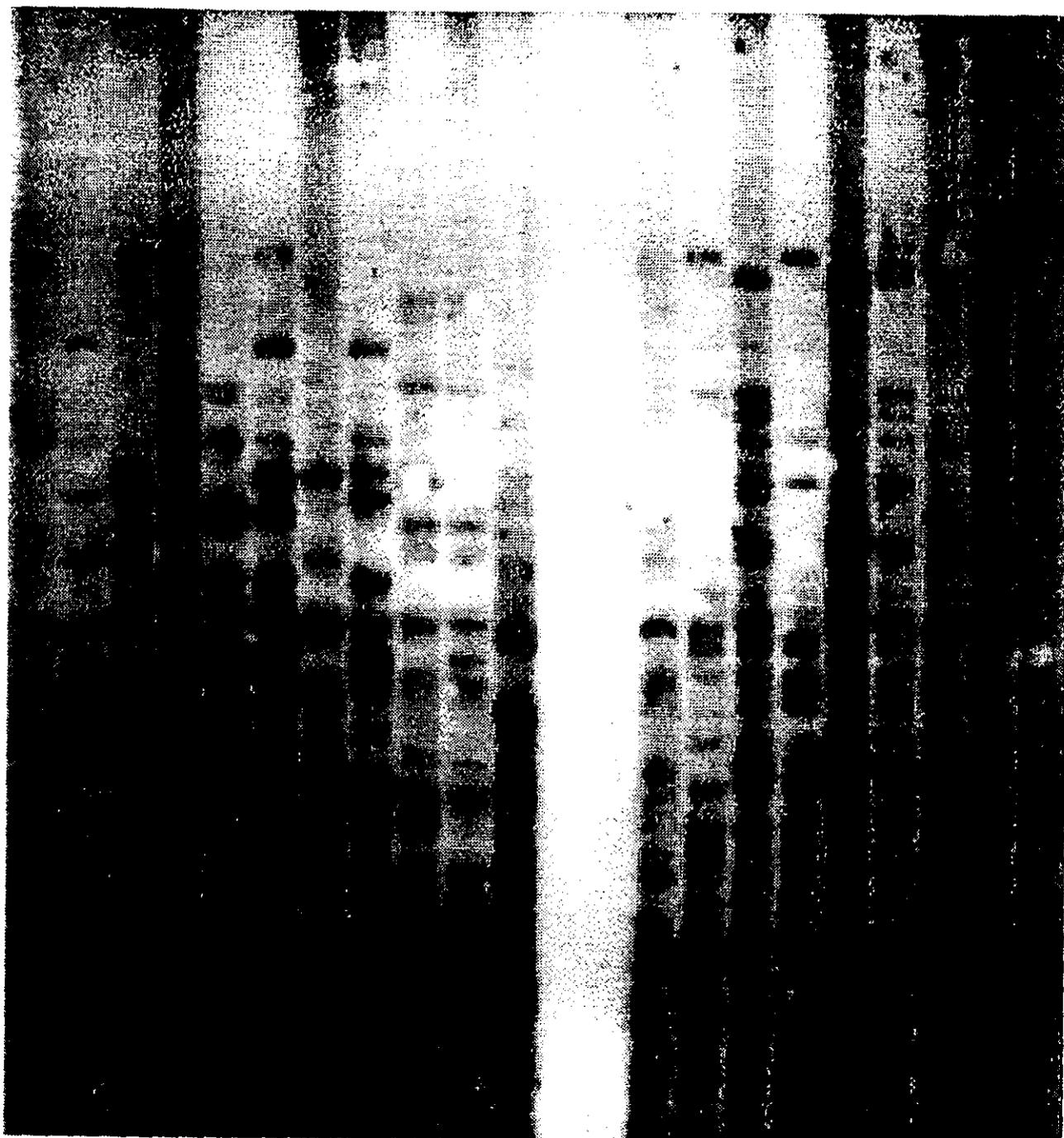


Figura 7. Huellas genéticas de ADN de cerdos Pelones Mexicanos de Nayarit

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA