

Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs

Characterization of Colombian creole pigs by RAMs

Aura Oslinger,¹ Jaime Eduardo Muñoz,² Luz Ángela Álvarez,³ Fernando Ariza,⁴ Fernando Moreno,⁵ Andrés Posso⁶

RECIBIDO: SEPTIEMBRE 20/06. ACEPTADO: NOVIEMBRE 15/06

¹Zootecnista Universidad Nacional de Colombia. E-mail: guoslinger@hotmail.com

²Ing. Agr. Esp. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: jemunozf@palmira.unal.edu.co

³Zoot. M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: laalvarezf@palmira.unal.edu.co

⁴M. V. M.Sc. Ph.D. Corpoica. E-mail: _blankñfarizab@unal.edu.co

⁵Corpoica. E-mail: ferleomor@yahoo.es

⁶Funcionario Laboratorio de Biología Molecular Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

E-mail: ampossot@palmira.unal.edu.co

RESUMEN

Mediante la técnica molecular RAMs (Random Amplified Microsatellites) se determinó la diversidad y las relaciones genéticas en 35 cerdos criollos colombianos (Zungos, San Pedroño, Casco de Mula) y en una muestra de animales de tipo comercial. Se encontraron 46 loci polimórficos; los valores de heterocigosidad por marcador RAMs fluctuaron entre 0.22 para CCA y 0.19 tanto para CT como para CGA, con 93.20% de loci polimórficos para CCA, 82.3% para CT y 68.75% para CGA. La heterocigosidad fue de 0.2016 y de 0.3058 ± 0.0433 el Fst. El árbol de distancias de Nei definió bien las razas Zungo y San Pedroño, las cuales se alejaron del resto de los individuos. Los cerdos Casco de Mula y Zungo (CLEM) se agruparon con los comerciales, lo que indicó la presencia de introgresión con razas foráneas.

Palabras claves: Cerdo; variación genética; microsatélites; RAMs; Colombia.

SUMMARY

Using the molecular technique RAMs (Random Amplified Microsatellites), the genetic diversity and the existent genetic relationships were determined among 35 Colombian Creole pigs (Zungo, San Pedroño, Mule Foot) and a sample of commercial type individuals. Forty six polymorphic loci were found and the heterozygosity values for the RAM markers fluctuated among 0.22 for CCA and 0.19 for CT and CGA, with 93.30% of polymorphic loci for CCA, 82.3 % for CT and 68.75% for CGA. The heterozygosity was of 0.2016 and the Fst was 0.3058 ± 0.0433 . The Nei distances tree established a very well defined group formed by the Zungo and San Pedroño breeds, which moved away from the rest of the individuals; the Mule foot pigs and Zungo (CLEM) were grouped with the commercial ones, indicating introgresion with foreign breeds.

Key words: Swine; genetic variation; microsatellites; RAMs; Colombia.

INTRODUCCIÓN

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

tras que en los sistemas de economía campesina se emplean cruces de cerdos criollos con razas comerciales (Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2002).

En la actualidad se reconocen tres razas de cerdos criollos (Zungo en la Costa Atlántica, Casco de Mula en los Llanos Orientales y San Pedroño en Antioquia y Viejo Caldas), los cuales se originaron de individuos introducidos por los conquistadores españoles y se caracterizan por altas tasas reproductivas, tolerancia a enfermedades parasitarias y supervivencia. Los cerdos criollos colombianos han desarrollado

mecanismos de ajuste y adaptación al trópico que les permiten producir y reproducirse, contrarrestando factores adversos como son la alimentación deficiente, escasez de agua, enfermedades y manejo precario. El cerdo Zungo es negro, con escasa cantidad de pelos, hocico mediano, orejas amplias y caídas, cuerpo cilíndrico, grupa algo inclinada, extremidades finas y cortas (Díaz, 1965). El San Pedreño es mediano con capa y piel negras, pelo abundante, trompa corta a mediana y perfil entre cóncavo y subcóncavo (Pérez, 1989). El Casco de Mula se ha domesticado en algunas zonas de los Llanos Orientales; tiene la pezuña fundida, semejante al casco equino, tamaño mediano, piel negra, pelaje rojo, anca caída, patas fuertes y cortas (Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2002). Se sospecha que puede resistir a aftosa y cólera porcinas (Arias, 2000). Las comunidades campesinas han conservado las razas criollas en zonas marginales de difícil acceso, como fuente importante de proteínas de bajo costo (Mazuera y Concha, 2002). Los cerdos Casco de Mula y San Pedreño se encuentran en peligro de extinción, ya que la población se estimaba en el 2000 entre 100 y 1.000 individuos (FAO, 2000).

Zietkiewics *et al.* (1994) propusieron una técnica que combina los beneficios de los análisis microsatélites con el universalmente utilizado análisis RAPDs. Hantula *et al.* (1997) propusieron el nombre de RAMs (Random Amplified Microsatellites) para la técnica y diseñaron *primers* con una longitud de 18 bases, con el extremo 5' degenerado para asegurar la unión del *primer* al inicio del microsatélite. Los fragmentos de ADN amplificados con RAMs están compuestos de dos microsatélites localizados cerca para que se puedan amplificar.

Con el objetivo de caracterizar la variabilidad genética de porcinos criollos se evaluaron 35 individuos de las razas Zungo, San Pedreño y Casco de Mula y 13 individuos de cerdos comerciales, utilizando la técnica molecular RAMS (Random Amplified microsatellites).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio, que se adelantó en la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, se tomaron 35 muestras de cerdos criollos colombianos (16 de Zungo, 14 de San Pedreño y 5 de Casco de mula) y 13 de líneas comerciales. Once de las muestras de Zungos procedían del Centro de Investigación Corpoica-Turipaná (Cereté, Córdoba) y 5 del Centro Latinoamericano de Especies Menores (CLEM-Tuluá); las muestras de San Pedreño del Centro de Investigación

Corpoica-El Nus (San Pedro- Antioquia) y las de Casco de Mula de la granja de la Universidad Nacional de Colombia (Palmira). Las muestras de cerdos comerciales incluían cruces entre Landrace, Yorkshire, Large White, Duroc y Pietrain. El ADN se extrajo por el método *Salting Out* (Sambrook *et al.*, 1998) a partir de las muestras de sangre obtenidas por punción en la vena yugular. Se utilizaron cinco primers RAMs: AG: (5' - HBH (AG)₇A-3'); CT: (5' - DVD (CT)₇C-3'); CA: (5' - DBD A (CA)₇-3'); CCA (5' - DDB (CCA)₅-3') y CGA: (5' - DHB (CGA)₅-3'), donde: H(A, T o C); B (G, T o C); V (G, A o C) y D (G, A o T). Las condiciones de amplificación fueron: buffer Taq 1X y MgCl₂ (2.5 mM), dNTPS (0.2mM), primer (4 μM), DNA 20ng, 1 U de Taq polimerasa en un volumen total de 25 μl. El perfil térmico de amplificación se realizó en 37 ciclos, con una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por uno de 30 segundos; la etapa de hibridación varió de acuerdo con el primer (CCA y CT 55 °C y CCA 58° C) durante 45 segundos y una extensión a 72° C por 7 minutos. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 10X (Trisma Base, Ácido Bórico, EDTA 0.5M) teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se estimó por comparación con un marcador de 100pb de DNA de Lamda (Promega, USA).

La diversidad genética se estimó mediante la Heterocigosidad insesgada (Nei, 1973). Se realizó un análisis UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) mediante el programa TFPGA (Miller, 1997) y los programas SANH y TREE NTSYS versión 2.3. Se estimó el estadístico F como coeficiente de diferenciación genética utilizando el paquete estadístico TFPGA, suponiendo el equilibrio Hardy-Weinberg, por tratarse de un marcador dominante y con un intervalo de confianza del 95%. Se calculó la variación dentro de población y entre población mediante el programa AMOVA (Excoffier, 1992).

RESULTADOS

Dos de los cinco *primers* fueron monomórficos; CCA, CT y CGA presentaron alto polimorfismo con 92.3, 82.3 y 68.7%, respectivamente. Se encontraron 46 loci, 13 en el primer CCA, 17 en CT y 16 en CGA. La heterocigosidad fue de 0.22 ± 0.07 para CCA, 0.19 ± 0.07 para CT y 0.19 ± 0.04 para CGA. Los patrones de amplificación mostraron variación en los diferentes tipos de cerdos criollos (Figura 1). Solamente se encontraron alelos únicos en San Pedreño, los cuales se podrían utilizar como identificadores de la raza.

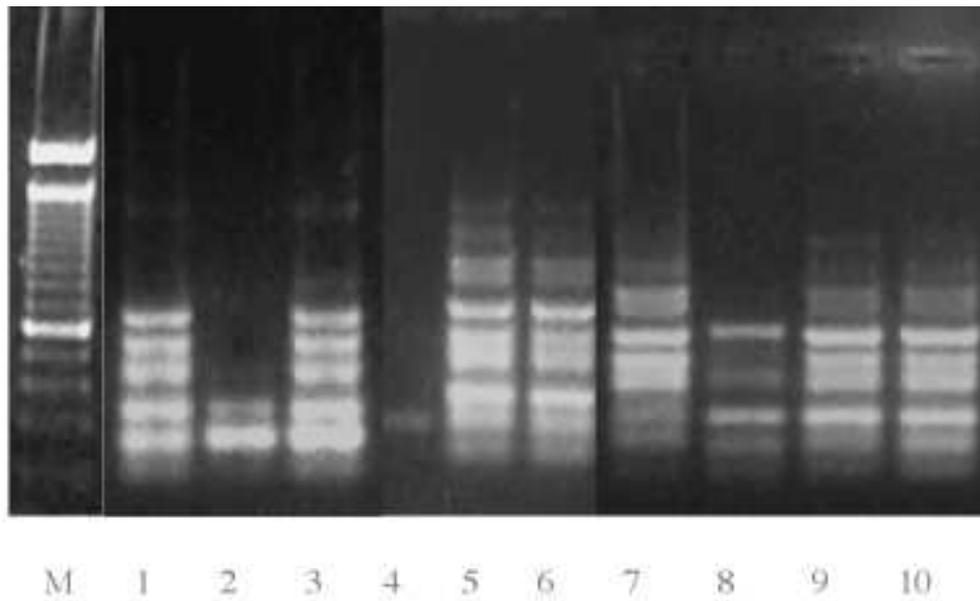


Figura 1. Patrones de bandas obtenidos del cebador CGA (RAMs) de los individuos San Pedroño (1-3), Zungo Turipaná (4-7), Zungo CLEM (8-10). M = Marcador de Peso Molecular (100pb).

La H_e para la población total fue de 0.2018 (Tabla 1); los valores más altos se presentaron en cerdos Zungos del CLEM sometidos a cruzamiento con razas foráneas y en cerdos comerciales. El porcentaje de loci polimórfico osciló entre 41.3 (San Pedroño) y 56.5 % (Zungo CLEM). El San Pedroño mostró el menor valor de diversidad genética debido a que las muestras provinieron de un pequeño núcleo de conservación que consta de 22 individuos. Los valores de heterocigosidad encontrados fueron menores que los reportados con microsatélites en 10 poblaciones de cerdos ibéricos cuyo rango de h_e fue de 0.46-0.64 (Martínez *et al.*, 2000).

Tabla 1. Heterocigosidad insesgada (h_e) y porcentaje de loci polimórficos en cerdos.

Población	Tamaño de muestra (n)	h_e	Loci polimórfico (95%)
San Pedroño	14	0.1071	41.30
Zungo (Turipaná)	11	0.1670	45.65
Casco Mula	5	0.1739	50.0
Cerdo Comercial	13	0.2035	54.34
Zungo (CLEM)	5	0.2348	56.52
Total	48	0.2018	100

Las poblaciones más cercanas (Tabla 2) fueron las de raza Casco de Mula y los cerdos comerciales (0.0269), debido a que las muestras de la primera provinieron de una finca en la que el programa de mejoramiento se basa en cruces con cerdos comerciales y se ha seleccionado el rasgo de la pezuña fundida, puesto

que el productor asegura que presentan cierta resistencia a la aftosa (Arias, 2000).

Las poblaciones más lejanas fueron las de raza Zungo (CLEM) y San Pedroño (0.135). La menor similitud se obtuvo entre los Zungos de Turipaná y San Pedroño; los cerdos Zungo del CLEM presentaron mayor similitud con los cerdos comerciales (0.9273) y con los Casco de Mula (0.9417) que con los Zungo de Turipaná (0.8805) y con los San Pedroño (0.8730), lo que muestra cierto grado de introgresión y que el núcleo del CLEM debe renovarse para que represente la raza criolla Zungo. De acuerdo con el árbol de distancias se formaron cuatro grupos (Figura 2), los cerdos Zungos (Turipaná y Clem) y el San Pedroño formaron grupos independientes, mientras que los cerdos Casco de Mula y los comerciales se agruparon.

En el árbol construido con todos los individuos mediante el coeficiente de similaridad de Nei (Figura 3) se formaron seis grupos. El primero incluyó los cerdos Zungos de Turipaná, el segundo lo conformó un Zungo del CLEM (No. 4 macho), animal que sería importante conservar. El tercero cerdos comerciales y Casco de Mula; el cuarto Zungos del CLEM y animales comerciales. Los núcleos de San Pedroño y los Zungo de Turipaná han sido conservados por Corpoica y se diferencian porque han evolucionado independientemente en condiciones geográficas de Antioquia y Córdoba.

Tabla 2. Distancia genética insesgada de Nei (1978) en la parte inferior de la diagonal, e identidad genética no sesgada de Nei (1978) en la parte superior de la diagonal, entre cuatro poblaciones de Cerdo Criollo y una de Cerdo Comercial.

Población	1	2	3	4	5
1. San Pedroño	****	0.8759	0.9366	0.9318	0.8730
2. Zungo (Turipaná)	0.1325	****	0.9139	0.9130	0.8805
3. Casco de Mula	0.0655	0.0900	****	0.9735	0.9417
4. Cerdos Cciales.	0.0706	0.0911	0.0269	****	0.9273
5. Zungo CLEM	0.1359	0.1273	0.0601	0.0755	****

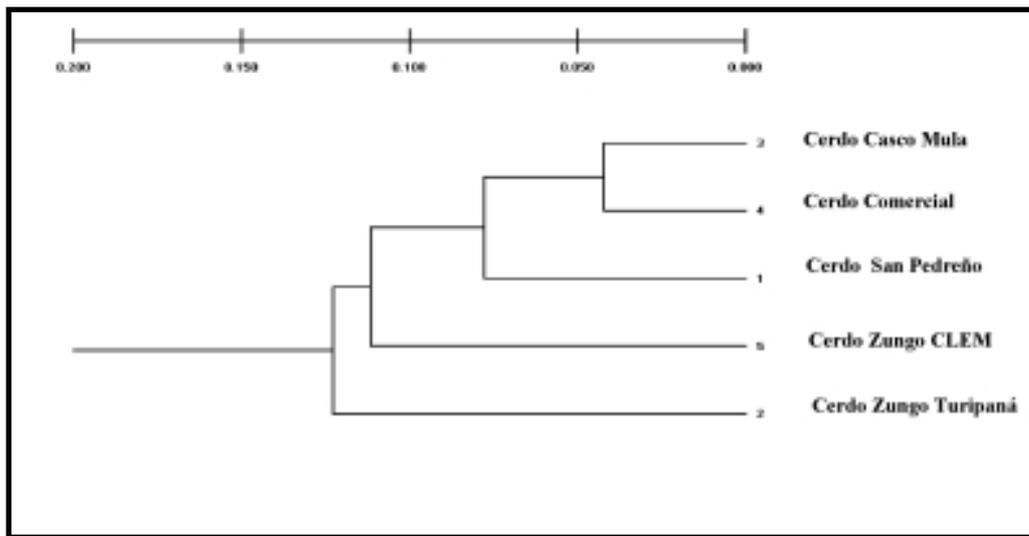


Figura 2. Árbol de distancias de Nei (1972) basado en el coeficiente de similaridad de Nei – Li y el método UPGMA, mediante el programa estadístico TFPGA® para cuatro poblaciones de cerdos criollos y una de Cerdo Comercial, utilizando RAMs.

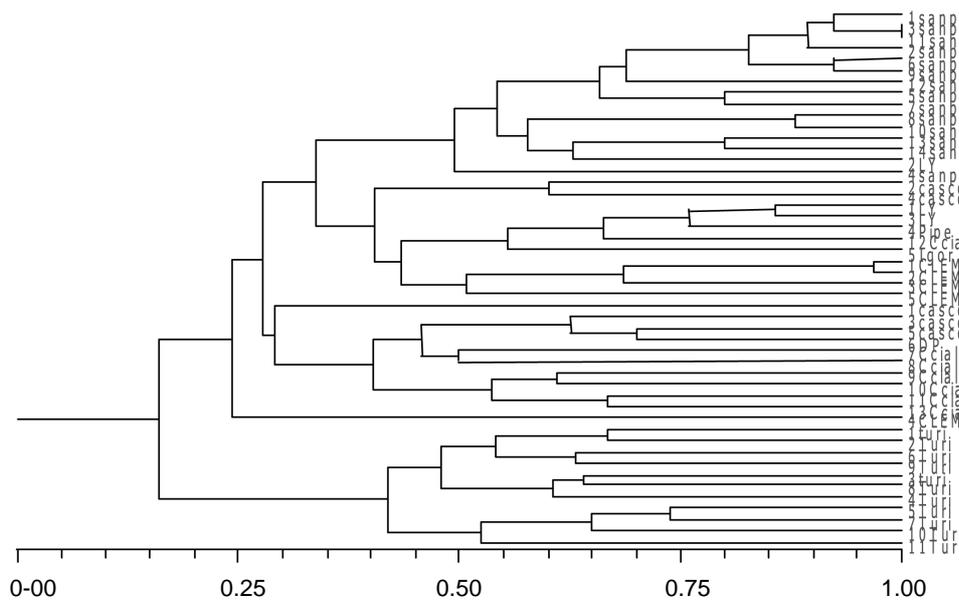


Figura 3. Árbol de distancias de Nei (1972) basado en el coeficiente de similaridad de Nei – Li y el método UPGMA, para cuatro poblaciones Cerdos Criollos y una población de Cerdos Comerciales.

DISCUSIÓN

El tamaño de muestra utilizado en el estudio fue pequeño, debido a la dificultad en la consecución de las muestras; dos de las razas se han declarado en peligro de extinción y además se encuentran en zonas marginales de difícil acceso y con problemas de orden público. Los resultados pueden reflejar la situación general de los porcinos criollos en Colombia, que al igual que bovinos y aves criollas han sido absorbidos por razas foráneas en vía de adaptación y dependientes de insumos. Si bien es cierto que estos cruces han originado alta variabilidad genética, es posible que las poblaciones continúen decreciendo sin haber estudiado sus ventajas adaptativas tales como alta fecundidad, resistencia al calor, tolerancia a enfermedades y parásitos y la facilidad para degradar forrajes toscos.

Los grupos conservados por Corpoica se han mantenido puros; la población de Zungos (Turipaná) retuvo altos niveles de heterocigosidad, lo cual indica que la selección de los animales fundadores fue adecuada y se mantiene una estructura de apareamientos que controla la consanguinidad. El San Pedroño presenta menor diversidad genética debido al bajo número de animales fundadores y a que es un banco de germoplasma de reciente formación (dos años).

En cerdos ibéricos se han identificado mediante microsatélites variedades muy definidas como Torbiscal, Retinto y Lampiño, Manchado de Jabugo y Mamellado (Martínez *et al.*, 2000).

El valor de F_{ST} (0.30 ± 0.04) indicó una diferencia genética muy grande entre los grupos analizados, lo cual justifica su conservación como recurso genético. Los individuos Zungo de Turipaná y San Pedroño fueron los que más se diferenciaron. La divergencia encontrada confirma la utilidad de las secuencias repetitivas no codificantes, para discriminar entre poblaciones. Aunque los cerdos San Pedroño y Zungo se originaron de la raza Extremeña Lampiña, el aislamiento geográfico contribuyó a generar cambios en genes y fenotipos (Ej.: presencia de pelaje en el San Pedroño) y también en regiones no codificantes del ADN, donde se concentran las secuencias repetidas amplificadas por los RAMs. El estadístico F_{ST} confirmó los resultados obtenidos con el dendrograma individual. La diferenciación genética se podría asociar con caminos migratorios que poblaron las diferentes regiones geográficas, los grados de cruzamiento, así como a factores de selección natural, adaptación a diferentes ecosistemas. El conjunto de estos sugiere que las poblaciones de cerdos criollos colombianos tienen un germoplasma variado y heterogéneo.

En el análisis de varianza molecular se obtuvo una variación dentro de poblaciones del 66.46% y entre poblaciones del 33.54%. Las diferencias entre poblaciones se deben a las distancias entre Zungos de Turipaná y San Pedroño y las distancias de algunos individuos del CLEM con estas dos razas, la diferencia dentro de grupos se debe a la variación al interior de Turipaná y San Pedroño y a que los comerciales se distribuyen espacialmente en otros grupos (Figura 3). Los cerdos criollos colombianos deben conservarse y utilizarse puesto que han estado vinculados a la economía campesina aportando proteínas y es posible que porten mutaciones génicas no presentes en otras poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

A Juan Gonzalo Morales, ingeniero agrónomo (UNAL); a Juan Esteban Pérez de C. I. de Turipaná de Corpoica (Córdoba) y a César Rodríguez de Granjas Paraíso (Cali). A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del trabajo de grado del primero de los autores.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias, D. 2000. El Cerdo Sindha Colombiano. *En*: Congreso Iberoamericano de razas autóctonas y criollas. La Habana, Cuba. 270 p.
- Cabezas, M. A. 1976. Estudio comparativo de la raza nativa de cerdo Zungo con razas mejoradas. Tesis M.Sc. Bogotá: UN-ICA. 30-125 p.
- Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2002. Situación de los Recursos Zoogenéticos en Colombia. Bogotá, 119 p.
- Díaz, R. 1965. Ganado Porcino. Barcelona: Salvat.
- Excoffier, L. 1992. Software AMOVA (Analysis of Molecular Variance). Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- FAO. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity 3rd Ed. 746 p.
- Hantula, J.; Dusabenyagasani, P.; Hamelin, C. 1997. Random Amplified Microsatellites (RAMS) A Novel Method for Characterizing Genetic Variation within Fungi. *Eur J For Path* 26: 159-166.
- Martínez, A. M.; Rodero, A.; Vega-Pla, J. I. 2000. Estudio con microsatélites de las principales variedades del ganado porcino del tronco ibérico. *Arch. Zootec.* 49: 45-52.
- Mazuera, H.; Concha, V. 2002. Crío-conservación de semen de cerdos con características de Casco de Mula. Trabajo de Grado (Zootecnia). Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
- Miller, M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3321-3326.
- Pérez, I., J. 1989. Comportamiento de la raza porcina San Pedroño pura y mestiza. *En*: Azooda. Simposio nacional sobre investigación en porcicultura, 1^{er}, Medellín, junio 29 - 30.
- Pinheiro, M. 1976. Los cerdos. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

Sambrook, J.; Russell, D. 1998. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 4th Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sneath, H. A.; Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W.H. Freeman. San Francisco. 573 p.

Zietkiewics. E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Amplification. *Genomics* 20: 176-183.