

# “Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha de Uruguay”



Lic. María del Carmen Montenegro

Tesis-Maestría en Ciencias Biológicas  
Subárea Genética-PEDECIBA

**Orientadora:** Dra. Silvia Llambí. Área Genética, Departamento de Genética y Mejora Animal, Instituto de Producción Animal. Facultad de Veterinaria-UdelaR.

Setiembre de 2012

## **Agradecimientos**

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica por la financiación.

A mi tutora, la Dra. Silvia Llambí, por su orientación académica y por motivarme a seguir desde mis comienzos.

A los Dr. Juan Vicente Delgado, Vincenzo Landi, Cecilio Barba y Dra. Amparo Martínez por su recibimiento en la universidad de Córdoba y por sus aportes sin los cuales no hubiese sido posible finalizar este trabajo.

A los Dr. Gustavo Castro, Ing. Agr. Nelson Barlocco y Prof. Antonio Vadell, compañeros de trabajo, sin cuya participación, ésta tesis no podría haberse realizado.

Al personal de la Unidad de Producción de Cerdos del centro Regional Sur (Facultad de Agronomía), a la Dra. Lucy Kelly y la Dra. Alejandra González por facilitarme las muestras.

A la Msc. Jimena Hochmann, Dra. Eileen Armstrong, Dra Rosa Gagliardi y Bach. Rody Artigas por sus comentarios.

A mis compañeros del Área Genética de Facultad de Veterinaria.

Al tribunal por sus aportes.

A mis amigos, por estar siempre ahí, acompañándome en los buenos y malos momentos.

A mi familia, principalmente a mis padres, por acompañarme y alentarme siempre, sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

## Índice

<b>Resumen</b>	6
<b>1. Introducción</b>	9
1.1 Origen y Domesticación del cerdo	9
1.2 Introducción del cerdo en América	12
1.3 Introducción del cerdo en la República Oriental del Uruguay	15
1.4 Situación actual de los recursos zoogenéticos porcinos locales en la República Oriental del Uruguay	15
1.5 Conservación de los recursos zoogenéticos	20
1.6 Marcadores moleculares aplicados en estudios de conservación	23
1.7 Polimorfismo de nucleótido simple en genes mayores de importancia económica en cerdos	24
1.7.1 Receptor de rianodina (CRC1)	25
1.7.2 $\alpha$ (1,2)- fucosiltransferasa (FUT1)	26
1.7.3 Receptor de Estrógeno (ESR)	27
1.8 Marcadores microsatélites	28
1.9 Análisis de datos obtenidos mediante marcadores microsatélites	30
1.9.1 Frecuencias alélicas	31
1.9.2 Heterocigosidad	31
1.9.3 Heterocigosidad observada	32
1.9.4 Heterocigosidad esperada	32
1.9.5 Contenido de Información Polimórfica (PIC)	33
1.9.6 Equilibrio Hardy-Weinberg	33
1.9.7 Estadísticos F	34
1.9.8 Asignación individual a clusters	35
1.9.9 Distancias genéticas	36
1.9.9a $F_{ST}$ como distancia genética	37
1.9.9b Árboles de distancia genética	38
1.9.9c Métodos para construcción de árboles de distancia genética	40
1.9.9d Métodos de remuestreo	40
1.9.10 Análisis Factorial de Correspondencia	41
1.10 Caracterización morfométrica	42
<b>2. Hipótesis de trabajo</b>	46
<b>3. Objetivo general</b>	46

3.1 Objetivos específicos	46
<b>4. Materiales y Métodos</b>	47
4.1 Obtención de las muestras	47
4.2 Aislamiento de ADN	47
4.2.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de folículo piloso (Chelex modificado)	47
4.2.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera. Técnica con Fenol cloroformo	48
4.3 Caracterización genética molecular	49
4.3.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores	49
4.3.1a CRC1	49
4.3.1b FUT1	50
4.3.1c ESR	51
4.4 Análisis mediante microsatélites	51
4.4.1 Condiciones básica de la PCR	53
4.5 Caracterización morfométrica	56
<b>5. Resultados</b>	61
5.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores	61
5.1.1 CRC1	61
5.1.2 FUT1	62
5.1.3 ESR	65
5.2 Análisis mediante microsatélites	67
5.2.1 Número de alelos y PIC	68
5.2.2 Heterocigosidad	68
5.2.3 FIS y Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg	69
5.2.4 Comparación genética de los cerdos Pampa Rocha con otras poblaciones porcinas	71
5.2.4a Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)	71
5.2.4b Asignación individual a clusters	73
5.2.4c Distancia genética	75
5.2.4d Análisis Factorial de Correspondencia	78
5.3 Caracterización morfométrica	79
5.3.1 Estudio comparativo	80
<b>6. Discusión</b>	82
6.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores	82

6.1.1 CRC1	82
6.1.2 FUT1	84
6.1.3 ESR	86
6.2 Análisis mediante microsatélites	87
6.2.1 Número de alelos, PIC y heterocigosidad	87
6.2.2 FIS y Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg	88
6.2.3 Comparación genética de los Pampa Rocha con otras poblaciones porcinas	91
6.2.3a Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)	91
6.2.3b Asignación de individuos a clusters	93
6.2.3c Distancias genéticas	93
6.2.3d Análisis Factorial de Correspondencia	95
6.3 Caracterización morfométrica	96
6.3.1 Peso	97
6.3.2 Longitud y ancho de cabeza	98
6.3.3 Ancho interorbital	98
6.3.4 Longitud y ancho del hocico	98
6.3.5 Longitud y ancho de la oreja	99
6.3.6 Longitud y ancho de la grupa	99
6.3.7 Perímetro de la caña	99
6.3.8 Perímetro torácico	100
6.3.9 Alzada a la cruz	100
6.3.10 Alzada a la grupa	100
6.3.11 Alzada al nacimiento de la cola	101
6.3.12 Diámetro longitudinal	101
6.3.13 Índices	101
6.3.14 Coeficientes de variación	103
<b>7. Conclusiones</b>	105
<b>8. Perspectivas</b>	107
<b>Bibliografía</b>	108

## Resumen

En el presente trabajo se realizó una caracterización genética y morfométrica del recurso porcino local Pampa Rocha y se lo comparó con otras razas (Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Large White, Meishan e híbridos).

Con este objetivo se estudió: 1) la variabilidad genética, analizando polimorfismos en genes mayores (CRC1, FUT1 y ESR) y marcadores microsatélites, 2) la variabilidad morfológica analizando variables morfométricas cuantitativas.

Para los genes que codifican el Receptor de Rianodina (CRC1), la  $\alpha$  (1,2)-fucosiltransferasa y el Receptor de estrógeno (ESR), el análisis se realizó en una muestra de cerdos Pampa Rocha y razas comerciales (Duroc, Landrace, Large White, Pietrain e híbridos).

Para analizar el polimorfismo en el gen CRC1 se utilizó la técnica de PCR-RFLP, obteniéndose en el total de la muestra (N=80) frecuencias genotípicas de 38.75 % para los homocigotas NN, 52.5 % para los heterocigotas Nn y 8.75 % para el genotipo nn. En los cerdos Pampa Rocha (N=14), se obtuvo una frecuencia de homocigotas NN de 87.5 % y de heterocigotas Nn de 12.5 %. Se destaca la identificación por primera vez del alelo mutante n, causante del Síndrome de Estrés Porcino, en los cerdos Pampa Rocha.

Para el gen FUT1 el genotipado se realizó por análisis de secuenciación. En el total de la muestra (N=89) se obtuvieron frecuencias de 12,3% para el genotipo AA, 56,2% para heterocigotas AG y 31, 4% para homocigotas GG. En los cerdos Pampa Rocha (N=23), se obtuvieron frecuencias de 13 % para los homocigotas AA, 74 % para los heterocigotas AG y 13 % para los homocigotas GG.

En el caso del gen ESR el estudio del polimorfismo se efectuó por PCR-RFLP y análisis de secuenciación. Como resultado se obtuvo en el total de la muestra analizada (N=64) un 100 % de individuos homocigotas AA.

Mediante microsatélites se analizó la variabilidad genética en una muestra de 39 individuos Pampa Rocha, con un panel de 25 marcadores recomendados por la FAO/ISAG. Se determinó que los Pampa Rocha presentan una alta variabilidad genética con valores de heterocigosidad observada de 0,583 y

esperada de 0,603. El número medio de alelos fue de 5,72; la mayoría de los marcadores (24) resultaron polimórficos, el 95,8 % de estos se encontró en Equilibrio Hardy Weinberg y se determinó un bajo nivel de endogamia ( $F_{IS}=0,0475$ ).

Con el objetivo de determinar la diferenciación genética con otras razas, se llevaron a cabo diferentes análisis: AMOVA (Análisis molecular de la varianza), asignación individual a clusters, cálculo de distancia genética y elaboración de árboles, y análisis factorial de correspondencia. Las razas incluidas para esta comparación con Pampa Rocha fueron: Ibérico, Celta, Duroc, Berkshire, Landrace, Large White, Pietrain y Meishan.

En el Análisis molecular de varianza se obtuvieron porcentajes de variación entre 7.18 y 20.44 % y valores de  $F_{ST}$  entre 0.313 y 0.384. En la asignación individual a clusters y en el Análisis factorial de correspondencia se observó una separación clara de los cerdos Pampa Rocha. En los árboles obtenidos a partir de la distancia genética  $D_A$  se observa un agrupamiento de los cerdos Pampa Rocha con la raza Meishan.

A partir de los diferentes datos obtenidos de estos análisis se concluye que existe diferenciación entre los Pampa Rocha y estas razas, y que los Pampa Rocha constituyen un grupo genético bien definido.

En el estudio de las variables morfométricas, entre los principales variables estudiadas se encontraron los siguientes resultados: peso vivo de 148,6 Kg en hembras y 172,66 en machos; perímetro de la caña de 19,82 cm en hembras y 22,66 cm en machos; alzada a la cruz de 74,97 cm y 82,33 cm para hembras y machos respectivamente, y longitud corporal de 102,2 cm en hembras y 99 cm en machos. La mayoría de las variables presentaron altos porcentajes de variación. A partir de estos datos se observa como los cerdos Pampa Rocha presentan ciertas particularidad morfológicas, diferenciándose de la mayoría de los recursos porcinos iberoamericanos ya que presentan medidas superiores a las presentadas por algunos recursos criollos empleados para su comparación (criollo cubano, venezolano, colombiano, brasilero, argentino). También se efectuó un análisis de varianza con las principales variedades del cerdo ibérico, obteniéndose como resultado una diferenciación de los Pampa Rocha con estas variedades, ya que todas las variables resultaron con diferencias

significativas ( $p < 0.05$ ).

A partir de todos los datos obtenidos se concluye que los cerdos Pampa Rocha presentan una alta variabilidad genética constituyendo una entidad genética definida. Por lo mencionado anteriormente es un recurso que merece ser conservado.

**Palabras claves:** conservación, recursos zoogenéticos, marcadores moleculares, morfometría.

## 1. Introducción

### 1.1 Origen y Domesticación del Cerdo

El cerdo doméstico (*Sus scrofa*) es un mamífero perteneciente a la familia Suidae, Orden Artiodactyla. Desciende del cerdo salvaje o jabalí, sin embargo, aún existe controversia respecto tanto al origen como al tiempo de domesticación del mismo, y se discute si los cerdos actuales se originaron a partir del jabalí Europeo, Asiático o a partir de ambos (Pinheiro Machado, 1973; Castro, en <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

La domesticación de esta especie fue lenta y progresiva y se estima que se inició en Europa entre el 7.000 y el 3.000 a.C., a pesar que investigadores chinos reivindican el origen chino del cerdo doméstico actual, que se habría iniciado en la región sur de ese país en el año 10.000 a.C.

Larson et al., 2005 afirma que el linaje basal de *Sus scrofa* tuvo origen en el Sudeste Asiático y desde allí se dispersó hacia la India, posteriormente hacia el Este de Asia, ocurriendo finalmente una dispersión progresiva hacia Eurasia, desde donde pasaron a Europa Occidental.

Se argumenta que la preferencia que se le dio a estos animales para su domesticación fue debida a la importante fuente proteica que representó para varias civilizaciones, así como las características organolépticas de la carne, lo cual está comprobado por la cocina china, que gira en torno a ésta especie (Rothschild & Ruvinsky, 1998).

En base a un estudio con marcadores mitocondriales y nucleares de cerdos salvajes y domésticos, tanto asiáticos como europeos, se ha encontrado evidencia a favor de una domesticación independiente a partir de subespecies de cerdos salvajes en Europa y Asia, estimando una separación de estas poblaciones hace unos 500.000 años, muy anterior al tiempo estimado de domesticación. También se halló evidencia a favor de la introgresión de razas Asiáticas en razas Europeas indicando un origen híbrido para alguna de estas razas. Esto concuerda con la existencia de documentos en los cuales se hace referencia al uso de cerdos asiáticos en la mejora de razas Europeas en el transcurso del siglo XVIII y principios de XIX (Giuffra et al., 2000).

La domesticación generó modificaciones en los animales, entre las que se observa un aumento o mantenimiento del tamaño corporal, en especial de los cerdos criados en Europa. Esto fue consecuencia básicamente del tipo de dieta, más rica en energía en Europa y con menos energía y más fibra en Asia, originando cerdos de menores dimensiones. A lo largo de la domesticación también se fue dando un desarrollo diferente de las partes del cuerpo de los animales, dada la mayor disponibilidad de nutrientes desde la temprana edad. También se dieron diferencias respecto al temperamento y reacción de los animales. Los chinos comenzaron a domesticar y confinar más temprano sus cerdos, en estabulación o próximos entre sí, debido a la necesidad de mayor disponibilidad de recursos y de tierras para la agricultura. Debido a esta mayor proximidad al hombre y consecuente selección, las razas del tronco asiático se volvieron más tranquilas, comparadas con las del continente europeo. Con las singularidades comportamentales y de los sistemas productivos asiáticos, los cerdos pasaron a hojar menos tiempo, disipando menos energía con esta actividad, llevando a que depositaran más fácilmente la grasa y aumentaran la eficiencia de conversión alimenticia (Rothschild & Ruvinsky, 1998).

Las diferencias en el desarrollo corporal entre cerdos salvajes y domésticos podrían explicarse en parte por las teorías del crecimiento de Hammond (1962), citado por Revidatti (2009-Tesis Doctoral), quien propone que el hecho de que los nutrientes sean primariamente utilizados para el desarrollo de la cabeza, cerebro y médula espinal, y solo después a otras regiones, pasando a un segundo plano la deposición de carne y grasa, explicaría en parte las diferencias fenotípicas entre cerdos salvajes y domésticos.

Los cerdos se adaptaron a su entorno local y se diversificaron, siendo afectados por el clima, recursos naturales, métodos de ganadería aplicados y por el grado de cruzamientos con subespecies salvajes. De forma gradual se fueron seleccionando por sus características físicas, como el color, o por otras características particulares como la resistencia, fertilidad, habilidad materna, capacidad de producir grasa, u otras características consideradas importantes localmente. Antes de que existiera esta selección, la diversificación era consecuencia principalmente de la deriva genética, más que a la selección ejercida por el humano (Porter, 1993).

La porcicultura se extendió en el mundo debido a la gran adaptabilidad que identifica a los cerdos, exceptuando los países en los cuales se prohíbe a estos animales debido a razones culturales o religiosas (Castro, en: <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>). Son ejemplos, Egipto y muchos pueblos asiáticos, donde no se comía carne de cerdo por temor al contagio de la lepra, concepto que impidió la expansión de la especie en muchos países (Pinheiro Machado, 1973).

Los cerdos actuales pertenecen al género *Sus* y comprenden:

- los asiáticos (*S. vittatus*): de pequeño tamaño, antepasado de los cerdos domésticos de la región oriental y meridional de Asia, de frontal abovedado y cara corta, que daría lugar a todas las razas asiáticas.
- los célticos (*S. scrofa*): provenientes del jabalí europeo, forma primitiva a partir de la cual se originan las razas porcinas antiguas del norte y centro de Europa, cuyo centro de domesticación fue la región del Mar Báltico, y sus razas descendientes se caracterizaron por sus extremidades altas, tronco largo y aplanado coincidiendo con los denominados célticos.
- los ibéricos (*S. mediterraneus*) de origen africano: este cerdo era más compacto y de extremidades más cortas, dando lugar posteriormente a las razas circunmediterráneas, siendo su representante más destacado el cerdo Ibérico. Algunos autores consideran que esta es una forma de transición entre las dos anteriores a partir de la que han derivado las poblaciones porcinas de los países mediterráneos tanto del período prehistórico como de las épocas posteriores. (Castro, en: <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

## 1.2 Introducción del cerdo en América

Desde su introducción durante la conquista española y con posteriores aportes por la inclusión de otras razas exóticas, los individuos introducidos se aparearon libremente, modelándose en función de la selección natural, adaptación a los diferentes ambientes y, mediante la selección empírica y prácticas culturales ejercidas por las sociedades que los criaron, llegando a la formación de los denominados genéricamente “Criollos” (Morner, 1967, citado por Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

Desde mediados del siglo XIX a mediados del siglo XX, estos animales sufren un proceso de desvalorización con la introgresión genética de otras razas exóticas mejoradas, para su mestización y absorción, con una consecuente reducción del número de animales. A partir de mediados del siglo XX y hasta la actualidad, aunque continúa la introducción de razas exóticas, en los últimos años se ha dado una revalorización de estos recursos, aumentando los planes de conservación y utilización productiva de los criollos (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

Previo al descubrimiento de América en 1492 nuestro continente carecía de la mayoría de los actuales animales domésticos. Estas especies, arribaron a las Antillas, desde donde pasaron al resto del continente.

A través del tiempo, los productos españoles, incluidos los animales domésticos siguieron dos rutas principales, una desde los puertos del Sur de España hacia sus destinos finales, haciendo una parada en las Islas Canarias, y una segunda, similar, pero incluyendo una parada en las Antillas.

El origen de casi todas las exploraciones atlánticas durante el siglo XV fueron las áreas costeras del Centro y sur de Portugal, y la bahía de Cádiz en Castilla. Después del descubrimiento, ya en el siglo XVI, el comercio de Castilla con América estuvo centrado en Sevilla. Una vez que el comercio estuvo completamente desarrollado, comenzó la participación de los puertos del norte, lo cual lleva a diferentes autores a suponer que la mayoría de los animales exportados pertenecían a las mismas áreas que los puertos andaluces. Sin embargo se admite que animales pertenecientes a otras áreas de Castilla también se exportaban (Rodero et al., 1992; Delgado, 2007).

Las Antillas fueron punto de introducción de los animales domésticos de

Andalucía, donde se reprodujeron e incrementaron durante el primer tiempo en América. Los exploradores en tránsito se suministraban de estos animales en estas islas. Los cerdos, debido a su prolificidad, fueron fácilmente criados y pronto alcanzaron una alta producción. Según Rodero et al., (1992) el cerdo ibérico realizó un aporte muy importante en la aparición de las razas porcinas criollas.

De acuerdo a Delgado (2007), está justificado en las crónicas, que el primer poblamiento de la América hispana se realizó con animales procedentes de la región sur occidental de la Península Ibérica. La cantidad de animales llegados en un principio fue reducida, debido al poco espacio en las naves y la duración del viaje, pero su rápida multiplicación, generó sucesivos cuellos de botellas en la formación de las razas criollas. Estos animales iniciales sufrieron muchas veces mestización en origen, debido a que los pocos animales con destino a América muchas veces eran concentrados en fincas de engorde hasta la partida de la expediciones y, de la misma manera, hubo un aporte de recursos autóctonos prehispánicos de las Islas Canarias.

A partir de las islas del Caribe, punto de multiplicación de los recursos ibéricos en América, se distribuyeron en tres líneas de expansión fundamentales. Una que partiendo del puerto mexicano de Veracruz se distribuye al norte hacia Estados Unidos de Norteamérica. Otra desde los puertos de Panamá hacia Centroamérica hasta llegar al Virreinato del Perú por la costa del Pacífico y hasta Venezuela. Finalmente ocurrió la colonización del Cono sur desde el Río de la Plata por una ruta hacia el actual Uruguay y sur de Brasil y finalmente subiendo las cuencas fluviales del río Paraná y Uruguay para llegar al sur del virreinato del Perú, Bolivia, y algunas regiones del Brasil (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

Otras potencias como Inglaterra también impulsaron la importación de sus razas locales y de sus colonias asiáticas y africanas.

Laguna (1998) corrobora que la introducción inicial del ganado porcino español en América se produjo en ocasión del segundo viaje de Colón en 1493 y fue relatado por Fray Bartolomé de las Casas en la "Historia de las Indias". De acuerdo a este relato, fueron ocho los cerdos que originaron a todos los cerdos que poblaron las Antillas y que se multiplicarían en poco tiempo. Esto formaba

parte de la política de los Reyes Católicos para fomentar la ganadería en el área de las Antillas, abasteciendo a las expediciones de conquista del continente americano, siendo Cuba un territorio básico de abastecimiento durante la primera etapa de la misma (Laguna, 1998).

Debido a las buenas condiciones para su subsistencia, estos animales se reprodujeron sin obstáculos y se fueron modificando de acuerdo con las características del clima y el suelo donde se desarrollaron, dando origen a los “Criollos” . Su difusión se efectuó de acuerdo con los límites impuestos por accidentes geográficos, adquiriendo características diferenciales a veces muy marcadas, alcanzando un número importante que, aunque de valor económico escaso en las primeras etapas, posteriormente constituyó la base sobre la cual se fundó la ganadería actual de América (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

Se afirma que la mayoría de las razas criollas descritas actualmente se ajustan al cerdo del tronco Mediterráneo. Entre ellas las poblaciones conocidas como “Pelón” que se encuentran en muchos de los países centroamericanos (México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica), y que mantienen su estatus original de domésticos, vinculándose a explotaciones familiares, y con una manifiesta tendencia al engrasamiento (Delgado et al., 2004).

Otros cerdos iberoamericanos que pudieron originarse en los antiguos cerdos ibéricos, sin descartar la posible influencia de otras poblaciones europeas, son los tres recursos locales descritos en Uruguay (Pampa Rocha, Mamellados y Casco de Mula); el Casco de Mula, el Sanpedreño y el Zungo colombiano y los criollos venezolanos. En Brasil, se describen varias razas como descendientes del tronco mediterráneo de procedencia portuguesa, identificándose diversos grupos de cerdos naturalizados, y conocidos con diferentes nombres (Canastra, Canastrao, Caruncho, Moura, Nilo, Píau, Pirapetinga, Tatu y Pereira). La raza Canastrao es incluida como descendiente del Cerdo Bísaro Portugués por lo cual se asignaría al tronco Celta (Castro, 2007; Vadell et al., 1994; Sabogal, 1992; Hurtado & González, 2004; Mariante et al., 2003; Egito et al., 2004).

### **1.3 Introducción del cerdo en la República Oriental del Uruguay**

En nuestro País, la introducción del cerdo tuvo lugar con la colonización e instalación de los primeros centros poblados estables (Villa Soriano en 1624, Colonia del Sacramento en 1680 y Montevideo en 1724). En la Tercera Ley de Indias y en los Edictos del Cabildo de Montevideo del año 1763 ya había referencia de estos animales.

Fue la instalación de los primeros saladeros en 1787, que dejaban una gran cantidad de residuos utilizables por los cerdos, el hecho que condujo a un aumento en la cantidad de estos animales. Este aumento continuó hasta 1900, observándose un descenso hasta la actualidad (Castro, 2007).

En 1966 se fundó La Sociedad Uruguaya de Criadores de Cerdos, filial de la Asociación Rural del Uruguay (ARU), la cual participa en las exposiciones de la ARU y organiza, desde 1997, un Concurso de Cerdos para Industria. La primera raza inscrita en el Swine Book Uruguayo fue la Large White en 1906. Las anotaciones posteriores reflejan las tendencias de producción predominantes en el país y en el mundo (Castro, en: <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

### **1.4 Situación actual de los recursos zoogenéticos porcinos locales en la República Oriental del Uruguay**

La República Oriental del Uruguay posee un clima y un territorio que lo hacen apto para la producción ganadera, actividad que ocupa el 62% de la superficie agropecuaria. La actividad agropecuaria constituye el 11% de la economía uruguaya generando el 73% de las exportaciones del país, siendo los rubros más importantes la carne bovina, productos agrícolas, cueros y lácteos. A pesar de que nuestro País, posee una muy buena disponibilidad para la cría de cerdos en sistemas sustentables donde se combinan la eficiencia productiva, el bienestar animal y el uso adecuado de los recursos genéticos locales, la producción porcina ocupa un lugar secundario en comparación a otras explotaciones agropecuarias. Sin embargo, la cría porcina tiene una importancia social como complemento del sustento de familias de pequeños y medianos productores rurales y periurbanos (Castro et al., 2007), situación que

se asemeja al resto de los recursos criollos en el continente americano.

La mayoría de los establecimientos se sitúan en los alrededores de Montevideo y en el sur, litoral oeste y sureste del país, relacionándose con una mayor disponibilidad de alimentos de bajo costo para los animales (subproductos generados por industrias alimenticias humanas y agroindustriales) y con los lugares de comercialización del producto final (Castro et al., 2007).

El estado sanitario de la pira uruguaya es satisfactorio debido a que está libre de las principales enfermedades consideradas por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). En 1991 se detectaron los últimos focos de peste porcina clásica y en 2001 los de fiebre aftosa, ocurriendo casos aislados de brucelosis y leptospirosis.

En Montevideo la cría de cerdos la llevan a cabo principalmente los clasificadores de residuos que viven en asentamientos irregulares en zonas periféricas de la ciudad. Para la alimentación de los cerdos utilizan los residuos orgánicos, así como residuos domiciliarios, industriales y comerciales (Castro et al., 2007).

Debido a un manejo inadecuado de la cría de cerdos se producen impactos sanitarios y ambientales. Los primeros son consecuencia de la proximidad de las porquerizas a las viviendas por lo cual aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades de los animales al hombre. El impacto ambiental se debe a la contaminación de suelos y cursos de agua, ya que los criaderos generalmente están cercanos a estos cursos de agua donde se destinan los residuos. La mayoría de los criadores no tiene acceso a medicamentos ni asesoramiento técnico, lo cual aumenta los riesgos sanitarios (Castro et al., 2007).

Los animales pueden ser comercializados, formal e informalmente, pero son destinados principalmente al autoconsumo.

La producción en nuestro País no se basa en recursos zoogenéticos locales, como consecuencia fundamentalmente del desconocimiento de las características de los mismos y la buena adaptación de las razas extranjeras (Castro et al., 2004). En el caso de cerdos, los animales criados son cruza entre razas comerciales (Large White, Landrace y Duroc) y razas criollas (Mamellado, Casco de Mula) (Castro et al., 2007).

La caracterización genética de una especie ganadera como el cerdo en nuestro

País, es muy importante, ya que permite conocer estos recursos, principalmente en vista de la conservación y uso sustentable de los mismos. También su estudio podría orientar programas de mejora en rendimiento y calidad de los productos, y establecer relaciones filogenéticas entre razas.

En Uruguay se han descrito tres recursos de cerdos locales: Mamellados (presentan apéndices pendulosos o mamellas en base de cuello, foto1), Casco de Mula (presentan la particularidad de sindactilia o fusión de los dedos, foto 2) y Pampa Rocha (presentan manto negro con seis puntos variables de pelaje blanco, foto 3) (Castro, 2007; Vadell et al., 1994).

Los Cerdos Pampa Rocha habitan naturalmente en el este de nuestro País, principalmente el departamento de Rocha, en un ecosistema de bañados (foto 4). En el año 1996 se creó la Unidad de Producción de Cerdos (UPC) en el Centro Regional Sur (foto 5), estación experimental de Facultad de Agronomía, constituyéndose el plantel de reproductores de esta raza.

**Foto 1: Cerdo Mamellado**



**Foto 2: Cerdo Casco de Mula**



**Foto 3: Cerdo Pampa Rocha**



**Foto 4:** Habitat natural del cerdo Pampa Rocha



**Foto 5:** Unidad de Producción de Cerdos-Centro Regional Sur  
(Facultad de Agronomía)



Según la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los dos primeros se encuentran en estado crítico a conservar (menos de 100 reproductores), mientras que los cerdos Pampa Rocha se encuentra en situación sin riesgo pero a preservar (más de 1000 reproductores) (Delgado, 2002). A partir del año 2002 las posibilidades de extinción de estos animales ha aumentado debido al descenso del número de pequeños productores de la región este del País (reconversión de los mismos

hacia un trabajo zafral en la industria arrocera). A esto se le suma la ausencia de políticas de organismos especializados que se dediquen a la conservación de esta raza. En la actualidad los dos núcleos mayores de reproductores de los cerdos Pampa Rocha se encuentran en el Centro Regional Sur en Progreso, Canelones (Facultad de Agronomía, UdelaR) y en la Fundación Quebracho en Cerro de las cuentas, Cerro Largo (ONG, <http://www.chasque.net/funque/>) (Vadell, 2011), desconociéndose el número de individuos en otras zonas del País.

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los recursos porcinos locales en Uruguay, siguiendo la tendencia observada en otros países hacia la recuperación de estos recursos.

En el caso de los cerdos Pampa Rocha, estos se encuentran bien caracterizados a nivel productivo. En la actualidad se están desarrollando dos investigaciones (Tesis de Posgrado), en Facultad de Agronomía-UdelaR, una que busca la caracterización lípidica y proteica de la carne en cerdos Pampa Rocha, y otra orientada a la caracterización de factores ambientales y genéticos en indicadores reproductivos en cerdos (Barlocco & Vadell, 2011). Sin embargo, la información, desde el punto de vista genético y la caracterización morfométrica continua siendo insuficiente.

### **1.5 Conservación de los Recursos Zoogenéticos**

Se define Biodiversidad, según la Convención de Río de Janeiro en 1992, como el conjunto de ecosistemas, especies y variedades genéticas existentes en un país. La biodiversidad de los animales domésticos está compuesta por los recursos genéticos animales, que comprenden todas las especies, razas y estirpes que implican interés económico, científico y cultural para la agricultura, tanto en la actualidad como en el futuro. Se consideran recursos genéticos animales aquellas poblaciones que poseen rasgos genéticos particulares y únicos, con base en el valor de uso que tengan (Hodges, 1990).

Las razas son el resultado de la diversificación genética dentro de las distintas especies durante el proceso evolutivo y representan la de la especie. La importancia de mantener la mayor diversidad posible en las especies de animales domésticos, radica en poder contar con una adecuada fuente de

variación para ser aprovechada en planes de mejora y obtención de productos en mayor cantidad y calidad. Muchas razas son portadoras de variantes y combinaciones únicas de genes (Martínez, 2008-Tesis Doctoral). En muchos casos se desconoce esta variabilidad, siendo los puntos mencionados anteriormente, argumentos a favor del estudio y conservación de estas razas locales. La pérdida de esta diversidad es permanente y puede implicar graves consecuencias, debido principalmente a esta variedad oculta.

Existen diversos factores que han provocado una importante disminución de la biodiversidad, siendo uno de los principales la especialización de la producción animal moderna, que se basa mayoritariamente en la explotación de pocas razas altamente seleccionadas para producir productos en grandes cantidades y en condiciones ambientales controladas. Esto ha conducido a una disminución en la variabilidad de estas razas seleccionadas, a la sustitución de las razas locales, y a un aumento en la cantidad de estas razas que se encuentran en peligro de extinción. Los sistemas productivos intensivos han puesto en riesgo a muchas razas locales, mientras que las razas comerciales no poseen una variabilidad genética adecuada para el futuro (FAO, 1998). De este modo se explotan masivamente unas pocas poblaciones, mientras que las poblaciones minoritarias se mantienen con grandes dificultades, lo cual conduce a la disminución en el número de individuos, llegando incluso a desaparecer (Delgado et al., 2010).

La deriva genética provoca un gran efecto en la gran mayoría de los procesos de extinción de razas. La reducción drástica o progresiva en los censos son producto de efectos ecológicos, como la pérdida de regiones de pastoreo, efectos socio-económicos, como la emigración del campo a la ciudad, o efectos políticos, tales como la implementación de planes de desarrollo rural que implican la sustitución de razas locales por razas extranjeras. Esto provoca una disminución en el número efectivo de las poblaciones, alterando la diversidad genética y aumentando los niveles de endogamia.

La migración y selección también producen pérdidas de la variabilidad genética. En el primer caso, por medio de los cruzamientos con razas comerciales, que lleva muchas veces a una erosión en las poblaciones locales. En el caso de la selección con el objetivo de mejorar la productividad, que se aplica

identificando los animales mejor dotados y empleándolos como reproductores, también reduce el tamaño efectivo. Se pueden tener censos no alarmentes y sin embargo encontrarse ante la pérdida de variabilidad genética debido al bajo número de individuos reproductores. Este tipo de selección sólo puede aplicarse en poblaciones lo suficientemente grandes. La mutación sería la única fuerza evolutiva capaz de generar variabilidad, pero debido a las bajas tasas en la que ocurre, y a que veces se generan mutaciones desfavorables, no es un factor a considerar a corto plazo (Delgado et al., 2010).

De acuerdo a Oldenbroek, J. (1999), existen varios objetivos para la conservación de los recursos zoogenéticos. Este autor considera que las razas locales son una oportunidad para futuras demandas del mercado y una forma de asegurarse frente a cambios productivos futuros, para lo cual es importante contar con variación genética. Considera por otro lado el valor socio-económico, teniendo en cuenta que los ingresos que generan estas razas para los productores locales justifica el establecimiento de programas de conservación; también el valor ecológico, las razones culturales e históricas (estas razas son el resultado de largos procesos de domesticación y prolongados períodos de adaptación a ambientes locales), así como las oportunidades de investigación. Otro importante punto de vista que justifica la conservación es el genético, ya que el mantenimiento de la variabilidad genética ofrece una capacidad de reacción ante cualquier eventualidad (Delgado et al., 2010).

La necesidad de caracterizar y conservar los recursos genéticos animales se ha convertido en una prioridad a nivel mundial (FAO, 1996).

La caracterización de poblaciones incluye la caracterización a nivel fenotípico, analizando los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos, y la caracterización a nivel genético (estudios de variabilidad utilizando marcadores moleculares de ADN).

Se entiende a la conservación como el uso sostenible de los recursos naturales y la preocupación actual deriva de una mayor conciencia de la importancia que esto implica para el desarrollo de una agricultura sustentable (Armstrong, 2004-Tesis de Maestría). Por otro lado se debe entender a la conservación como disciplina, constituyendo todas las acciones desarrolladas en favor del

mantenimiento de la variabilidad genética. Los programas de conservación se basan en la aplicación de técnicas y métodos para contrarrestar las causas que provocan la pérdida de diversidad, a la vez de mantener y maximizar dicha diversidad. En este contexto, la FAO define los métodos de conservación *in situ* y *ex situ*.

La conservación *in situ* implica toda las acciones que se realicen para la conservación de las poblaciones en el propio ambiente de desarrollo. La conservación *ex situ* implica el mantenimiento de los recursos genéticos fuera de su ambiente original (Delgado et al., 2010).

### **1.6 Marcadores moleculares aplicados en estudios de conservación**

Una de las estrategias para la conservación de los recursos zoogenéticos, es la caracterización genética de los mismos. El uso de marcadores moleculares de ADN constituye una herramienta importante para cumplir con este objetivo. Estos marcadores aportan datos para la conservación de razas, relaciones filogenéticas y distancia genética entre éstas, así como la detección de alelos específicos de recursos genéticos locales (Nagamine & Higuchi, 2001).

Estos marcadores sirven también para el estudio de características de interés productivo, las cuales son un factor importante al momento de la caracterización de un recurso. Sin embargo, este tipo de herramienta se emplea principalmente para el estudio de éstos caracteres pero apuntando hacia el valor comercial de los mismos. Una de las utilidades más importantes de los marcadores en la actualidad es la selección asistida por marcadores (MAS), la cual permite evaluar características de aparición tardía en los individuos, disminuyendo los tiempos de evaluación, lo cual implica una reducción de costos.

En los animales domésticos, las diferencias fenotípicas entre razas se deben a la existencia de pocas variantes alélicas, las cuales pueden detectarse empleando diferentes técnicas moleculares. Una de las técnicas más empleadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Mediante PCR se amplifica una región genómica de interés, que generalmente presenta un cambio de nucleótido (Polimorfismo de nucleótido simple: SNPs) u otras variaciones en la secuencia de ADN (inserciones y/o deleciones que implican

más de un nucleótido). Para la posterior identificación de estas variantes, en unos casos pueden utilizarse marcadores RFLP (Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción), en los cuales el polimorfismo detectado consiste en diferencias en el largo de fragmentos de ADN después de la digestión con enzimas de restricción. Estas enzimas tienen sitios de reconocimiento específicos en el ADN y producen cortes endonucleotídicos, obteniéndose fragmentos de longitudes definidas, los cuales pueden ser revelados por electroforesis en gel de agarosa, separándose de acuerdo a su tamaño molecular. Diferencias en el largo de fragmentos particulares pueden deberse a diferencias en una o más bases, resultando en la pérdida de un sitio de restricción o en la formación de uno nuevo, o debido a la inserción o delección de bloques de ADN. Estas diferencias pueden ser reconocidas por un cambio en la movilidad de los fragmentos de restricción durante la electroforesis. Los RFLPs se heredan como características mendelianas simples codominantes y pueden detectarse tanto por hibridación del ADN como por PCR (Botstein et al., 1980).

### **1.7 Polimorfismo de nucleótido simple en genes mayores de importancia económica en cerdos**

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), no siempre pueden detectarse mediante enzimas de restricción y en esos casos deben emplearse técnicas de secuenciación (Padilla et al., 2010). La utilización del estudio de genes mayores debe considerarse como una importante alternativa para medir la diversidad genética en función de las frecuencias alélicas identificadas en una muestra poblacional (Ciobanu et al., 2001; Rothschild et al., 2003).

Los marcadores moleculares de ADN constituyen un método seguro para la determinación genotípica de portadores de patologías hereditarias causadas por mutaciones puntuales.

El análisis de SNPs, si bien no es lo más empleado para la caracterización genética de las poblaciones, igualmente aporta datos para definir los recursos genéticos y permite estudiar características de importancia económica, pudiéndose identificar variantes de interés productivo y definir frecuencias alélicas y genotípicas para los recursos y razas estudiadas. En los últimos años

con el auge de la secuenciación masiva y los chips de genotipado, algunas técnicas y marcadores han entrado en desuso, sin embargo, continúan siendo útiles para estudios a menor escala.

En la presente tesis se plantea el estudio de polimorfismos en tres genes mayores:

- gen que codifica el Receptor de rianodina (CRC1)
- gen que codifica para la  $\alpha$  (1,2)- fucosiltransferasa (FUT1)
- gen que codifica el Receptor de estrógenos (ESR)

La elección de estos tres genes se debe a que están relacionados con características de interés productivo y reproductivo. En el caso del gen CRC1, asociado a calidad de carne y cuya mutación provoca el Síndrome de Estrés Porcino (SEP), ya se ha trabajado anteriormente (Montenegro et al., 2010), por lo cual los resultados presentados en esta tesis constituyen una continuación a su estudio. El gen FUT1 se asocia a resistencia a infecciones por *E. coli* y al tamaño de camada, mientras que el gen ESR también se ha relacionado a tamaño de camada y peso vivo al nacimiento (Hernández et al., 2006; Lemus-Flores et al., 2009). En estos dos últimos genes no se han realizado estudios en cerdos en nuestro País.

### **1.7.1 Receptor de rianodina (CRC1)**

Este gen codifica el receptor de rianodina, un canal de calcio en el retículo endoplasmático del músculo esquelético. El gen CRC1 se encuentra localizado en el par autosómico 6 y se ha identificado una mutación T→C en la posición 1843 provocando una sustitución aminoacídica arginina cisteína (Fuji et al., 1991). Esta mutación causa la enfermedad autosómica recesiva denominada Síndrome de Estrés Porcino (SEP). El gen presenta dos variantes alélicas asociadas a esta enfermedad, el alelo normal es dominante sobre el alelo mutado identificándose al genotipo homocigota dominante con la nomenclatura NN (individuos normales), genotipo heterocigota, Nn (portadores de la mutación) y genotipo homocigota recesivo, nn (individuos susceptibles al SEP) (Bonelli & Schifferli, 2001).

La mutación provoca una apertura del canal de calcio impidiendo su cierre (Riojas-Valdés et al., 2005). Se produce así un aumento en la concentración de calcio citoplasmático en el miocito, incrementándose el metabolismo aeróbico, la glucogenólisis y la glucólisis, agotando el ATP, la glucosa y el oxígeno. Esto genera un exceso de dióxido de carbono, ácido láctico, potasio y calor en la sangre, además de un desorden en el equilibrio de iones intra y extracelular y un aumento en la cantidad de agua en la célula. La asociación entre la respuesta al estrés fisiológico, con hipercalcemia, produce como consecuencia final el paro cardíaco del animal. El estado de contracción permanente de la célula muscular provoca hipertrofia muscular, lo cual produce el aumento del desarrollo muscular de la canal (Reiner, 1993). La canal de los animales homocigotos recesivos manifiesta una disminución rápida e importante del pH *post mortem* como consecuencia del incremento del metabolismo causado por el estrés (transporte, faena, cópula, calor excesivo, etc.) (Pommier et al., 1998). De esta manera, el SEP genera importantes pérdidas económicas en la industria porcina debido a la muerte súbita de los animales susceptibles al estrés y a una disminución en la calidad de la carne (carnes pálidas, exudativas y blandas) (Leach et al., 1996). Por otro lado se ha visto la ventaja del efecto del gen sobre la producción encontrándose que los animales Nn presentan una mejor conversión y ganancia diaria de peso frente a los NN (Puentes Martínez & Pérez Ede, 2007).

### **1.7.2 $\alpha$ (1,2)- fucosiltransferasa (FUT1)**

Las infecciones causadas por *E. coli* producen pérdidas económicas en la industria porcina. Las cepas que producen diarreas en cerdos son las que poseen el antígeno K88, las cuales se adhieren a la mucosa intestinal y colonizan el intestino delgado provocando diarrea. La patogenicidad de esta bacteria depende de la existencia de un receptor específico en las membranas de la mucosa del intestino delgado en lechones, al cual se une el antígeno (Bao et al., 2011). La adhesión de microorganismos patogénicos a los tejidos blanco muchas veces están mediados por los carbohidratos de los antígenos de los grupos sanguíneos. Los genes glucosiltransferasas son responsables de la formación de carbohidratos específicos de los grupos sanguíneos, siendo

genes candidatos en el control de la colonización bacteriana (Huang et al., 2008). El gen que codifica para la  $\alpha$  (1,2)- fucosiltransferasa (FUT1) en cerdos se encuentra en el cromosoma 6 y se asocia a la resistencia a infecciones causadas por *E. coli* en lechones de 4 a 12 semanas de edad. Se ha detectado una mutación G  $\rightarrow$  A en la posición 307 dentro del marco abierto de lectura de este gen. Cuando el alelo A está presente no hay receptores para el K88, por lo cual los animales homocigotos AA se asocian con resistencia a diarreas causadas por *E. coli* y a los heterocigotos AG y homocigotos GG con susceptibilidad en algunas razas como la Landrace, Pietrain y Large White. Otros estudios han demostrado que el polimorfismo de este gen también se relaciona con el tamaño de la camada, donde las cerdas con genotipo AA tienen menor número de lechones nacidos totales, nacidos vivos y destetados que las cerdas con genotipo GG (Hernández et al., 2006).

### **1.7.3 Receptor de Estrógeno (ESR)**

Los estrógenos son hormonas esteroideas que tienen un rol integral en la reproducción de animales superiores. Actúan junto a la progesterona, haciendo posible la fertilidad de las hembras al liberar el óvulo y regular el ciclo sexual. Determinan el fenotipo de las hembras e inducen el comportamiento típico del celo. Con la presencia de los estrógenos el oviducto aumenta en longitud y diámetro. Igualmente, estas hormonas actúan en el útero en la fase de la pubertad, y revisten particular importancia en la preparación del endometrio para el anidamiento del óvulo fecundado. Todas las funciones de los estrógenos están mediadas por sus receptores.

El gen ESR se localiza en el cromosoma 1 y es de herencia autosómica codominante (Rothschild et al., 1991). Se ha identificado una mutación T  $\rightarrow$  G en la posición 1665 del gen ESR en las razas Meishan y Large White (Hernández et al., 2007). Dicho gen se ha relacionado con el tamaño de camada y mayor peso en lechones nacidos vivos en cerdos (Lemus-Flores et al., 2009). La prolificidad es una de las características reproductivas de mayor importancia económica, pero posee baja heredabilidad.

## 1.8 Marcadores Microsatélites

Los microsatélites son los marcadores moleculares más utilizados hasta la actualidad en el estudio de la variabilidad genética en especies domésticas. Los microsatélites o STRs (short tandem repeat) son secuencias de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem e intercaladas al azar en el genoma (Jarne & Lagoda, 1996; Bruford & Wayne, 1993). Estas secuencias se heredan de forma mendeliana y el polimorfismo se basa en la variabilidad del número de repetidos. Presentan polimorfismo en función a mutaciones neutrales, no estando clara la relación entre la variabilidad aportada y el valor adaptativo de los animales (Ruane, 1999). Su alta tasa de mutación y herencia codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre razas, así como la mezcla genética entre razas incluso si están estrechamente emparentadas. Están distribuidos a través de todo el genoma en eucariotas. Debido a que presentan un tamaño relativamente pequeño, pueden amplificarse fácilmente por PCR usando ADN extraído de fuentes diversas, como la sangre, el pelo, la piel, e incluso las heces. Los polimorfismos se pueden visualizar en un gel secuenciador, y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis muy rápido de un gran número de muestras (FAO, 2010). Se ha observado que las secuencias más comunes en los microsatélites son las repeticiones dinucleotídicas. Las repeticiones (CA)<sub>n</sub> son las más abundantes en el genoma de mamíferos, observándose muy poca presencia de repeticiones (GC)<sub>n</sub> en el genoma eucariota. La explicación a este fenómeno es que estas secuencias son suprimidas por mutación ya que son regiones de alta frecuencia de sustitución, debido a que la citosina es muy sensible a la metilación. La metil-citosina evoluciona de forma espontánea a timina, de forma que el par GC es sustituido por GT. La baja frecuencia de esta secuencia también puede explicarse por una conformación inestable no pareada que toma el ADN y que podría afectar a secuencias vecinas y formar una secuencia repetida deletérea (Stallings, 1992). Los microsatélites están muy conservados entre especies próximas e incluso los cebadores utilizados para amplificar una determinada secuencia en una especie, sirven para la amplificación de una secuencia análoga en especies cercanas (Moore et al., 1991).

Los microsatélites son recomendados por la FAO/ISAG (Sociedad Internacional de Genética Animal), para la caracterización genética en razas locales. Se han establecido una serie de recomendaciones que deben presentar estos marcadores para estudiar la distancia genética y la caracterización de especies de interés zootécnico (FAO, 1993):

- deben ser de dominio público.
- no deben estar ligados entre sí, debiendo encontrarse a más de 50 cM en caso de encontrarse en el mismo cromosoma.
- deben presentar herencia mendeliana demostrada.
- deben ser informativos y mostrar suficiente polimorfismo. En los paneles de microsatélites seleccionados por la FAO, la regla adoptada es que los loci deben tener al menos 4 alelos diferentes.
- deben poder ser empleados en especies relacionadas.

Las principales aplicaciones de los microsatélites son la elaboración de mapas genéticos, el estudio de estructuras genéticas poblacionales, la identificación individual, análisis de paternidad y parentesco, y estudios de trazabilidad.

En nuestro País, los primeros estudios empleando marcadores moleculares microsatélites en cerdos, los realizó Kelly et al., (2004), quienes analizaron un panel de 9 microsatélites y haplotipos del gen citocromo B mitocondrial en 10 cerdos Pampa Rocha. Este estudio reveló una alta variabilidad genética ( $H_e=0.653$ ), y propone que el origen más probable de esta raza serían las razas europeas, con introgresión de razas asiáticas.

Utilizando un panel de 31 microsatélites en muestras de ADN de 11 cerdos Mamellados se obtuvo un índice de heterocigosidad global alto ( $H_e=0.590$ ) indicando un alto polimorfismo en la muestra analizada (Castro et al., 2007b).

## 1.9 Análisis de datos obtenidos mediante marcadores microsatélites:

Una vez realizado el genotipado de un panel de microsatélites, se puede analizar la muestra de interés examinando la variabilidad de dichos marcadores dentro de la población, así como compararla con otras poblaciones determinando distancia y similitud genéticas.

Los parámetros basales en la evaluación de la diversidad genética dentro y entre razas son el número medio de alelos por población, la heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ).

La evaluación de la diversidad entre grupos de razas puede realizarse mediante un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). Mediante un AMOVA, se estima la partición de la diversidad en diferentes niveles: dentro de razas, entre razas dentro de grupos, entre grupos, etc. (FAO, 2011). Este tipo de análisis puede realizarse en el software Arlequín (Excoffier & Lischer, 2010), obteniéndose también índices de diferenciación genética o de fijación, como el estimador  $F_{ST}$ .

El cálculo de distancias genéticas permite evaluar relaciones genéticas entre poblaciones e individuos a partir de los datos de microsatélites. La distancia genética más habitual es la estándar de Nei ( $D_S$ ) (Nei, 1972). Sin embargo, para poblaciones estrechamente emparentadas, en las que la deriva genética es el principal factor de diferenciación genética, como suele ocurrir en las razas agropecuarias, se recomienda la distancia Cavalli-Sforza modificada ( $D_A$ ) (Nei et al., 1983).

La relación genética entre razas se suele visualizar mediante la reconstrucción de una filogenia, utilizando habitualmente el método de adyacencia (Neighbor-Joining) (Saitou & Nei, 1987).

El análisis multivariante y los conglomerados bayesianos, como los utilizados por el programa Structure, se han utilizado para el estudio de mezclas de datos de microsatélites de diferentes poblaciones (Pritchard et al., 2000).

Los datos genéticos moleculares, complementados por otro datos, como la evidencia arqueológica y los registros escritos, proporcionan información útil sobre los orígenes, movimientos, y cambios de la diversidad genética en las especies agropecuarias. La identificación del origen de la diversidad genética

actual podría permitir hacer inferencias sobre dónde puede hallarse variación genética funcional dentro de una especie de la que solo existen datos limitados sobre la variación fenotípica (FAO, 2010).

El análisis combinado de los datos de microsatélites obtenidos en diferentes estudios es muy deseable, pero rara vez ha resultado posible. Ello se debe a que la mayoría de estudios de genética poblacional que usan marcadores de ADN se limitan a un pequeño número de razas, a menudo de un único país. Sólo existen unos cuantos ejemplos de análisis a gran escala de la diversidad genética de las especies agropecuarias. En el caso de la especie porcina Sancristobal et al. (2006) investigaron la diversidad en cerdos en Europa. No obstante, para la mayoría de especies, falta aún una revisión completa (FAO, 2010). A nivel iberoamericano se ha realizado un estudio comparativo de caracterización genética en bovinos criollos mediante marcadores microsatélites, dentro del marco del Proyecto de Biodiversidad Bovina Iberoamericana (Delgado et al., 2012).

### **1.9.1 Frecuencias alélicas**

Se define a la frecuencia alélica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos.

La suma de las distintas frecuencias alélicas  $p$  y  $q$  tomarán valores comprendidos entre 0 y 1, siendo la suma de ambas frecuencias igual a 1. Si la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, las frecuencias genotípicas pueden expresarse como función de las frecuencias alélicas.

Para una frecuencia dada, el error estándar disminuye a medida que aumenta el tamaño de la muestra, pero se acerca a cero asintóticamente a partir de los 30 individuos. Se puede considerar, por tanto, que un tamaño óptimo de muestra sería de 30 a 60 individuos (Martínez, 2001-Tesis Doctoral).

### **1.9.2 Heterocigosidad**

Una medida de la variación genética es la cantidad de polimorfismos presentes en una población. Un locus se considera polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia del 0,95, y por lo tanto el menos frecuente una

frecuencia del 0,05. Una mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus (Lacadena, 1981).

### 1.9.3 Heterocigosidad Observada

La heterocigosidad observada se define como la proporción de individuos heterocigotos observada en una muestra poblacional. Si se calcula directamente a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los loci se trata de la heterocigosidad media observada.

La exactitud del cálculo de la heterocigosidad media depende igualmente del tamaño de la muestra y del número de loci estudiados.

### 1.9.4 Heterocigosidad Esperada

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) o diversidad genética de un locus se calcula mediante la fórmula (Nei, 1973):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Siendo  $x_i$  frecuencia del alelo  $i$  y  $k$ : número de alelos

La heterocigosidad esperada es equivalente a la heterocigosidad observada cuando las poblaciones se hallan en equilibrio.

La heterocigosidad esperada corregida o no sesgada se calcula para cada combinación locus/población mediante la siguiente ecuación (Nei & Roychoudhury, 1974):

$$H_e = \frac{2n \left( 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 \right)}{(2n - 1)}$$

### 1.9.5 Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica (PIC) es un indicador de la calidad de un marcador en estudios de cartografía génica (Botstein et al., 1980). Su cálculo permite obtener una valoración de la calidad de un marcador para estudios genéticos (de segregación, de identificación y control de paternidad, de población) ya que refleja el polimorfismo detectado. Este parámetro depende del número de alelos y de sus frecuencias, y por lo tanto la información que aporta no es suficiente para basar en el mismo la elección de un marcador u otro (Moazami-Goudarzi et al. 1994).

Se calcula mediante la fórmula:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

### 1.9.6 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Esta ley fue enunciada por Hardy y Weinberg independientemente en 1908 y formula que en una población grande bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación.

Una población se considera que está en equilibrio Hardy-Weinberg para un locus si la proporción de genotipos observados en la población puede ser completamente definida por las frecuencias alélicas del locus en cuestión. En otras palabras, los alelos del locus están distribuidos al azar en la población y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres.

Para mantener el equilibrio Hardy-Weinberg se deben cumplir una serie de supuestos: los apareamientos deben ser aleatorios, no deben estar actuando la selección, mutación y migración, la población debe ser infinitamente grande (se descarta el efecto de la deriva) y no pueden existir diferencias en las frecuencias alélicas entre sexos. Otros factores que también pueden provocar desviaciones del equilibrio son la existencia de subdivisiones dentro de la población (Principio de Wahlund), existencia de coancestros y antepasados comunes, una técnica de muestreo incorrecta y presencia de alelos nulos no

detectables experimentalmente.

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en los loci estudiados. Si la proporción de genotipos para un locus no está en equilibrio en algunas poblaciones, puede sospecharse que ha habido una selección que afecte a dicho locus o la existencia de alelos nulos. Al contrario, si una población se desvía significativamente del equilibrio para un número independiente de loci puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, a que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos no aleatorios (Callen et al., 1993).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas bajo la presunción de equilibrio Hardy-Weinberg puede usarse como método para detectar distorsiones en la estructura de una población. No obstante, un método mucho más exacto es comparar la distribución de genotipos observados con la distribución esperada si la población estuviera en equilibrio Hardy Weinberg. Estas circunstancias pueden ser estudiadas usando test exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud. Estos análisis se requieren debido al gran número de alelos de los loci microsatélite y por tanto el elevado número de posibles genotipos. Las pruebas para calcular la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg son la Probabilidad de verosimilitud y el Test exacto o de probabilidad de Fisher. El test de  $X^2$  generalmente no es aplicable debido a la gran cantidad de genotipos que se generan a partir de marcadores microsatélites (Wellek, 2004).

### **1.9.7 Estadísticos F**

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F fue concebida inicialmente por Sewall Wright en los años 40 y 50. Dos de los parámetros mediante el cual Wright propone medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas son el  $F_{IS}$  y el  $F_{ST}$ .

El  $F_{IS}$  es la correlación entre dos alelos, relativa a la subpoblación. Es un índice de fijación de los individuos respecto a la subpoblaciones o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones respecto a las esperadas considerando el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El parámetro  $F_{ST}$  es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación, e indica el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones.

Para un conjunto de  $t$  poblaciones con frecuencias alélicas para cada alelo  $x_i$  ( $i= 1,2,3,\dots,k$ ), el estadístico  $F_{ST}$  puede definirse como:

$$F_{ST} = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (t-1)}{\bar{x}(1-\bar{x})} = \frac{\sigma^2}{\bar{x}(1-\bar{x})}$$

siendo  $\bar{x} = \sum_i x_i / t$  la frecuencia media en la muestra de todos los alelos y todas las muestras, y  $\sigma^2$  es la varianza de la muestra. En el caso de que las muestras tengan tamaños diferentes no se consideran las medias y varianza.

A través de los estadísticos  $F$  se puede conocer la estructura poblacional tanto en situaciones en las que existan selección como en las que no, ya que los términos están definidos por las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en un momento concreto (Nei, 1977).

La medida  $F_{ST}$  estándar no puede considerarse como una medida de distancia genética ya que  $F_{ST}$  se define para varias poblaciones y la distancia genética se definiría para un par de poblaciones. Nei propone una versión modificada de  $F_{ST}$  que puede ser usada como medida de distancia genética cuando se consideran sólo dos poblaciones (Nei, 1987).

### 1.9.8 Asignación individual a clusters

Existen dos tipos de métodos para asignar individuos a poblaciones: métodos basados en distancia genética y los métodos basados en modelos probabilísticos. Estos últimos asumen que las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y que no existe desequilibrio de ligamiento. Dentro de los métodos probabilísticos tenemos los métodos de frecuencias y los métodos Bayesianos. Los primeros asignan los individuos a la población en la que el genotipo del individuo es más probable que ocurra. Primero se computan las frecuencias alélicas de las poblaciones potenciales,

posteriormente se computa la verosimilitud de que el genotipo multilocus ocurra en cada población, y finalmente se asigna el individuo a la población en la cual el genotipo obtuvo la mayor probabilidad.

Los métodos Bayesianos se basan en determinar si unas partes del genoma (clusters) son heredados en una tasa más alta que la normal desde una población parental y para ello se requiere que las poblaciones se hayan muestreado adecuadamente (Falush et al., 2003). Este método asigna individuos a poblaciones con base a sus genotipos estimando las frecuencias alélicas de cada locus. Pritchard et al., (2000) introdujeron un método para identificar poblaciones diferentes; posteriormente se estudia la ascendencia de los individuos muestreados. Se consideran dos modelos para la ascendencia de los individuos, el primero un modelo no-combinado, en el que se asume que los individuos son tomados de forma pura de una de las  $k$  poblaciones y el modelo combinado, en el que se permite mezcla de los ancestros; es decir, una fracción  $q_k$  del genoma de un individuo viene de la subpoblación  $K$  ( $\sum_k q_k = 1$ ). Estos modelos están disponibles en [pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html](http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html) (software Structure).

### **1.9.9 Distancias genéticas**

Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones, y permiten obtener información para la caracterización de razas (Naganime & Higuchi, 2001).

En la teoría clásica de genética de poblaciones una población puede ser definida mediante las frecuencias alélicas de las variantes que segregan en dicha población. A partir de las frecuencias alélicas se calculan distancias genéticas, las cuales tienen propiedades matemáticas y significado biológico. La interpretación biológica de las distancias genéticas depende del modelo de divergencia utilizado.

Se considera que son cuatro las fuerzas que pueden modificar la genética de las poblaciones: deriva genética, mutación, selección y migración. Los modelos para estudiar divergencia entre dos poblaciones que descienden de una población ancestral común se diseñaron originalmente para especies, y

asumen una evolución independiente de cada población. Cuando se utilizan microsatélites, que son neutros, se asume que la selección no afecta a los cambios en las frecuencias alélicas de estos marcadores. Por lo tanto, la diversidad genética observada viene determinada por dos parámetros: deriva genética y, para períodos de tiempo largos, mutación. El modelo clásico de deriva genética y mutación se diseñó en principio para el estudio de relaciones entre especies, por lo que el período de tiempo que se estudia es largo por definición (miles de generaciones). Cuando se estudian razas, se estudian períodos de tiempo más cortos (cientos de años), por lo que el efecto de la mutación se puede ignorar. (Martínez, 2001-Tesis Doctoral).

En la presente tesis se utilizó la distancia genética  $D_A$  de Nei:

- Distancia de Nei ( $D_A$ ):  $D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$

$x_i$  e  $y_i$  son las frecuencias del alelo  $i$  en las poblaciones  $X$  e  $Y$  respectivamente. Se deben sumar todas las distancias para cada *locus* y dividir por el número de *loci* cuyos alelos aparecen en las expresiones.

### 1.9.9a $F_{ST}$ como distancia genética

El estadístico  $F_{ST}$  (Wright, 1969), se define como la consanguinidad dentro de una subpoblación respecto a la población total y es una medida de diversidad genética muy utilizada en producción animal. Aquí las razas son consideradas subpoblaciones de una gran población que comprende todas las razas estudiadas.  $F_{ST}$  se puede expresar en términos de heterocigosidad, (Nagylaki, 1998):

$$F_{ST} = 1 - H = 1 - \sum_{i \neq j} x_i x_j$$

Donde  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $x$  de un locus  $l$  en la población estudiada. Si subpoblaciones finitas están aisladas unas de otras, cada una de ellas puede sufrir consanguinidad, con fijación de alelos. Los alelos fijados pueden ser diferentes en cada población. Si la consanguinidad continúa, aumenta la

diversidad entre razas.

Excepto para poblaciones completamente consanguíneas,  $F_{ST}$  siempre es menor de 1, incluso para poblaciones completamente diferenciadas.

Las distancias genéticas clásicas no tienen en cuenta la migración, pero  $F_{ST}$  se puede usar para el cálculo de tasa de migración entre poblaciones. Si se asume que existe equilibrio entre deriva genética y migración, el coeficiente de consanguinidad en el estado de equilibrio toma una forma similar al coeficiente de consanguinidad en el caso de equilibrio entre deriva y mutación. Un aumento en la tasa de migración produce un descenso en el coeficiente de consanguinidad. La migración y la mutación mantienen la diversidad genética dentro de las poblaciones naturales. Entre poblaciones, la migración permite un intercambio de genes (flujo de genes), que tiende a homogeneizar la constitución genética de un grupo de poblaciones. La migración produce un descenso en la diversidad genética entre poblaciones.

Debido a que el cálculo de la distancia genética es un método estadístico, debe tenerse en cuenta que los individuos muestreados deben elegirse al azar para reflejar la composición actual de la población. Generalmente, es un requerimiento mínimo que  $N=25$  (FAO, 1998), que producen  $2N=50$  alelos por cada locus estudiado. En el caso de poblaciones muy pequeñas podría ser necesario estudiar toda la población, conociéndose así las frecuencias alélicas reales.

### **1.9.9b Árboles de distancia genética**

Las matrices de distancia genética contienen toda la información que proporcionan los marcadores genéticos estudiados acerca de las relaciones entre las razas analizadas, pero para facilitar la interpretación de los mismos los datos de distancia se utilizan en análisis de agrupamiento y se realizan representaciones gráficas.

Los árboles de distancia son representaciones gráficas de la matriz de distancias entre poblaciones y pueden ser considerados en algunos casos como una representación de la filogenia.

Los métodos para la construcción de árboles filogenéticos son el fenético y el cladístico. Mediante el método "fenético" se construyen árboles filogenéticos

considerando el conjunto de similitudes fenotípicas entre especies sin tratar de entender la historia evolutiva de las mismas. En estos árboles los organismos se clasifican basándose en el número absoluto de caracteres que comparten. Los programas informáticos frecuentemente utilizados por el método fenético emplean una matriz de distancias y algoritmos de agrupamiento simples como el UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath & Sokal, 1973) y el Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Estos árboles se construyen agrupando primero pares de poblaciones con las mínimas diferencias alélicas, sumando las siguientes más distantes y repitiendo este proceso hasta que todas las poblaciones están incluidas.

El método cladístico se basa en el estudio de clados, que son grupos de individuos relacionados. Se reconstruyen árboles evolutivos teniendo en cuenta los caminos evolutivos diferentes posibles (puntos de ramificación donde los grupos divergen a partir de un ancestro común) y eligiendo después el mejor árbol posible de ellos. Se consideran tanto las relaciones ancestrales conocidas como los datos actuales. Los algoritmos informáticos basados en este método generalmente se basan en los métodos de parsimonia (el mínimo número de cambios evolutivos), de máxima verosimilitud (método probabilístico, los ancestros más probables) o el análisis bayesiano para construir los árboles filogenéticos.

Para datos como los caracteres morfológicos clásicos o para niveles taxonómicos más profundos (a nivel molecular), el método cladístico es superior, pero a veces es necesario asumir premisas que no siempre satisfacen los datos obtenidos a nivel molecular. El método fenético utiliza algoritmos (UPGMA y NJ) más rápidos y a menudo tienen propiedades estadísticas más adecuadas para los datos moleculares. Los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud son más lentos que los anteriores y sus requerimientos informáticos son mayores (Martínez, 2001-Tesis Doctoral).

Un inconveniente importante de la reconstrucción de árboles filogenéticos es que presupone que durante la evolución, los linajes pueden divergir, pero nunca ser resultado de cruces entre linajes. Este supuesto generalmente no se aplica en especies ganaderas, ya que a menudo las nuevas razas se originan por cruce entre dos o más razas ancestrales (FAO, 2010).

### **1.9.9c Métodos para construcción de árboles de distancia genética**

Dentro de los métodos de construcción de árboles de distancia genética se pueden citar el UPGMA y Neighbor-Joining.

El UPGMA es una estrategia secuencial, aglomerativa, jerárquica y no solapada (Sneath & Sokal, 1973). Define la distancia entre poblaciones o grupos de poblaciones como la media de todas las distancias de los miembros (tomados de dos en dos). En los dendrogramas construidos con este método las ramas surgen del punto medio entre dos grupos. La distancia entre dos agrupamientos es la suma de la longitud de las ramas. El método UPGMA es muy usado con matrices de distancia.

El método Neighbor-Joining (Saitou et al., 1987) identifica los pares más próximos, o vecinos, de poblaciones o grupos de poblaciones (unidades taxonómicas), de forma que se minimice la longitud total de un árbol. Un par de vecinos son dos unidades conectadas por un nodo simple en un árbol sin raíz y con dos ramas que se unen en un nodo interior. En general, es posible definir la topología de un árbol por la unión sucesiva de pares de vecinos para formar nuevos pares de vecinos. Se consideran vecinos el par de grupos que, cuando se juntan, producen el árbol con longitud más corta, y éstos se unen para formar una unidad combinada. El procedimiento para identificar los vecinos entre un número reducido de unidades es repetido hasta que sólo quedan tres unidades, obteniéndose así un árbol sin raíz.

Saitou et al. (1987) establecen que con este método se consigue el árbol correcto para datos puramente aditivos, en donde la distancia entre cada par de unidades es la suma de las longitudes de las ramas que las unen en el árbol.

### **1.9.9d Métodos de remuestreo**

Son técnicas estadísticas de remuestreo de datos de los loci que permiten dibujar muchos árboles, obtener valores fiables de los nodos del árbol y dotar al mismo de un alto grado de confianza (Weir, 1990). Uno de los métodos es el Bootstrap.

El método Bootstrap (Felsenstein, 1985) implica la creación de un nuevo lote de datos realizando un muestreo aleatorio de N caracteres o loci y

reemplazando los datos originales. Así se obtiene un lote de datos del mismo tamaño que el original, pero en el que algunos caracteres quedan excluidos y otros están duplicados. La variación al azar de los resultados obtenidos de analizar estos lotes de datos "remuestreados" estadísticamente es la típica que se obtendría si se obtuvieran nuevos lotes de datos. Este método asume que los caracteres evolucionan independientemente.

#### **1.9.10 Análisis Factorial de Correspondencia**

El análisis multivariado permite analizar conjuntamente dos o más variables que pueden estar interrelacionadas. Este tipo de análisis utiliza y aprovecha las relaciones entre las variables para buscar patrones o estructuras en los datos. Se puede encontrar así un origen de patrones cuando se realizan mediciones sobre grupos de objetos similares (Martínez, 2008-Tesis Doctoral).

El Análisis Factorial de Correspondencia intenta explicar una variable hipotética (factor), por medio de un modelo lineal en el que el factor (o varios factores) es función de un conjunto grande de variables observables. Esta técnica descriptiva permite representar tablas de contingencia que recogen la frecuencia de aparición de dos o más variables cualitativas en un conjunto de elementos. Generalmente una tabla de contingencia consiste en un conjunto de números positivos dispuestos en una matriz, donde el número de cada casilla representa la frecuencia absoluta observada para la combinación de las dos variables.

El objetivo del Análisis Factorial de Correspondencia es encontrar una estructura más simple reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información. Para simplificar el análisis de los datos se reduce el número de variables a un pequeño número de índices o factores. Este análisis resulta apropiado cuando el objetivo es encontrar un grupo de variables similares, altamente correlacionadas, y postular que esas similitudes provienen del hecho de que éstas son variables "latentes o factores" que actúan en forma particular sobre el proceso estudiado.

El Análisis Factorial de Correspondencia puede realizarse con el software Genetix v.4.05 (Belkhir et al., 2003). Los objetos analizados se ven como una

nube de puntos en un hiperespacio que tiene tantas dimensiones como alelos. El algoritmo busca las direcciones independientes en este hiperespacio, la longitud de las cuales es la inercia. Estas direcciones, que son definidas por los vectores propios de la matriz, determinan una serie de ejes factoriales. Por convenio, el primer eje es el que tiene la contribución mayor a la inercia total. El Análisis de Correspondencia puede condensar la información de un gran número de alelos y *loci* en pocas variables sintéticas. Con este método las frecuencias alélicas de las poblaciones en todos los loci, se usan como variables y el cluster de cada población se representa gráficamente (Li et al., 2005).

### **1.10 Caracterización morfométrica**

La caracterización morfométrica de los recursos zoogenéticos es un estudio complementario importante en la conservación de estos recursos. A partir del conocimiento de las características de una población se obtienen datos que permiten definirla y diferenciarla de otras, resaltando aquellos valores únicos que le confieran a dicha población características peculiares (Barba, 2004; Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

La caracterización morfológica, junto con la productiva, son fundamentales para la identificación de razas y poblaciones, y para el conocimiento de las producciones animales.

La zoometría porcina es la rama de la zootecnia que estudia la medición de diferentes regiones corporales. Estas medidas pueden ser cualitativas o cuantitativas. Para la toma de las medidas se emplean diferentes instrumentos: balanza, cinta métrica inextensible, bastón zoométrico y compás de Broca (Castro, 2011). Algunas veces, debido al comportamiento de los animales, se utilizan jaulas para un mejor manejo de los mismos.

La conformación corporal en los animales de interés zootécnico se considera habitualmente como un carácter subjetivo (Dalton, 1980), pero la zoometría permite estudiar las formas de los animales mediante mediciones corporales cuantificando dicha conformación, estableciendo medidas concretas y su variación normal para una determinada raza o población (Torrent, 1982). Según

Herrera, (2002; citado por Revidatti, 2009), las variables morfoestructurales de naturaleza cuantitativa son usadas fundamentalmente para establecer el grado de homogeneidad existente en un grupo racial.

Las variables morfométricas consideradas generalmente son: el peso vivo, la longitud y ancho de cabeza, el ancho interorbital; la longitud y ancho del hocico, la longitud y ancho de la oreja, el diámetro longitudinal, la longitud de la paleta; la longitud del jamón; la longitud y ancho de la grupa; la distancia interisquiática; el perímetro torácico; el perímetro de la caña; la alzada a la cruz, a la grupa y al nacimiento de la cola (Castro, 2011).

La alzada a la cruz es una de las variables con menor influencia ambiental, constituyendo una de las bases étnicas de clasificación, al tratarse del carácter morfológico más estable de los animales en relación con las restantes medidas corporales.

La alzada a la cruz se compone de dos medidas: una es la distancia de la cruz al esternón, y la otra la distancia desde el esternón al suelo. Las dimensiones de ambas partes varían según el desarrollo del tórax y de los miembros, resultando en animales con extremidades cortas un caso (caracteriza una aptitud carne-grasa) y muy altos de extremidades en el otro (aptitud carne magra).

El diámetro longitudinal, es otra de las medidas requeridas para el conocimiento de las razas. El perímetro torácico aunque es la medida más influida por la alimentación, se corresponde exactamente con el tamaño y forma del tronco, y alcanza sus valores máximos en los períodos tempranos del desarrollo del animal. Sirve de base para la determinación de las proporciones corporales junto con el diámetro longitudinal y en algunos casos para la apreciación del peso del animal (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

El perímetro de la caña también es muy importante para el estudio morfológico de los cerdos ya que se relaciona con mucha exactitud con el desarrollo esquelético.

Las medidas del jamón en el cerdo sirven para valorar la ampulosidad de esta región que se presentaría como un indicador productivo, más que como una variable morfométrica.

El tamaño cefálico varía según la raza en la especie porcina, en general es

grande y larga en relación con el tamaño del cuerpo en las razas poco mejoradas, y más corta y reducida en las razas seleccionadas. Las diferencias más señaladas se encuentran en las proporciones relativas del cráneo con la cara, ya que en algunas razas el desarrollo facial es muy visible mientras que en otras predomina el desarrollo del cráneo (Díaz Montilla, 1965).

A partir de las diferentes variables se pueden calcular diferentes índices. Dentro de los índices, se pueden diferenciar los referidos a la diagnosis racial y los de tipo funcional que informan de la orientación productiva de los individuos. Los primeros son: el índice cefálico, el de proporcionalidad y el pelviano, mientras que el índice de compacidad, el corporal, el de carga de la caña y el de profundidad relativa del pecho son índices funcionales.

Para la mayoría de los cálculos de los índices corporales se basan en la medida de la alzada a la cruz, ya que como se mencionó anteriormente, es una medida poco afectada por las condiciones ambientales.

El índice cefálico clasifica a la especie porcina en tres tipos étnicos: los troncos asiático y céltico, que son braquicéfalos, y el tronco ibérico, que se calificaría como dolicocefalo, según Sanson (Díaz Montilla, 1965).

Con el índice corporal (que relaciona el diámetro longitudinal con el perímetro torácico) se expresa las proporciones entre las dimensiones de anchura y longitud en un individuo. Los valores numéricos para este índice fluctúan entre cifras menores que 83 (conformación longilíneas), entre 83 y 90 (mesolíneas) y mayores que 90 (brevilíneas) (Aparicio Macarro, 1960 citado por Revidatti, 2009). Según Díaz Montilla, (1965), de acuerdo al índice corporal resultan brevilíneos los cerdos con índice menor a 86, mesolíneos de 86 a 88 y longilíneos los que tienen más de 88. Esta proporcionalidad general en las clasificaciones raciales se completa con otros índices, como el índice facial, el cefálico y el pelviano.

El índice de carga de la caña evidencia la armonía entre la masa total del cuerpo (peso vivo) y la conformación de las extremidades (diámetro de la caña). A mayor peso, mayor robustez en el animal examinado, manifestado concretamente por la fortaleza de sus extremidades, mientras el índice de compacidad expresado por el cociente entre la alzada a la cruz y el peso, es un índice funcional de interés en la producción de carne (Sotillo & Serrano, 1985).

La preponderancia del tronco sobre el resto del cuerpo y sus formas redondeadas es muy importante en los animales de aptitud cárnica y se expresa mediante otros índices en los cuales se cuenta principalmente el perímetro torácico.

Como antecedentes de zoometría de cerdos locales en nuestro País se encuentra un trabajo en conjunto con investigadores de Brasil, Colombia y Uruguay donde se compararon razas de cerdos comerciales y razas locales. Este trabajo evidenció que los cerdos Mamellados se encuentran relacionados con razas comerciales seleccionadas para producción de carne como Duroc y Landrace. (McManus et al., 2010).

## **2. Hipótesis de trabajo**

Los Cerdos Pampa Rocha presentan variantes alélicas para genes asociados a características productivas y reproductivas (CRC1, FUT1 y ESR).

Los Cerdos Pampa Rocha presentan alta diversidad genética.

La morfometría es una herramienta útil para establecer un patrón racial en los cerdos Pampa Rocha.

## **3. Objetivo general**

Realizar la caracterización genética y morfométrica de cerdos Pampa Rocha mediante el uso de marcadores moleculares de ADN (microsatélites, genes mayores), y el estudio de variables morfométricas.

### **3.1 Objetivos específicos**

Estimar frecuencias alélicas para los genes mayores CRC1, FUT1 y ESR.

Analizar variabilidad genética y estructura poblacional mediante marcadores moleculares de ADN (microsatélites) de cerdos Pampa Rocha y compararla con otras razas.

Realizar la caracterización morfométrica de los cerdos Pampa Rocha.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Obtención de las Muestras**

Se recolectaron muestras provenientes de diferentes establecimientos, constituyéndose el banco de ADN de suinos (*Sus scrofa*) del Área Genética de Facultad de Veterinaria. La extracción se llevó a cabo a partir de muestras de pelo (Protocolo 4.2.1) y sangre (Protocolo 4.2.2). Este banco está formado por muestras de razas locales (Pampa Rocha y Mamellados) y razas comerciales (Large White, Landrace, Pietrain, Duroc e híbridos). Las muestras pertenecen a la Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur-Facultad de Agronomía (Progreso, Departamento de Canelones); Servicio Veterinario de Remonta del Campo Militar N°1 (Los Cerrillos, Departamento de Canelones) y empresas de chacinados.

### **4.2 Aislamiento de ADN**

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante las técnicas de resina Chelex® y fenol-cloroformo.

#### **4.2.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de folículo piloso (Chelex® modificado) (Walsh et al., 1991).**

1. Se colocan entre 5-10 pelos en un tubo de PCR con la raíz en el fondo
2. Añadir 100 µL de una solución de Chelex 100 al 5% mantenido en agitación.
3. Incubar 1h a 60°C y 1h a 95°C
4. Congelar a -20°C

Si se descongela varias veces después de mucho tiempo se recomienda repetir la incubación de 15 a 95°C. Mezclar antes de usar.

4.2.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera. Técnica con Fenol cloroformo (John et al., 1991).

1. Se mezclan 500  $\mu$ L de sangre (extraída con EDTA como anticoagulante) con 500  $\mu$ L de Solución de extracción I. Agitar por inversión durante 10 min y centrifugar a 6000 rpm durante 10 min.

Solución I:

10 mM Tris-Cl, pH7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2. Se mantiene el sobrenadante y se agregan 120  $\mu$ L de detergente Nonidet P40 (lisis celular). Se mezcla con micropipeta y se pasa el contenido a tubos eppendorf (1.5 ml). Mezclar durante 10 min y agitar con vortex hasta disgregar el pellets celular. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 min para concentrar los núcleos descartando el sobrenadante (en esta etapa el material puede conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente continuar con la técnica de extracción).
3. Resuspender el pellet 2 min en 800  $\mu$ L de solución de extracción II para lisar los núcleos celulares.

Solución de extracción II:

10 mM Tris-Cl pH7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 M NaCl

0.5% SDS

2 mM Na<sub>2</sub>EDTA

4. Agregar 500  $\mu$ L de una mezcla de fenol cloroformo, alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1, mezclando por inversión. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min.

5. Transferir con micropipeta la fase superior evitando aspirar material proteico de la interfase y colocar el sobrenadante en un tubo eppendorf.
6. Precipitar el ADN del sobrenadante con 2 volúmenes de etanol 95% frío. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante y lavar el ADN precipitado con 200 µL de etanol 70%. Dejar que el ADN se deshidrate y se evapore el alcohol colocando en estufa o a temperatura ambiente
8. Resuspender el ADN en 150 µL de TE (10 mM Tris-Cl pH8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Dejarlo un día a temperatura ambiente hasta una completa resuspensión.

### **4.3 Caracterización genética molecular**

Con el objetivo de realizar la caracterización del recurso zogenético porcino Pampa Rocha, en la presente tesis se analizaron:

- polimorfismos en genes mayores relacionados con características productivas y reproductivas (CRC1, FUT1 y ESR).
- marcadores microsatélites.

#### **4.3.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores**

##### **4.3.1a CRC1**

Se estudiaron 80 animales: 16 cerdos Pampa Rocha, 14 cerdos de raza Landrace, 5 Large White, 3 Duroc y 14 híbridos. Para la obtención mediante PCR del amplicón de 659 pb en este gen se utilizaron los siguientes primers (Villareal et al., 2005):

F: 5' TCC AGT TTG CCA CAG GTC CTA CCA 3'

R: 5'GAG TCT CTG AGG TGA GGC CAC TTA 3'

Se optimizó un programa con una desnaturalización inicial de 94°C/5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 minuto, hibridización a 58°C/1 minuto y extensión a 72°C/1 minuto, con una extensión final a 72°C/5 minutos.

Para el RFLP se utilizó 10 U de *Alw21I* (sitio de reconocimiento: 5`GT(A)GCT(A)3`) en 10 µl de producto de PCR, con una incubación a 37°C durante 3hrs. La inactivación de la enzima se realiza a 65°C durante 20 minutos, seguida de un tratamiento con proteinasa K (concentración 1 µg/µL) durante 1 h a 37°C (desnaturalización) (Hernández et al., 2008). Se espera un patrón de digestión de 524 y 135 pb para el genotipo NN (individuos normales), de 524, 358, 166 y 135 para el Nn (heterocigotos, portadores) y de 358, 166 y 135 para el genotipo nn (susceptibles).

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GoodView™, en transiluminador UV. Los productos de digestión se observaron en geles de acrilamida al 6% teñidos con nitrato de plata.

#### **4.3.1b FUT1**

Para este gen se analizaron 89 animales: 23 cerdos Pampa Rocha, 3 cerdos Mamellados, 14 de raza Landrace, 5 Large White, 3 Duroc, 12 Pietrain y 29 híbridos. Para la obtención mediante PCR del amplicón de 421 pb en este gen se utilizaron los siguientes primers (Huang et al., 2008):

F: 5`CTG CCT GAA CGT CTA TCA AGA TC 3`

R: 5` CTT CAG CCA GGG CTC CTT TAA G 3`.

Se empleo un programa de amplificación con una desnaturalización inicial de 95°C/3 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C/45 segundos, 58°C/1 minuto, 72°C/1 minuto; con una extensión final de 72°C/5 minutos.

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GoodView™, en transiluminador UV.

El genotipado se realizó mediante secuenciación automática (Servicio de secuenciación MacroGen-Corea del Sur). El análisis posterior se realizó mediante el programa de acceso libre BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

#### **4.3.1c (ESR)**

Para este gen se analizaron 64 animales: 11 Pampa Rocha, 26 híbridos, 9 Landrace, 13 Pietrain, 4 Large White y 1 Duroc. Del total de los individuos 54 fueron genotipados por PCR-RFLP y 10 por análisis de secuenciación.

Para la amplificación por PCR convencional del amplicón de 120 pb en este gen se utilizó un par de primers específicos (Ramos et al., 2008):

F 5´CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3´

R 5´CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3´

El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial a 95°C/3 minutos; seguido de 30 ciclos de 95°C/1 minuto, 58°C/1 minuto y 72°C/1 minuto; con una extensión final de 72°C/5 minutos.

Para el RFLP se utilizó 10 U de *PvuII* (sitio de reconocimiento: 5´ CAGCTG 3´) en 10 µl de producto de PCR, con una incubación a 37°C durante 3 hrs. Se espera un patrón de digestión característico: 120 pb para el genotipo AA; 120, 65 y 55 pb para el genotipo heteocigoto AB; y 65 y 55 pb para el genotipo BB (Rothschild et al., 1997).

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GoodView™, en transiluminador UV. Los productos de digestión se observaron en geles de agarosa al 4%.

#### **4.4 Análisis mediante microsatélites:**

Se analizaron 39 muestras de ADN de cerdos de la raza local Pampa Rocha con un panel de 25 microsatélites. Dicho panel de microsatélites son recomendados por la FAO/ISAG (<http://www.user.gwdg.de/FAO/pig.htm>) y la técnica se encuentra optimizada en el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad de Cordoba, España.

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de pelo, mediante la técnica convencional con resina Chelex®. Posteriormente se llevo a cabo la

amplificación de los microsatélites estudiados en reacciones de PCR simples y múltiples (tabla 1). En dicha tabla se detallan los microsatélites analizados, junto a la ubicación cromosómica, fluorocromo utilizado y cebadores específicos.

En la tabla 2 se observan las condiciones de amplificación.

**Tabla 1: Microsatélites analizados**

Microsatélite	Cromosoma	Fluorocromos	Cebadores
CGA	1	HEX	F: GAACTTTCACATCCCTAAGGTCGT R: ATAGACATTATGTCCGTTGCTGAT
S0026	16	HEX	F: AACCTTCCCTTCCCAATCAC R: CACAGACTGCTTTTTACTCC
IGF1	5	6FAM	F: GCTTGGATGGACCATGTTG R: CATATTTTTCTGCATAACTTGAACCT
S0002	3q	HEX	F: GAAGCCCAAAGAGACAACCTGC R: GTTCTTTACCCACTGAGCCA
S0005	5	TET	F: TCCTTCCCTCCTGGTAACTA R: GCACTTCTGATTCTGGGTA
S0068	13	TET	F: CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC R: AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT
S0090	12	6FAM	F: CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA R: GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG
S0101	7	HEX	F: GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG R: GTCTCCCTCACACTTACCGCAG
S0155	1q	6FAM	F: TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG R: AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT
S0178	8	TET	F: TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG R: GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT
S0215	13	HEX	F: TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT R: TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT
S0225	8	HEX	F: GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA R: CAGGTGGAAGAATGGAATGAA
S0226	2q	6FAM	F: GCACTTTTAACTTTTCATGATACTCC R: GGTTAACTTTTNCCCCAATACA
S0227	4	HEX	F: GATCCATTTATAATTTTAGCACAAAGT R: GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC
S0228	6	TET	F: GGCATAGGCTGGCAGCAACA R: AGCCACCTCATCTTATCTACACT

S0355	15	6FAM	F: TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG R: TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA
S0386	11	TET	F: TCCTGGGTCTTATTTTCTA R: TTTTATCTCCAACAGTAT
SW24	17	TET	F: CTTTGGGTGGAGTGTGTGC R: ATCCAAATGCTGCAAGCG
SW240	2p	6FAM	F: AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG R: AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA
SW632	7	TET	F: TGGGTTGAAAGATTTCCCAA R: GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA
SW72	3p	TET	F: ATCAGAACAGTGCGCCGT R: TTTGAAAATGGGGTGTTTCC
SW857	14	HEX	F: TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC R: GATCCTCCTCCAAATCCCAT
SW911	9	6FAM	F: CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC R: CATCTGTGGAAAAAAAAAGCC
SW936	15	6FAM	F:TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC R: GTGCAAGTACACATGCAGGG
SW951	10	6FAM	F: TTTCACAACCTCTGGCACCAG R: GATCGTGCCCAAATGGAC

TET: 4, 7, 2', 7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína (color de emisión: verde)

6-FAM: 6-carboxifluoresceína (Azul)

HEX: 4,7,2',4',5'7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína (Amarillo).

TAMRA: N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (Rojo).

#### 4.4.1 Condiciones básicas de la PCR

Tampón PCR 10X: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH=9, 1% Triton X-100

MgCl<sub>2</sub> 25 mM

Didesoxinucleósidos: dATP 25 mM, dCTP 25 mM, dGTP 25 mM, dTTP 25 mM

Cebador Directo 100 µM

Cebador Reverso 100 µM

Taq DNA polimerasa: 5 U/ µL

Muestra: DNA

Aceite mineral

Agua ultrapura

Placas de 96 tubos de 0,2 ml Thermo-Fast 96 (Avanced Technologies)

Termociclador PTC-100 (MJ-Research)

**Tabla 2:** Condiciones de amplificación

Microsatélite	Tamaño	Múltiplex	MgCl <sub>2</sub>	TA (°C)	Gel
CGA	250-320	M1	2.5	55	I
S0068	211-260				
S0355	243-277	Simple (M2)	3	60	I
SW24	96-121	Simple (M3)	3	60	I
S0101	197-216	M4	2.5	55	I
SW632	159-180				
SW911	153-177				
S0215	135-169	M5	2.5	55	I
SW936	80-117				
S0225	170-196	M6	4	60	II
S0226	181-205				
S0227	231-256				
S0228	222-249				
S0090	244-251	M7	4	60	II
SW951	125-133				
S0178	110-124				
S0005	205-248	M8	2.5	55	III
S0026	92-106				
S0386	156-174	Simple (M9)	2.5	48	III
IGF1	197-209	Simple (M10)	2.5	55	III
SW72	100-116	M11	2.5	55	III
SW857	144-160				
S0155	150-166				
SW240	96-115				
S0002	190-216	Simple (M12)	2.5	60	III

Para el genotipado de dichos marcadores se procedió a la secuenciación automática en un equipo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular, de la Universidad de Córdoba, España, bajo la supervisión de la Dra. Amparo Martínez.

Las muestras resultantes de la PCR se mezclaron en forma que se pudieran

analizar en cada gel los microsatélites de un mismo lote (tabla 2). De esta manera, para analizar los 25 microsatélites se corrieron 3 electroforesis mezclando los productos de la amplificación de las distintas reacciones. Para cada una de las electroforesis realizadas se utilizaron muestras control estandarizadas, pertenecientes al Laboratorio donde se realizaron los experimentos.

Para cargar el gel de poliacrilamida se tomaron 1,5  $\mu$ L de la mezcla correspondiente y se le añadieron 3  $\mu$ L del tampón de carga. Se efectuó una desnaturalización previa de las muestras a 95 °C durante 3 minutos y se cargaron 3,5  $\mu$ L de las mismas en el gel. La electroforesis duró aproximadamente 2 horas.

Los cebadores de ADN se marcaron con fluorocromos de tres colores diferentes (azul, verde y amarillo), usando otro fluorocromo (rojo) para marcar un estándar de tamaños.

El análisis de los resultados obtenidos a partir del secuenciador automático se realizó en primera instancia mediante el programa Genescan Analysis v.3.1.2 el cual proporciona información del tamaño de los fragmentos estudiados.

Posteriormente se realizó el genotipado con el programa Genotyper 2.5, analizando las gráficas de las bandas obtenidas con el programa Genescan Analysis, identificándose los diferentes alelos para cada uno de los microsatélites.

Se calcularon las heterocigosidades observadas y esperadas, contenido de información polimórfica y el número promedio de alelos, mediante el programa de uso público Microsatellite Toolkit (para Excel; Park, 2001). El estadístico  $F_{IS}$  y la prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg (test exacto de Fisher usando el método en cadena de Monte Carlo Markov, Guo & Thompson, 1992) se calcularon mediante el programa Genetix 4.05.2 (Belkhir et al., 2003) y Genepop 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995) respectivamente.

Posteriormente se realizó una comparación de los cerdos Pampa Rocha con razas españolas, internacionales y asiáticas: Ibérico, Celta, Duroc, Berkshire, Pietrain, Landrace, Large White y Meshian. En esta comparación se emplearon 37 muestras de Pampa Rocha y 23 microsatélites (eliminando los marcadores CGA y S0026), con un N total de 415 individuos. Para este análisis se realizó

un Análisis molecular de varianza (AMOVA) calculando el porcentaje de variación entre las poblaciones y los índices  $F_{ST}$ , con el paquete Arlequín v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Se halló la distancia genética  $D_A$  de Nei (Nei et al., 1983). Con la matriz de distancia se construyeron árboles que reflejan las relaciones genéticas entre las poblaciones porcinas, con el programa Populations 1.2.28 (<http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/>) y Splistree (Huson & Bryant, 2006). La visualización de los árboles se realizó con el programa Treeview (Page, 1996).

Se estudio la estructura poblacional, mediante el programa Structure v2.3.4 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>), el cual realiza la asignación de los individuos a clusters (K) relacionando a los individuos más parecidos genéticamente utilizando un algoritmo bayesiano que emplea un modelo basado en el método de cadenas de Monte Carlo-Markov. Se utilizo un período de burn-in de 200.000 repeticiones y 600.000 repeticiones, desde K=2 hasta K=9. Los gráficos se realizaron con el programa Distruct (<http://www.stanford.edu/group/rosenberglab/distruct.html>),

Finalmente se realizó un análisis factorial de correspondencia utilizando el software Genetix v. 4.05.2 (Belkhir et al., 2003).

#### **4.5 Caracterización morfométrica**

Para la toma de las medidas cuantitativas en los cerdos Pampa Rocha se elaboraron fichas individuales para la recolección de los datos (información del establecimiento, de cada animal y medidas). La muestra constó de un N de 20 hembras y 3 machos. La toma de medidas se realizó en animales mayores de un año descartándose aquellos que se desvían del patrón racial (Barba, 2002). Los diferentes cálculos se realizaron por separado en hembras y machos, siguiendo la metodología descrita en la bibliografía, donde el sexo del animal se considera una fuente de variación (McManus et al., 2010; Barba et al., 1998).

En la Tabla 3 se detallan las medidas cuantitativas que fueron tomadas y el instrumento que se utilizó para su realización (bastón zoométrico, compás de Broca, cinta métrica inextensible). La toma de estas medidas se realizaron

respetando el bienestar animal, bajo las pautas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Para la toma de algunas medidas y muestras se utilizó una jaula con el objetivo de inmovilizar el animal (Foto 7).

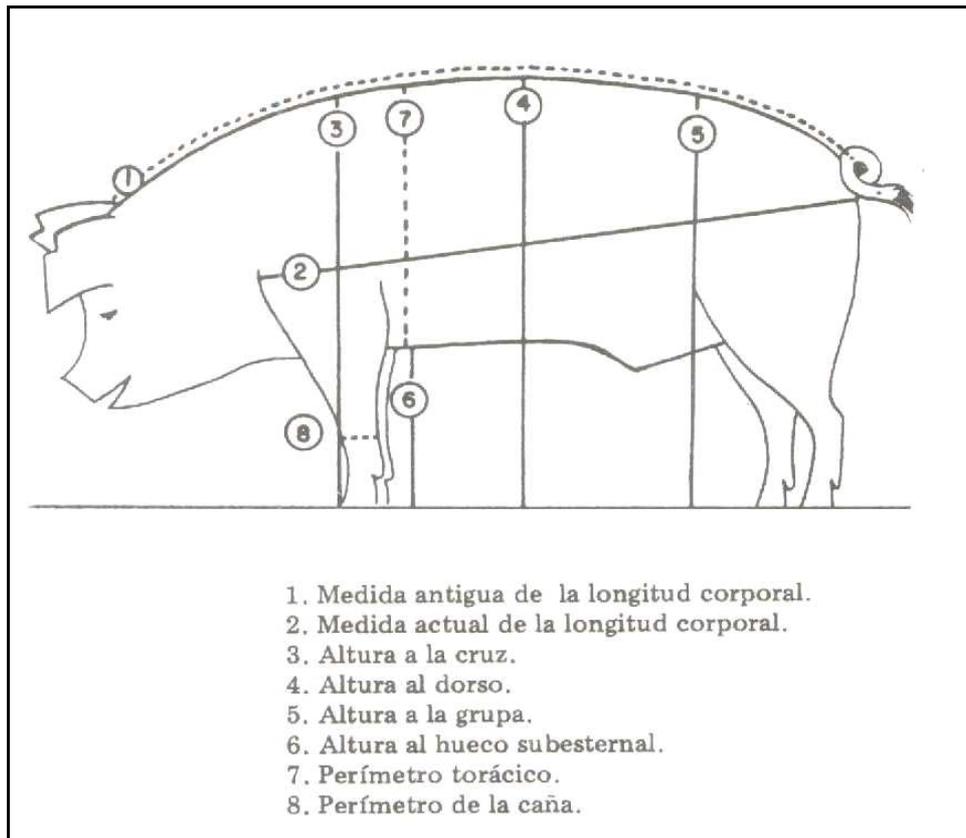
En la Tabla 4 se muestran los índices zoométricos que se emplearon para el estudio.

Para analizar los datos se realizaron los siguientes cálculos: promedio (media) como estadístico de tendencia central; desvío estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) como estadísticos dispersivos; y valores máximo (Máx.) y mínimo (Mín.). Para la obtención de estos valores se empleó el programa Excel.

Para el estudio comparativo del los cerdos Pampa Rocha se utilizaron 5 variedades del cerdo ibérico: Entrepelado, Manchado de Jabugo, Retinto, Torbiscal y Lampiño, utilizando en este caso 15 muestras de Pampa Rocha (hembras mayores de 2 años), con un N total de 325 animales. Para cumplir con este objetivo se realizó un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico SAS (Licencia de Facultad de Veterinaria-UdelaR).

**Tabla 3:** medidas cuantitativas

<b>Variable</b>	<b>Medición</b>	<b>Instrumento</b>
Peso vivo	Animal	Balanza
Longitud de la cabeza	De protuberancia occipital externa a punta del hocico	Compás de Broca
Anchura de la cabeza	Entre ambas apófisis cigomáticas del temporal	Compás de Broca
Anchura interorbital	Entre ambas apófisis cigomáticas del frontal	Compás de Broca
Longitud del hocico	De sutura fronto nasal a punta del hocico	Compás de Broca
Anchura del hocico	Entre la base de los colmillos	Compás de Broca
Longitud de la oreja	Del punto central de la base al vértice	Cinta métrica inextensible
Anchura de la oreja	Entre ambos bordes de la base	Cinta métrica inextensible
Alzada a la cruz	Del suelo al punto culminante de la cruz	Bastón zoométrico
Longitud corporal	De base del cráneo a base de la cola por la línea dorsal	Cinta métrica inextensible
Diámetro longitudinal	De región del encuentro a la punta de la nalga	Bastón zoométrico
Perímetro torácico	Rodeando el tórax inmediatamente después de los codos	Cinta métrica inextensible
Longitud de la paleta	Del borde superior de la escápula al carpo	Cinta métrica inextensible
Perímetro de la caña	Rodeando el tercio medio del metacarpiano	Cinta métrica inextensible
Alzada a la grupa	Del suelo a la tuberosidad iliaca externa	Bastón zoométrico
Alzada al nacimiento de la cola	Del suelo a la base de la implantación de la cola	Bastón zoométrico
Anchura de la grupa	Entre tuberosidades iliacas externas	Compás de Broca
Distancia intersisquiática		Compás de Broca
Longitud de la grupa	De la tuberosidad iliaca externa a punta de nalga	Compás de Broca
Longitud del jamón	De la terminación de la nalga a la punta del crovejón	Cinta métrica inextensible



**Figura 1:** Principales medidas zométricas en cerdos

**Foto 5:** Instrumentos utilizados para la toma de medidas.



A la derecha: Bastón zométrico; izquierda: cinta inextensible

**Foto 6:** Compás de broca



**Foto 7:** Jaula empleada para la toma de medidas



**Tabla 4:** Indices zoométricos

<b>Índice</b>	<b>Forma de calcularlo</b>
Cefálico	Anchura de la cabeza X 100/ longitud de la cabeza
Facial	Longitud del hocico X 100/ longitud de la cabeza
De proporcionalidad	Alzada a la cruz X 100/ diámetro longitudinal
De compacidad	Alzada a la cruz X 100/ peso vivo
Corporal	Diámetro longitudinal X 100/ perímetro torácico
Pelviano	Anchura de la grupa X 100/ longitud de la grupa
Metacarpo-torácico	Perímetro de la caña X 100/ perímetro torácico
De carga de la caña	Perímetro de la caña X 100/ peso vivo

## 5. Resultados

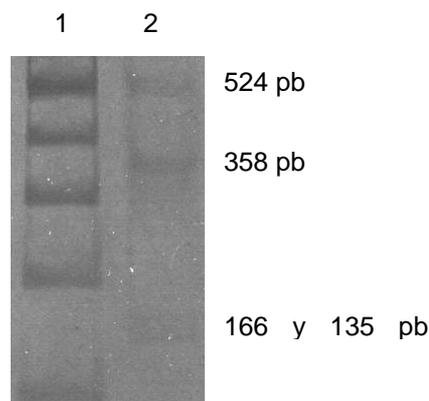
A continuación se detallan los resultados obtenidos en el presente trabajo, con el objetivo general de caracterizar una muestra de cerdos Pampa Rocha. Para la caracterización genética se estudiaron polimorfismos en genes mayores (CRC1, FUT1 y ESR) y marcadores microsatélites. A nivel fenotípico se estudiaron diferentes variables cuantitativas.

### 5.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores

Para el análisis de los resultados obtenidos del estudio del polimorfismo en los genes CRC1, FUT1 y ESR, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas.

#### 5.1.1 CRC1

Las muestras analizadas por la técnica de PCR revelaron un fragmento de amplificación de 659 pb, concordante con el tamaño esperado. El amplicón sometido a RFLP mostró un patrón de restricción característico para cada alelo según peso molecular de las bandas observadas (N: 524 y 135 pb; n: 358 y 166 pb). En la figura 2 se muestra la electroforesis en gel de acrilamida de los productos de digeridos con *Alw21I*. Las bandas de 166 y 135 pb en los individuos Nn y nn se observan de forma muy tenue, pero no interfieren en la asignación del genotipo.



**Figura 2: Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de productos de digestión con *Alw21I*.** Carriles 1: marcador de peso molecular (bandas de 500, 400, 300, 200 y

100 pb.); carril 2: patrón de restricción característico utilizando la enzima *A/w21I*, de un individuo heterocigota. Se observan bandas de 524, 358, 166 y 135 pb.

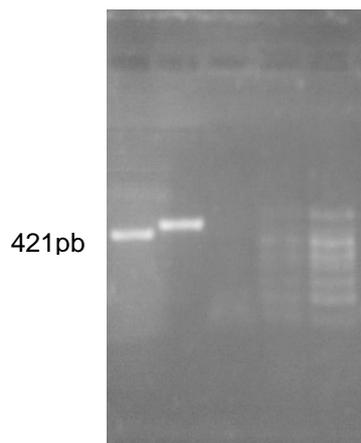
De los 80 animales estudiados, 38.75 % presentaron genotipo NN, 52.5 % Nn (52.5 %) y 8.75 nn. La distribución de las razas para cada genotipo se observa en la Tabla 5. En el caso de los Pampa Rocha, las frecuencias genotípicas fueron las siguientes: 87.5 % NN y 12.5 % Nn. Las frecuencias alélicas para el total de los individuos (N=80) fue de 65 % para el alelo N y 35 % para el alelo n.

**Tabla 5:** Frecuencia por razas de los genotipos para el SEP

Raza	Genotipo NN	Genotipo Nn	Genotipo nn	Nº total
Pampa Rocha	14	2	0	16
Landrace	1	8	5	14
Large White	4	1	0	5
Duroc	3	0	0	3
Pietrain	0	14	0	14
Híbridos	9	17	2	28
Total (%)	31 (38.75 %)	42 (52.5 %)	7 (8.75 %)	80 (100%)

### 5.1.2 FUT1

Mediante amplificación por PCR se obtuvo un amplicón esperado de 421 pb (Figura 3). En este caso el genotipado se realizó por secuenciación automática. De los 89 animales analizados, 31 % presentaron genotipo AA, 42 % genotipo heterocigota AG y 7 % homocigota GG. En la tabla 6 se muestra la distribución de los genotipos encontrados de acuerdo a las razas. En los cerdos Pampa Rocha, las frecuencias genotípicas para este polimorfismo fueron: 13 % AA, 74 % AG y 13 % GG. Las frecuencias alélicas para el total de los individuos (N=89) fue de 40 % para el alelo A y 60 % para el alelo G.



**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de producto de PCR del gen FUT1 donde se observa en el carril a la derecha el amplicón de 421 pb.

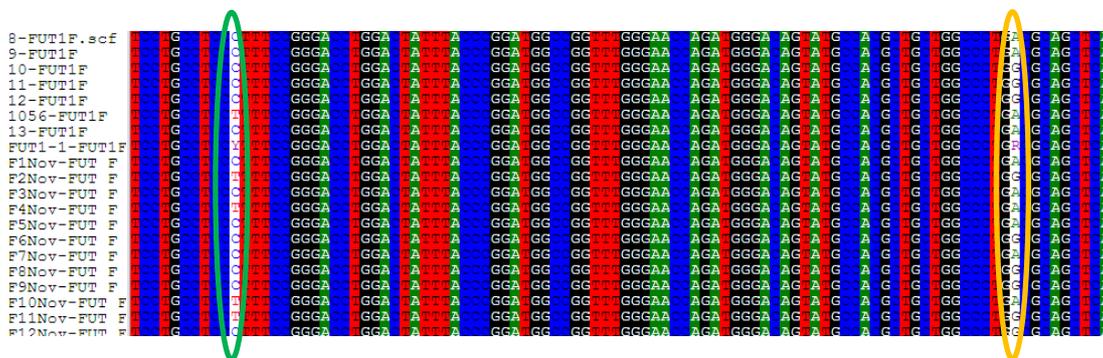
**Tabla 6:** Frecuencia por razas de los genotipos para el polimorfismo en el gen FUT1

Raza	Genotipo AA	Genotipo AG	Genotipo GG	Nº total
Pampa Rocha	3	17	3	23
Landrace		6	8	14
Large White		3	2	5
Duroc		3		3
Pietrain		7	5	12
Mamellado	2		1	3
Híbridos	6	14	9	29
Total (%)	11 (12,3%)	50 (56,2%)	28 (31,4%)	89 (100%)

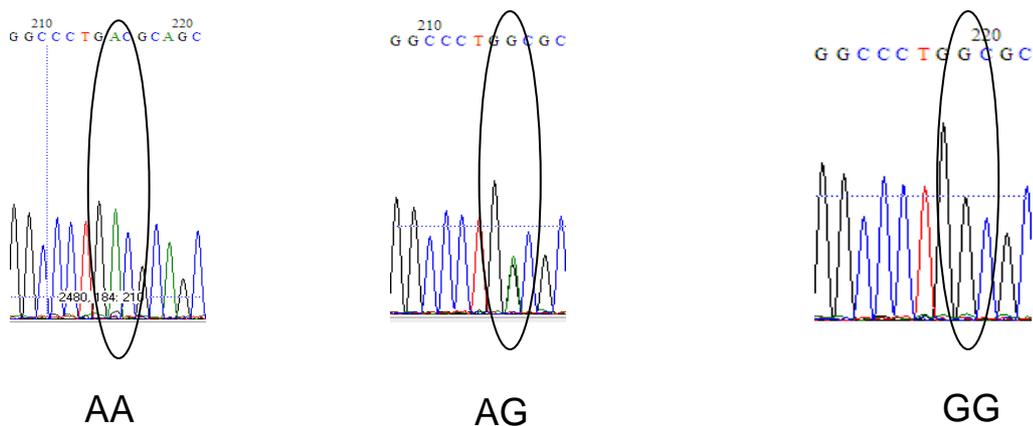
En este gen, además del polimorfismo estudiado inicialmente, se encontró un segundo polimorfismo C → T, a menos de 80 pares de bases. Para este segundo polimorfismo se obtuvieron 47.2 % de animales genotipo CC, 47.2 % genotipo heterocigota CT y 5.6 % genotipo homocigota TT (la nomenclatura es de acuerdo a las bases que aparecen en el sitio). En tabla 7 se observa la distribución de los genotipos de acuerdo a las razas para este segundo polimorfismo. Para los cerdos Pampa Rocha las frecuencias genotípicas fueron de 39 % CC y 61 % CT. Las frecuencias alélicas para el total de los individuos (N=89) fue de 70 % para el alelo C y 30 % para el alelo T. En la figura 4 se observa el alineamiento de secuencias.

**Tabla 7:** distribución de los genotipos según las razas

Raza	Genotipo CC	Genotipo CT	Genotipo TT	Nº total
Pampa Rocha	9	14		23
Landrace	6	7	1	14
Large White	2	3		5
Duroc		1	2	3
Pietrain	8	4		12
Mamellado	2	1		3
Híbridos	15	12	2	29
Total (%)	42 (47,2%)	42 (47,2%)	5 (5,6%)	89 (100%)



**Figura 4:** Alineamiento de una región del fragmento secuenciado para el gen FUT1. En verde se señala el polimorfismo: C → T (Y=T/C). En naranja se marca el polimorfismo A → G (R=A/G). El alineamiento se realizó con el programa BioEdit.

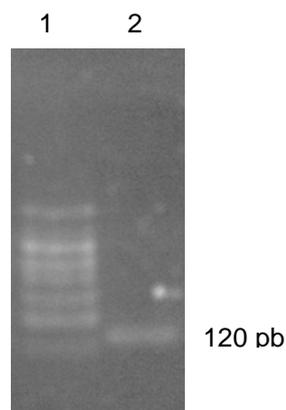


**Figura 5:** Patrón visualizado en los electroferogramas para los tres genotipos del polimorfismo A → G en el gen FUT1. A la izquierda se observa el electroferograma para un genotipo AA, donde el pico en color verde representa una adenina. Al centro

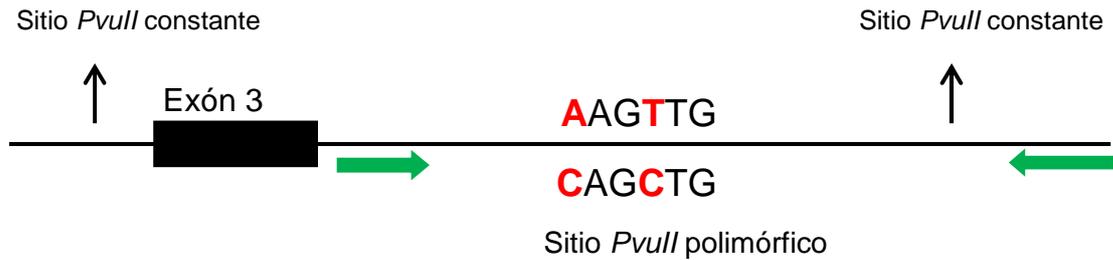
se observa un genotipo heterocigota donde se superponen los picos de color verde (adenina) y negro (guanina). A la derecha el genotipo es homocigota GG con un único pico de color negro (guanina).

### 5.1.3 ESR

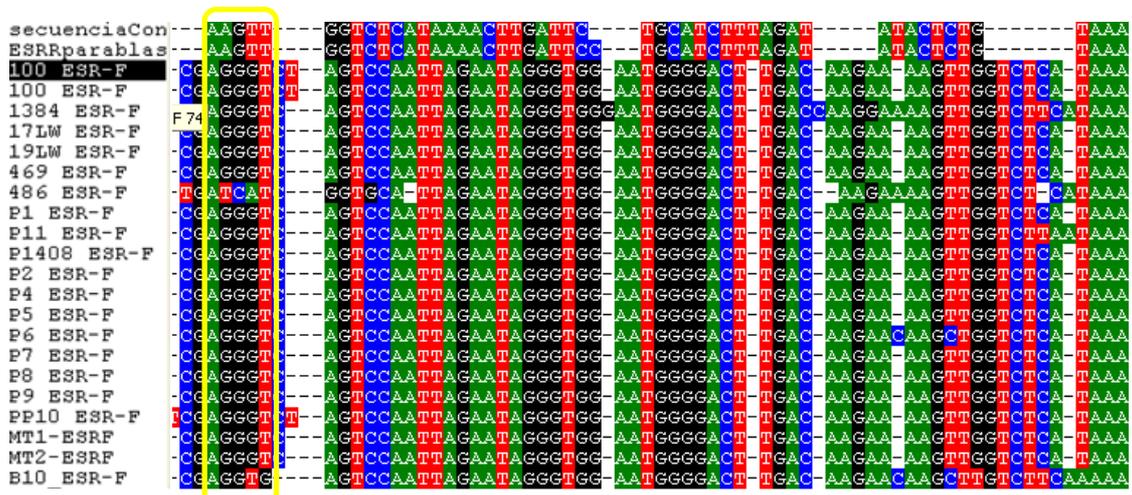
Por amplificación por PCR se obtuvo un fragmento de tamaño esperado de 120 pb. En la figura 6 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% del amplicón. De la totalidad de los animales estudiados por RFLP, todos resultaron homocigota AA (120 pb), no observándose el alelo B. En la figura 7 se visualizan los sitios de restricción para la enzima *PvuII* alrededor de la región polimórfica. En la figura 8 se muestran el alineamiento de secuencias obtenidas por secuenciación automática, y en la figura los electroferogramas.



**Figura 6:** Gel de agarosa al 2% teñido con GoodView. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de producto de PCR del gen ESR. Carril 1: marcador de peso molecular (bandas de 700, 600, 500, 400, 350, 300, 200 y 100 pb.); carril 2: banda de 120 pb, tamaño esperado del amplicón del gen ESR.



**Figura 7:** Esquema de la región polimórfica dentro de ESR. Mapa de la región que rodea el sitio AAGTTG, con dos sitios *Pvull* constantes. En rojo se marcan los cambios que tienen que darse para que se produzca el corte por *Pvull*. En verde se señalan los cebadores (Rotschild et al., 1996).

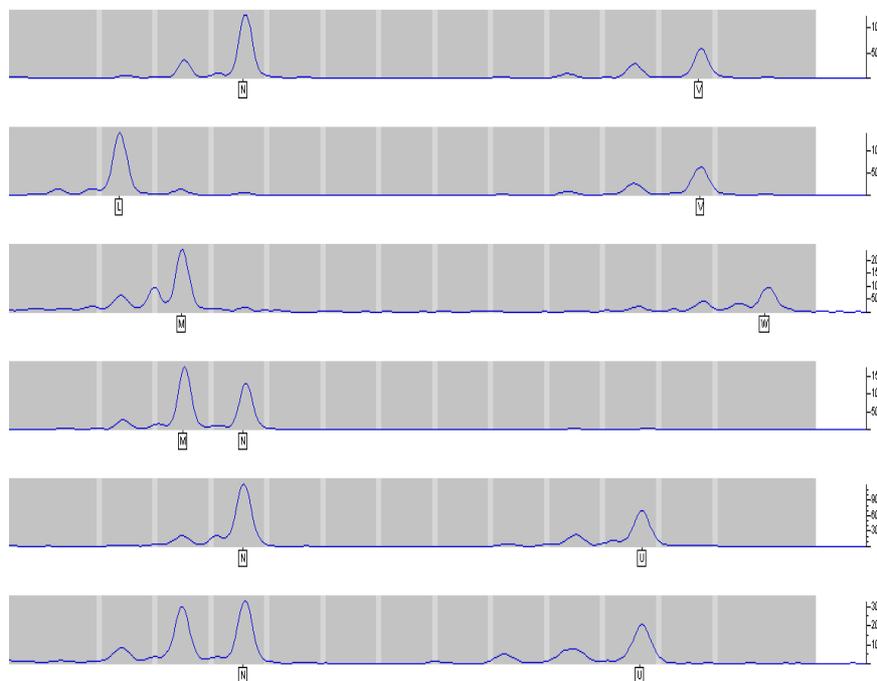


**Figura 8:** Alineamiento de una región del fragmento secuenciado para el gen ESR. Alineación de secuencia del GenBank (contig cromosoma 1), donde se localizaron los primers con la secuencia reverse amplificada de algunos animales. En amarillo se marca la región polimórfica.

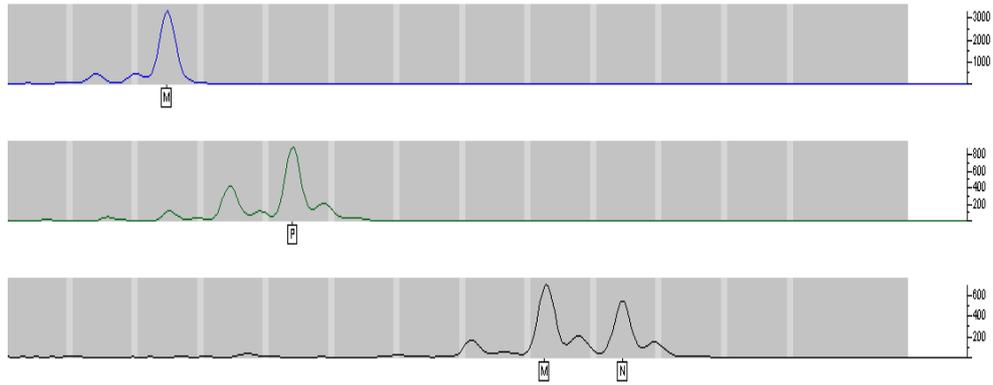
## 5.2 Análisis mediante microsatélites

Para analizar los datos obtenidos a partir de la secuenciación de los microsatélites se hallaron diferentes parámetros y estadísticos: para analizar la diversidad genética se calcularon el número de alelos, contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada y esperada. Se determinó el estadístico  $F_{IS}$  para determinar exceso de homocigotas y/o heterocigotas, y la prueba de Equilibrio Hardy Weinberg.

Se logró una correcta amplificación de todos los marcadores microsatélites utilizados. En la figura 8 se observan los fluorogramas obtenidos y visualizados en el programa Genotyper 2.5



**Figura 8:** Se observa el patrón de picos en los electroferogramas obtenidos por secuenciación para seis de las muestras analizadas. Debajo de cada pico figura el alelo asignado por el programa Genotyper, y a la derecha la intensidad obtenida para los diferentes picos.



**Figura 9:** En este electroferograma se observa el genotipado de un individuo, para tres microsatélites, marcado cada uno con una fluorescencia distinta (azul, verde y amarillo).

### 5.2.1 Número de alelos y PIC

Todos los loci estudiados resultaron polimórficos, siendo S0386 y S0002 los microsatélites que presentaron el menor número de alelos (2), mientras los S0068 y SW240 los marcadores con mayor número de alelos (10). El número medio de alelos fue de 5.72 con un desvío estándar de 2.46.

Los valores de PIC oscilan entre 0.030 para S0386 y 0.819 para CGA. Diecisiete de los 25 marcadores resultaron altamente informativos (PIC >0.5), 7 medianamente informativos (PIC entre 0.25 y 0.5) y uno poco informativo: S0386 (PIC <0.25). En general, los marcadores con mayor PIC se corresponden con los que presentan mayor número de alelos (CGA1, SW936, S0068, S0228, S0178, S0005), aunque el SW240, que es uno de los dos marcadores con mayor número de alelos, presenta un valor de PIC más bajo (0.679). De forma similar, en aquellos marcadores con menor PIC (S0386 y S0002), se detectaron menor número de alelos.

### 5.2.2 Heterocigosidad

La heterocigosidad esperada varió entre 0.030 para S0386 y 0.837 para el marcador CGA, con una media de 0.603 con un desvío estándar de 0.199. Para la heterocigosidad observada la variación fue entre 0.031 para S0386 y 0.875 para el microsatélite S0005, con una media de 0.583 con una desviación

de 0.208.

**Tabla 8:** Número de alelos, PIC, Heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada por marcador

Locus	Nº de alelos	PIC	He	H
CGA 1	9	<b>0,819</b>	<b>0,837</b>	<b>0,800</b>
S0101	6	0,476	0,513	0,527
S0215	4	0,355	0,394	0,351
S0355	3	0,318	0,373	0,285
SW911	3	0,581	0,654	0,594
SW936	8	0,778	0,804	0,764
S0068	<b>10</b>	0,754	0,775	0,818
SW632	5	0,552	0,618	0,611
SW24	4	0,639	0,693	0,56
S0227	4	0,359	0,386	0,435
S0225	5	0,338	0,369	0,416
S0090	4	0,528	0,570	0,542
S0226	7	0,641	0,671	0,621
SW591	3	0,456	0,541	0,538
S0228	8	0,701	0,739	0,769
S0178	9	0,787	0,813	0,735
S0005	8	0,803	0,826	0,875
S0386	<b>2</b>	<b>0,030</b>	<b>0,030</b>	<b>0,031</b>
SW72	7	0,668	0,697	0,605
S0002	<b>2</b>	0,253	0,297	0,181
SW857	6	0,631	0,684	0,735
S0026	4	0,543	0,603	0,589
IGF	7	0,749	0,780	0,763
S0155	5	0,633	0,680	0,702
SW240	<b>10</b>	0,679	0,721	0,736

En negrita se marcan los valores mínimos y máximos.

### 5.2.3 $F_{IS}$ y Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg

La magnitud del  $F_{IS}$ , viene dada por el valor absoluto del índice, siendo bajo si el valor esta entre 0 y 0.05, medio si se encuentra entre 0.06 y 0.15, alto si se encuentra entre 0.16 y 0.25 y muy alto si es mayor a 0.25 (Hartl 1988). Este estadístico toma valores desde -1 a + 1, indicando el signo negativo un exceso de heterocigotas mientras que el signo positivo indica exceso de homocigotos (Martínez, 2008). Si el  $F_{IS}$  es de 0 no hay endogamia y la población está en equilibrio de Hardy Weinberg. El  $F_{IS}$  Multilocus indica el valor medio de

endogamia en la población.

El estadístico  $F_{IS}$  varió entre -0.115 para S0227 y 0.401 para el marcador S0002. Diecisiete de los 25 marcadores presentan signo positivo, indicando exceso de homocigotas, y 8 presentan signo negativo. El  $F_{IS}$  Multilocus de 0.0475, indica un valor bajo de endogamia, pero con exceso de homocigotas.

De 24 microsatélites analizados mediante el test exacto de Fisher, el 95,8 % de se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg, encontrándose únicamente al microsatélite SW72 fuera del equilibrio ( $p$  valor  $<0.01$ ). Para el microsatélite S0386\* no se obtuvo resultado, probablemente debido a errores en el muestreo, a que es monomórfico o presenta demasiado alelos nulos. Cuando se lo analiza por el test de  $\chi^2$ , se obtiene un  $p$ -valor de 1.0, indicando que se encuentra en equilibrio.

**Tabla 9:** Valores de  $F_{IS}$  y  $p$  para la prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg

<b>Locus</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b>Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg (<math>p</math>)</b>
CGA	0.070	0.064
S0101	-0.012	0.247
S0215	0.121	0.352
S0355	0.256	0.394
SW911	0.105	0.770
SW936	0.064	0.227
S0068	-0.039	0.639
SW632	0.026	0.027
SW24	0.212	0.038
S0227	-0.115	1.000
S0225	-0.113	0.638
S0090	0.062	0.658
S0226	0.087	0.341
SW591	0.018	0.206
S0228	-0.027	0.446
S0178	0.110	0.431
S0005	-0.043	0.453

S0386	0.000	----*
SW72	0.145	<b>0.000</b>
S0002	0.401	0.042
SW857	-0.059	0.992
S0026	0.036	0.916
IGF	0.035	0.194
S0155	0.035	0.692
SW240	-0.008	0.801

#### **5.2.4 Comparación genética de los Pampa Rocha con otras poblaciones porcinas**

Para estudiar las relaciones genéticas de los Pampa Rocha se realizó un análisis comparativo con diferentes razas: Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Large White y Meishan. En este análisis se emplearon 37 individuos Pampa Rocha y 23 marcadores microsatélites (eliminando los marcadores CGA y S0026).

Se llevó a cabo un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) a partir del cual se obtuvo el porcentaje de variación entre diferentes estructuras testeadas, y el índice  $F_{ST}$ . Se realizó una asignación individual a clusters, se calculó la matriz de distancia genética  $D_A$  a partir de la cual se elaboró un árbol y un split network de distancia genética. Finalmente se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia.

##### **5.2.4a Análisis de molecular de varianza (AMOVA)**

El número de loci utilizados para el cálculo de distancias fue de 23 y el número de permutaciones 1000. Se probaron 6 estructuras genéticas diferentes para realizar el test. El criterio de agrupación de las razas utilizadas fue principalmente de acuerdo a su procedencia. En la estructura 1 se comparó al Pampa Rocha, agrupando a las razas españolas por un lado (Ibérico y Celta), al resto de las razas europeas en otro grupo y finalmente a la raza asiática

Meishan. En la estructura 2 se comparó al Pampa Rocha con las razas españolas, teniendo en cuenta el posible origen de los cerdos criollos a partir de las mismas. En la estructura 3 se comparó al cerdo pampa Rocha con las razas europeas, excluyendo a las españolas, ya que también hay que considerar la posible introgresión genética de las mismas en las razas criollas. En la estructura 4 se compara a la única raza asiática utilizada en este análisis (Meishan) con el resto de las razas. En la estructura 5 se comparó a los cerdos Pampa Rocha, colocando en un mismo grupo a todas las restantes razas, y en la estructura 6 se lo comparó con un agrupamiento que incluye todas las razas excepto la Meishan. Las diferentes estructuras utilizadas para el AMOVA se detallan a continuación. Como resultado se muestra el porcentaje de variación entre grupos y el índice  $F_{ST}$ .

1) N° de grupos: 4

Grupo 1: Pampa Rocha

Grupo 2: Ibérico y Celta

Grupo 3: Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace

Grupo 4: Meishan

Para esta estructura poblacional se obtuvo un porcentaje de variación entre grupos de 8.55%, un  $F_{ST}$ : 0.30627.

2) N° de grupos: 2

Grupo 1: Pampa Rocha

Grupo 2: Ibérico y Celta

El porcentaje de variación entre grupos resulto de 20.44%, un  $F_{ST}$ : 0.31378.

3) N° de grupos: 2

Grupo 1: Pampa Rocha

Grupo 2: Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace

En este caso el porcentaje de variación entre grupos obtenido fue de 9.51%, con un  $F_{ST}$ : 0.33373.

4) N° de grupos: 2

Grupo 1: Pampa Rocha, Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace.

Grupo 2: Meishan

Con este agrupamiento el porcentaje de variación entre grupos fue de 17.19% , con un  $F_{ST}$ : 0.38436.

5) N° de grupos: 2

Grupo 1: Pampa Rocha

Grupo 2: Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace y Meishan.

En este caso el porcentaje de variación entre grupos obtenido fue de 7.18% con un  $F_{ST}$ : 0.33087.

6) N° de grupos: 2

Grupo 1: Pampa Rocha

Grupo 2: Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace

En el último de los agrupamientos utilizados en este análisis el porcentaje de variación entre grupos resulto en 11.81%, con un  $F_{ST}$ : 0.32772.

#### **5.2.4b Asignación individual a clusters**

Mediante el programa Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) se realizó la asignación individual a clusters, determinándose las proporciones que el genoma de cada individuo posee de las poblaciones ancestrales.

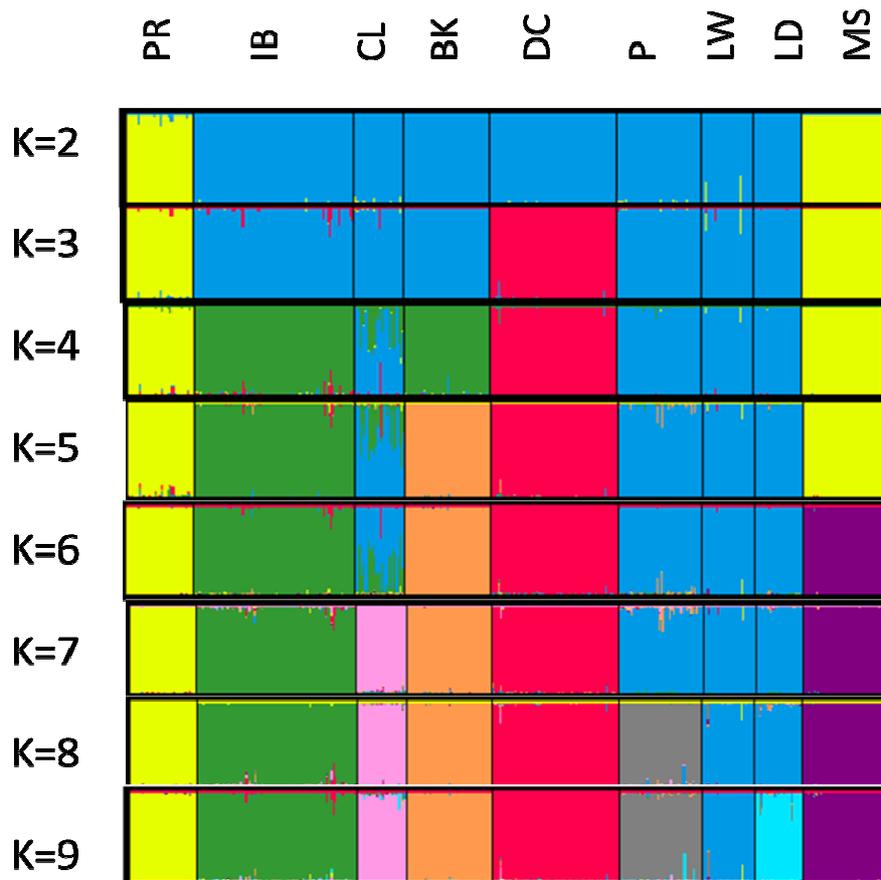
Se asumieron diferentes números de poblaciones (K), de K=2 a K=9, con 5 repeticiones para cada K, con el modelo de mezcla de ancestros. Se utilizó un período de Burn-in de 200000 con 400000 repeticiones.

El resultado obtenido se representa gráficamente en la Figura 10. Cada individuo está representado por una barra vertical.

Se observa en el gráfico que cuando el total de individuos (415) deben ser asignados a K=2, los individuos Pampa Rocha se agrupan junto con la raza asiática Meishan (color amarillo). Las restantes razas utilizadas para el análisis (Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White y Landrace) se agrupan

en el restante cluster (azul).

En los próximos K se van agrupando en diferentes cluster las razas españolas y europeas, mientras continúan en un mismo cluster los cerdos Pampa Rocha y Meishan, y la raza Duroc. En el K=6 se separan los cerdos Pampa Rocha de los Meishan, lo cual se mantiene hasta el K=9 en el cual se produce la separación de los 9 grupos raciales.



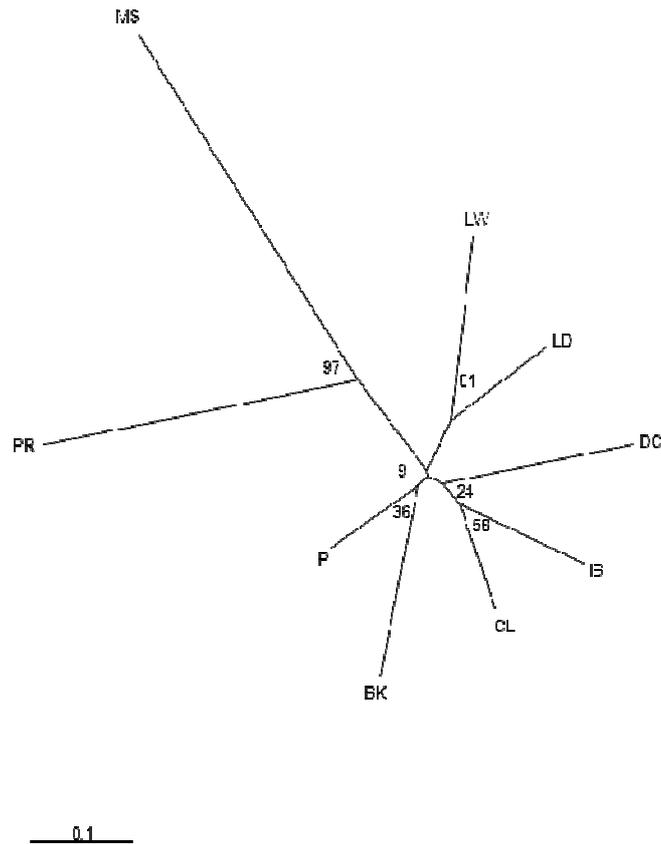
**Figura 10:** Representación gráfica obtenida mediante el programa Structure para 9 agrupaciones raciales y K=2 a K=9. Referencias: PR: Pampa Rocha; IB: Ibérico; CL: Celta; BK: Berkshire; DC: Duroc; P: Pietrain; LW: Large White; LD: Landrace; MS: Meishan

### 5.2.4c Distancias Genéticas

En la siguiente figura se observa la matriz de distancia genética  $D_A$  de Nei (Nei et al., 1983) y a continuación el árbol construido a partir de estas distancias, con Neighbour Joining como método de remuestro (Populations-TreeViews) (Figura 12).

	PR	IB	CL	BK	DC	P	LW	LD	MS
PR	0	0.59	0.57	0.65	0.64	0.60	0.67	0.68	0.73
IB		0	0.25	0.34	0.33	0.33	0.47	0.36	0.80
CL			0	0.35	0.36	0.28	0.40	0.30	0.72
BK				0	0.41	0.30	0.48	0.39	0.76
DC					0	0.35	0.46	0.41	0.72
P						0	0.35	0.28	0.62
LW							0	0.31	0.70
LD								0	0.73
MS									0

**Figura 11:** Matriz de distancia genética  $D_A$  (Nei et al., 1983). Referencias: PR: Pampa Rocha, IB: Ibérico, CL: Celta, BK: Berkshire, DC: Duroc, P: Pietrain, LW: Large White, LD: Landrace, MS: Meishan



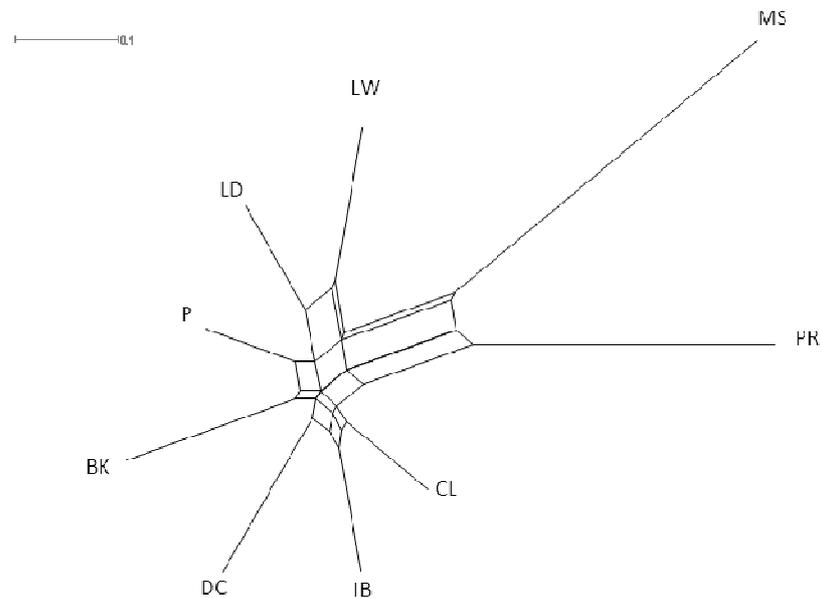
**Figura 12:** Árbol de Distancia Genética  $D_A$ -Neighbour Joining. Referencias: PR: Pampa Rocha, IB: Ibérico, CL: Celta, BK: Berkshire, DC: Duroc, LD: Landrace, LW: Large White, P: Pietrain, MS: Meishan

Al comparar al cerdo Pampa Rocha con las restantes razas, se observa valores elevados y similares de distancia genética, siendo el valor más bajo la dada entre Pampa Rocha y Celta (0,57), seguida de la distancia entre Pampa Rocha y el cerdo ibérico (0,59), y con el Pietrain (0,60). Con las razas Duroc, Berkshire, Large White y Landrace las distancias son de 0.64; 0.65; 0.67 y 0.68 respectivamente, siendo la mayor entre Pampa Rocha y Meishan (0.73). Al observar las razas de referencia, las mayores distancias genéticas se dan siempre con el Pampa Rocha, exceptuando a la raza Meishan, en la cual la mayor diferenciación se da con los ibéricos.

En el árbol los números indican el porcentaje de replicaciones que originan cada rama entre las unidades taxonómicas. Los cerdos Pampa Rocha se agrupan con la raza asiática Meishan con un porcentaje alto de bootstrap de 97%. Este cluster se separa visiblemente del resto de las razas. En otras ramas

se agrupan las razas Landrace y Large White, Pietrain con Berkshire, y las razas españolas con Duroc.

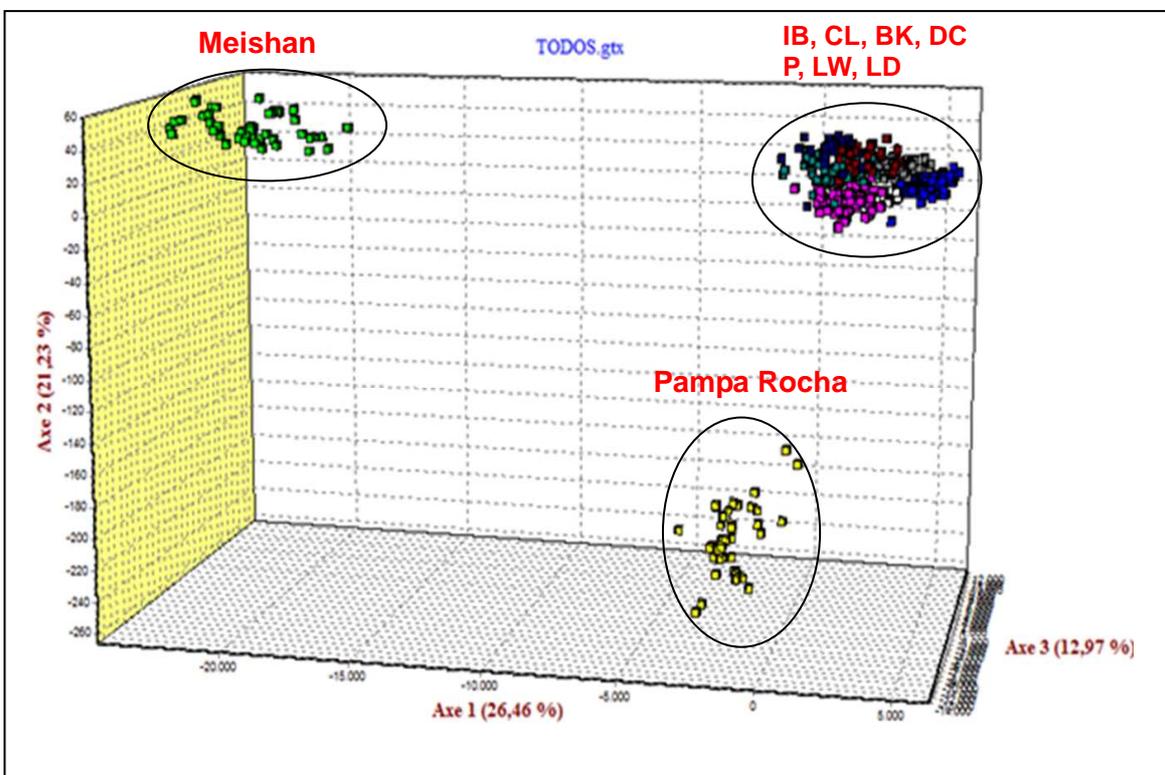
El network (Figura 13), construido también con la matriz de distancia genética  $D_A$ , muestra como los cerdos Pampa Rocha vuelven a agruparse con la raza Meishan, pero existiendo splits que los relacionan con los otros grupos (Landrace con Large White, Pietrain con Berkshire, y Duroc con Celta e Ibérico).



**Figura 13:** Network construido con la distancia  $D_A$  (Nei et al., 1983). Referencias: PR: Pampa Rocha, IB: Ibérico, CL: Celta, BK: Berkshire, DC: Duroc, LD: Landrace, LW: Large White, P: Pietrain, MS: Meishan

### 5.2.4d Análisis Factorial de Correspondencia

En la figura 14 se representa la gráfica resultante del análisis factorial de correspondencia de las poblaciones de cerdos incluidas en el estudio. Se observa un claro agrupamiento y separación de los cerdos Pampa Rocha de las restantes razas. La raza Meishan también aparece separada, mientras que el resto de las poblaciones forman un conglomerado. El primer, segundo y tercer eje representan el 26.46%, 21.23% y 12.97% de la inercia total respectivamente.



**Figura 14:** Representación gráfica tridimensional del análisis factorial de correspondencia. Referencias: IB: Ibérico, CL: Celta, BK: Berkshire, DC: Duroc, LD: Landrace, LW: Large White, P: Pietrain

### 5.3 Caracterización morfométrica

Uno de los objetivos de la presente tesis es comprobar si la morfometría es una herramienta útil para establecer un patrón racial en los cerdos Pampa Rocha, para lo cual se tomaron y analizaron diferentes medidas cuantitativas.

En las siguientes tablas se detalla la media, el desvío estándar, coeficiente de variación, máximos y mínimos para las diferentes medidas tomadas, así como los diferentes índices zoométricos, para hembras y machos.

**Tabla 10:** medidas cuantitativas en hembras

	Media	DE	CV(%)	Máximo	Mínimo
Peso	148,6	37,69	25,36%	226	95
Long. Cabeza	35,6	3,33	9,68%	41,5	26,5
Ancho cabeza	20,3	3,34	16,50%	29	14,5
Ancho interorbital	16,92	1,09	6,45%	18,5	14,5
Long. Hocico	19,27	3,19	16,59%	29	14
Ancho hocico	11,67	1,35	11,56%	13,5	9
Long. Oreja	25,82	4,56	17,66%	38,5	19,5
Ancho oreja	13,82	1,72	12,49%	17	11,5
Long. Grupa	32	5,68	17,75%	45	25
Ancho grupa	26,97	2,98	11,06%	33	22,5
Perímetro caña	19,82	1,79	9,05%	24	17,5
Perímetro torácico	118,93	7,8	6,56%	134	111
Alzada a la cruz	74,97	5,18	6,92%	89,5	67
Alzada a la grupa	87,77	4,92	5,61%	97,5	80
Alzada nac. Cola	73,2	4,76	6,50%	84	65,5
LC2	102,02	6,95	6,82%	121	87

DE: desvío estándar

LC2: diámetro longitudinal

**Tabla 11:** medidas cuantitativas en machos

	Media	DE	CV (%)	Máximo	Mínimo
Peso	173,66	15,41	8,88%	191	161,5
Long. cabeza	35,16	5	14,24%	39	29,5
Ancho cabeza	18,83	1,04	5,53%	20	18
Ancho interorbital	17,5	0,86	4,95%	18,5	17
Long. Hocico	20,83	3,61	17,36%	25	18,5
Ancho hocico	17,33	6,65	38,41%	25	13
Long. oreja	27,33	7,5	27,46%	35	20
Ancho oreja	15,5	1,32	8,53%	17	14,5
Long. Grupa	29,66	1,6	5,42%	31,5	28,5
Ancho grupa	25,66	3,05	11,90%	29	23
Perímetro caña	22,66	3,78	16,70%	27	20

Perímetro torácico	132,33	2,51	1,90%	135	130
Alzada a la cruz	82,33	4,85	5,90%	86,5	77
Alzada a la grupa	93,16	5,75	6,17%	99	87,5
Alzada nac. Cola	80,5	9,98	12,41%	92	74
LC2	99	9,16	9,26%	109	91

**Tabla 12:** índices zoométricos en hembras

	Media	DE	CV(%)	Máximo	Mínimo
ICF	57,56	11,19	19,45%	82,85	41,42
IF	54,22	8,22	15,16%	84,85	44,28
IPV	86,92	19,1	22%	132	61,5
IPD	73,67	5,28	7,17%	84,43	59,5
Icom	50,45	13,76	27,29%	72,77	34,29
ICCaña	13,34	4,75	35,67%	19,3	9,77
ICOR	86,73	5,09	5,87%	93,3	76,66
IMTor	16,86	1,46	8,66%	20,51	14,5

**Tabla 13:** índices zoométricos en machos

	Media	DE	CV (%)	Máximo	Mínimo
ICF	54,65	11,54	21,13%	67,79	46,15
IF	59,38	6,99	11,78%	64,1	51,35
IPV	86,32	5,68	6,58%	92,06	80,7
Pp0IPD	84,66	4,48	5,30%	89,17	80,2
Icom	47,57	4,48	9,42%	51,33	43,71
Iccaña	13,13	2,59	19,77%	16,02	10,99
ICOR	74,76	5,9	7,89%	80,74	68,93
IMTor	17,15	3,13	18,26%	20,76	15,55

ICF (Índice cefálico), IF (Índice facial), IPV (Índice pelviano), IPD (Índice de proporcionalidad), ICom (Índice de compacidad), ICCaña (Índice de carga de caña), Icor (Índice corporal), IMTor (Índice Metacarpo-torácico)

### 5.3.1 Estudio comparativo

En la siguiente tabla se observa los datos comparativos (Análisis de varianza) entre el Pampa Rocha con 5 variables reconocidas del cerdo Ibérico: Entrepelado, Manchado de Jabugo, Lampiño, Retinto y Torbiscal (Delgado et al., 1998). Se incluyeron algunas de las medidas cuantitativas calculadas anteriormente (Tabla 14). Este cálculo se llevó a cabo incluyendo 15 hembras Pampa Rocha mayores a los 2 años de edad. Los efectos son significativos cuando  $p < 0.05$ , por lo cual todas las variables resultaron con diferencias significativas (Tabla 14).

**Tabla 14:** Análisis de varianza entre Pampa Rocha y cinco variedades de cerdo Ibérico.

	SC	GL	CM	SC	GL	CM	F	p
	Efecto	Efecto	Efecto	Error	Error	Error		
Peso	23097,2	5	4619,4	251977,4	317	794,8	5,8	0,00038
Ancho oreja	148,3	5	29,6	508,6	319	1,5	18,6	0
Longitud cabeza	500,5	5	100,1	2482	316	7,8	12,7	0
Largo oreja	844,2	5	168,8	1388,3	318	4,3	38,6	0
Alzada a la cruz	304,2	5	60,8	5384,1	318	16,9	3,5	0,003549
Alzada a la grupa	505,7	5	101,1	2482,3	317	7,8	12,9	0
Alzada nac. Cola	1895,6	5	379,1	6111,8	317	19,2	19,6	0
Longitud grupa	590,6	5	118,1	4133,6	315	13,1	9,0	0
Longitud jamón	1924,0	5	384,8	4880,7	319	15,3	25,1	0
Longitud paleta	2998,9	5	599,7	2486,3	318	7,8	76,7	0
Perímetro de la caña	232,3	5	46,4	217,6	316	0,6	67,5	0
Índice cefálico	2590,3	5	518,0	7163,7	315	22,7	22,7	0
Índice facial	3666,9	5	733,3	8826,2	309	28,5	25,6	0
Índice pelviano	5489,8	5	1097,9	25277,4	309	81,8	13,4	0
Índice compacidad	4300,0	5	860,0	33730,7	316	106,7	8,0	0
Índice carga de caña	89,0	5	17,8	1866,2	315	5,9	3,0	0,011481

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrado medio

## **6. Discusión**

Los cerdos Pampa Rocha constituyen uno de los recursos porcinos de nuestro País. En la presente tesis se buscó estudiar la diversidad genética de este recurso, el cual se encuentra bien caracterizado a nivel productivo, pero donde continúan siendo escasos los estudios dirigidos hacia la caracterización genética y morfométrica cuantitativa. Se plantean hipótesis de trabajo que refieren a la variabilidad presente en los cerdos Pampa Rocha, siendo el principal objetivo la realización de una caracterización genética y morfométrica de este recurso. Para cumplir con este objetivo se plantearon tres tipos diferentes y complementarios de caracterización:

- 1) el estudio de polimorfismos en genes mayores asociados a características de interés productivo y reproductivo (CRC1, FUT1 y ESR).
- 2) el estudio de la variabilidad genética mediante marcadores microsatélites, los cuales son apropiados para este objetivo, llevando a cabo un análisis a nivel intrapoblacional, y un análisis comparativo con diferentes poblaciones de cerdos.
- 3) el estudio de variables cuantitativas con el objetivo de establecer un patrón racial utilizando como herramienta a la morfometría.

### **6.1 Análisis de polimorfismos en genes mayores**

#### **6.1.1 CRC1**

De la totalidad de los animales estudiados (N=80), el 38.75 % presento genotipo NN, el 52.5 % genotipo Nn y 8.75 % nn. De acuerdo a la distribución de razas para cada genotipo (Tabla 5), la mayor presencia del alelo mutante n causante del SEP ocurre en las razas Pietrain, Landrace e híbridos. En Pietrain la frecuencia de la mutación detectada previamente fue de 97 %, siendo ésta la raza más afectada por ésta mutación, 35 % en Landrace y 16 % en híbridos. Para las razas Large White y Duroc las frecuencias previas son de 19 y 15% respectivamente (Riojas-Valdés et al., 2005). A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis no se puede relacionar la prevalencia de la

mutación con las diferentes razas debido al bajo número de individuos analizados, principalmente para las razas Large White y Duroc.

Los últimos estudios realizados en híbridos comerciales han encontrado frecuencias de 62 % de NN, 26 % de Nn y 12 % de nn (Castro Molina et al., 2011).

Cabe destacar la identificación por primera vez del alelo mutante en dos animales portadores en el recurso local Pampa Rocha. En estudios anteriores realizados para este recurso zoogenético no se habían detectado individuos portadores o enfermos (Montenegro et al., 2010). La presencia de la mutación podría deberse a la participación de las razas Berkshire y Poland China (Kelly et al., 2004) en el origen de este recurso. En la raza Poland China la prevalencia de la mutación es de un 80% (Bonelli & Schifferli, 2001). Al tratarse de cerdos criollos, se supone que ha sido mínima la presión de selección artificial, sin embargo pueden considerarse cruzamientos con individuos de la raza Duroc, en la cual se ha registrado una frecuencia de 15%. Para poder extraer conclusiones es deseable aumentar el número de individuos analizados, ya que se trata de un recurso zoogenético local, sobre el cual se está llevando a cabo una caracterización genética, y que es empleado por pequeños y medianos productores.

En otras razas criollas americanas, como es el caso de la raza Zungo colombiana no se han detectado animales portadores o enfermos, aunque si se encontró la mutación en la raza San Pedreño y en cruza comerciales con el rasgo de sindactilia (Casco de Mula) (Hernández et al., 2008).

Esta patología hereditaria afecta a la industria porcina (Bonelli & Schifferli, 2001). Por otro lado existiría la tendencia a producir animales con menos grasa y más músculo llevando a que los productores seleccionen animales heterocigotos (efecto gen asociado a mayor rendimiento de la canal y menos grasa) (Puentes Martínez & Pérez Ede, 2007). Sin embargo, el beneficio de la selección realizada a favor de los portadores aún se discute. Esta selección posibilitó el aumento de la frecuencia, así como su difusión a través de reproductores seleccionados para esta característica. En nuestro País no se

han llevado a cabo estudios para estimar el impacto económico de esta enfermedad hereditaria.

La identificación de la mutación por la técnica de PCR-RFLP, ya estandarizada, permitiría detectar de forma fácil y rápida a individuos enfermos y portadores, con la finalidad de eliminarlos como reproductores, pudiendo asesorar en cruzamientos dirigidos aplicados a mejorar la producción porcina.

Mediante el uso de marcadores genéticos moleculares se detectó por primera vez la presencia de la mutación puntual causante del Síndrome de Estrés Porcino en el recurso zoogenético local Pampa Rocha.

La optimización de las técnicas empleadas (PCR-RFLP), podría ser utilizada como metodología para el diagnóstico de esta enfermedad hereditaria contribuyendo a la mejora genética en producción porcina.

### **6.1.2 FUT1**

Del total de los animales analizados (N=89), el 12,3 % presento genotipo homocigota AA; un 56,2 % heterocigotas AG y 31,4 % homocigotas GG (Tabla 6). Las frecuencias alélicas son de 40% para el alelo A y 60% para el G.

Hernández (2006) reportaron frecuencias de 10%, 61% y 38% para los genotipos AA, AG y GG respectivamente en razas Yorkshire y Landrace, encontrando mayor presencia del alelo G y genotipo GG en cerdos con altos niveles de productividad.

En una investigación realizada por Lemus Flores et al (2009), encontraron frecuencias del alelo A de 33 % y G de 67 % en Yorkshire, 36 % de A y 64 % de G en el Pelón Mexicano, y de 55 % del alelo A y 45 % alelo B en el Cuino mexicano. Estos autores hallaron una mayor presencia del alelo G y genotipo GG en las razas Yorkshire y Pelón mexicano.

Luo et al., (2010) encontró frecuencias alélicas de 28 % y 72 % para A y G respectivamente en cerdos Large White; 20 y 80 % para A y G en Landrace, y de 12 y 88 % para A y G respectivamente en la raza Songliao Black. En estas

tres razas fue superior la frecuencia del alelo G que confiere susceptibilidad a infecciones de *E. coli*, pero mayores niveles productivos.

Caddens et al., (2008) encontró frecuencias alélicas de 21 % para el alelo A y 79 % para el B, con frecuencias genotípicas de 4,6 % para AA; 32,8 % AG y 62,6 % GG. También realizaron estudios de desequilibrio de ligamiento entre el alelo A de FUT1 que confiere resistencia a *E. coli* y el alelo n del gen CRC1 que resulta en animales susceptibles para el SEP, no encontrando correlación entre los mismos. Sin embargo, Meijerink et al., (1997) encontraron una asociación del 97 % entre ambos alelos (A y n).

En las razas Duroc y Landrace, Huang et al. (2008), reportaron frecuencias del alelo A de 26 % y 21 % respectivamente, con frecuencias genotípicas AA de 6% para ambas razas. Shi (2003) también encontró bajas frecuencias genotípicas AA en Duroc (10 %) y Landrace (3 %). En esta última raza halló una frecuencia de heterocigotos AG de 74 %.

Los resultados obtenidos en este estudio están en concordancia con lo encontrado en la bibliografía, donde se observa en general una mayor presencia del alelo G y del genotipo AG, con bajas frecuencias del genotipo AA, que confiere resistencia a *E.coli*. La mayor frecuencia de heterocigotas, proporciona por un lado susceptibilidad a *E. coli* (genotipos AG y GG) y por otro lado un efecto beneficioso respecto al número de lechones nacidos vivos, totales y destetados, características que son superiores para el genotipo GG en comparación al AA.

Se detectó una mayor frecuencia del alelo G y del genotipo AG. Sería relevante poder confirmar el efecto de este polimorfismo tanto en la resistencia-susceptibilidad a infecciones por *E. coli*, como en características reproductivas. Vemos en este caso, al igual que para la mutación causante del SEP, como una variante del polimorfismo resulta favorable para una característica mientras la otra variante favorece una segunda característica, siendo ambas de impacto en la industria porcina. Al momento de seleccionar es necesario evaluar el posible impacto de la toma de decisiones en uno u otro sentido.

Para el segundo polimorfismo detectado, se calcularon frecuencias de 47,2 % para el genotipo CC (mayor número de individuos Pampa Rocha, Pietrain e híbridos), 47,2 % heterocigotas CT (principalmente Pampa Rocha, híbridos y Landrace) y 5,6 % TT (Duroc, híbridos y Landrace), con frecuencias de 70 % para el alelo C y 30 % del alelo T. En este caso habría que continuar con el análisis con la finalidad de determinar si esta relacionado con el polimorfismo A G, encontrándose a menos de 80 pb del mismo. Cabe preguntarse si esta variación tendría algún efecto en las características atribuidas al primer polimorfismo.

### **6.1.3 ESR**

En el presente estudio se encontró un 100 % de individuos AA. Hernández-López et al., (2006) realizaron una comparación entre animales con niveles productivos altos y bajos en las razas Yorkshire y Landrace. Hallaron una prevalencia del alelo B y genotipo AB en el nivel alto de producción, con frecuencias del 27 % para el alelo B y de 73 % para el A. En el nivel bajo de producción las frecuencias fueron de 18 % para B y 82 % para el alelo A. En la raza Yorkshire fue en la única en la que encontraron individuos homocigotas BB con una frecuencia del 10 %. En el Pelón y Cuino mexicano el alelo B se presentó en individuos heterocigotas.

Lemus Flores et al., (2009) hallaron frecuencias alélicas en el Pelón mexicano de 74% para A y 26% para B y en el Cuino mexicano de 84% del A y de 16% del alelo B. En la raza Yorkshire reportaron frecuencias de 62% de A y 38% de B. Esta última raza es muy prolífica con lo cual estos autores explican la prevalencia del alelo B y genotipo AB en dicha raza.

Por otro lado, Linville et al., (2001) reportó frecuencias muy bajas del 2 % para el alelo B en Landrace y Large White.

En las razas Yorkshire y Landrace, Ramos et al., (2008) encontraron frecuencias alélicas de 86 % para A y 14 % para B, con frecuencias genotípicas de 72 % para AA y 28 % para el heterocigota AB, sin encontrar genotipos homocigotas BB.

Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con lo reportado por los mencionados autores, en donde se observan generalmente

frecuencias muy bajas del alelo B. Para la detección de este alelo, es necesario que ocurran dos mutaciones  $C \rightarrow A$  y  $C \rightarrow T$ , lo cual genera el sitio de corte de la enzima *PvuII* (Fig. 7). No se ha reportado cual de estas dos mutaciones sería la que produciría el efecto favorable en el aumento del tamaño de camada.

Algunos autores sostienen que dicho alelo se encuentra en unas pocas razas selectas de cerdos y que el uso de este polimorfismo para seleccionar es un claro ejemplo del beneficio económico que puede obtenerse mediante selección asistida por marcadores en cerdos (Short et al., 1997).

## **6.2 Análisis mediante microsatélites**

### **6.2.1 Número de alelos, PIC y heterocigosidad.**

Todos los loci estudiados resultaron polimórficos, siendo S0386 y S0002 los microsatélites con el menor número de alelos (2), mientras los S0068 y SW240 los marcadores con mayor número de alelos (10).

En cerdos ibéricos se encontraron entre 4 y 20 alelos; presentando los microsatélites S0068 y SW240 un elevado número de variantes alélicas, pero fueron los marcadores CGA1 y S0005 los que mostraron más variantes (Martínez, 2000). En el cerdo Criollo Cubano el número de alelos varió desde 4 a 12, coincidiendo en este caso en que el S0068 fue el marcador con mayor número de alelos (Pérez-Pineda, 2005-Tesis Doctoral). En el caso de los criollos del Nordeste argentino, la cantidad de alelos estuvo entre 2 y 17, siendo el marcador S0068, junto con el S0005, el microsatélite con mayor número de variantes.

El número medio de alelos fue de 5.72. Este valor es menor al encontrado en el Criollo Cubano (8,2), en el Pelón Mexicano (7.07) y en los criollos del Nordeste argentino (9.25) (Pérez-Pineda, 2005; Canul et al., 2003; Revidati, 2008), pero mayor a los hallados en las variedades de cerdo Ibérico (exceptuando la variedad Negro Entrepelado), las razas Duroc Jersey y Chato Murciano (Martínez, 2000). Asimismo es mayor a los promedios de entre 2.7 y 4.5 en los que fluctúan las poblaciones porcinas europeas (San Cristobal et al., 2003).

Los valores de PIC oscilan entre 0.030 para S0386 y 0.819 para CGA1. Diecisiete de los 25 marcadores resultaron altamente informativos (PIC >0.5), 7 medianamente informativos (PIC entre 0.25 y 0.5) y uno poco informativo: S0386 (PIC <0.25). Los microsátélites que resultaron más informativos en este estudio son: GCA1, SW936, S0068, S0178, S0005, con valores de PIC y heterocigosidad entre 0,75 y 0,85, siendo de esta manera muy útiles para estudios de diversidad genética.

En general existió una relación directa entre el número de alelos y el PIC, al igual que lo reportado por otros autores en otras razas (Martínez, 2000; Pérez Pineda 2005). Los marcadores con mayor PIC presentan mayor número de alelos (CGA1, SW936, S0228, S0178, S0005), sin embargo los marcadores S0068 y SW240, presentan valores de PIC más bajos que otros marcadores con menor número de variantes. Aquellos marcadores con menor PIC si son aquellos en los que se detectaron menor número de alelos (S0386 y S0002). El PIC refleja el polimorfismo detectado, sin embargo depende del número de alelos y de sus frecuencias, por lo cual la información que aporta este parámetro no es suficiente para basar en el mismo la elección de un marcador u otro (Moazami-Goudarzi et al., 1994).

En el presente estudio la heterocigosidad media esperada de 0.603 y la observada de 0.583, indican un alto grado de variabilidad, ya que esto se considera cuando los valores superan el 0.5. Este valor es similar a los encontrados en estudios previos llevados a cabo en cerdos criollos de nuestro País, los cuales también revelaron una gran variabilidad genética, con una He de 0,653 en 10 cerdos Pampa Rocha (Kelly et al., 2004), y de 0.590 en cerdos mamellados (Castro et al., 2007). La heterocigosidad hallada en el presente análisis también se asemeja a las cifras encontradas en el Criollo Cubano (He=0,653), el Pelón Mexicano (He=0,635) y los criollos argentinos (He=0,682) (Pérez Pineda, 2005; Canul et al., 2003; Revidatti, 2009). En las razas Monteiro, Moura y Piau de Brasil se reportaron He de 0,573; 0,569 y 0,661 respectivamente (Sollero et al., 2008), siendo la He encontrada en los Pampa Rocha mayor a las dos primers razas e inferior a la raza Piau. En cerdos ibéricos las He oscilan entre 0,439 para el Manchado de Jabugo y 0,567 para el

Entrepelado (Martínez A., 2000). En el Negro Canario se reportó una He de 0,475 (Martínez et al., 2007). En razas porcinas europeas este valor varía entre 0.43 y 0.68 (Vicente et al., 2008; Sancristobál et al., 2006).

La heterocigosidad, junto con el PIC, reflejan el polimorfismo detectado para cada marcador en la población estudiada y su valor también depende del número de alelos y de sus frecuencias. Existe una relación directa entre el PIC y la heterocigosidad, aumentando un parámetro cuando lo hace el otro. En esta muestra, si bien se puede afirmar que a mayor número de alelos, mayor es el PIC y la heterocigosidad, no siempre se cumple esto, ya que los valores de PIC y heterocigosidades más altos se observan en los marcadores con 7, 8 y 9 alelos, y no en los marcadores S0068 y SW240.

A partir de los datos del número de alelos, PIC (la mayoría de los microsatélites son informativos) y heterocigosidad, puede concluirse que la variabilidad de los cerdos Pampa Rocha es elevada, y que el panel de microsatélites, el cual ya ha sido probado en numerosas razas, ha sido apropiado para estudiar la variabilidad genética en este recurso zoogenético.

### **6.2.2 $F_{IS}$ y Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg**

Los valores presentados para el parámetro  $F_{IS}$  en la muestra de Pampa Rocha (-0.115 a 0.401) son mayores a los encontrados en los criollos del NE argentino (entre -0,025 y 0,302) y menores al valor máximo del cerdo Ibérico (entre -0,0818 y 0,6208). En el Criollo Cubano los valores fueron entre 0,026 y 0,045 (Revidatti, 2009; Martínez, 2000; Pérez Pineda, 2005), mientras que en razas porcinas europeas se han reportado valores de entre 0,005 y 0,023 (Sancristóbal et al., 2006). En las razas Monteiro, Moura y Piau de Brasil, estos valores fueron de 0,097; -0,055 y 0,126 respectivamente (Sollero et al., 2008).

El  $F_{IS}$  es un parámetro que estima la variabilidad dentro de una población y es una medida de la reducción en la heterocigosidad debida a los apareamientos no aleatorios en la población, indicando así el nivel de endogamia. Algunos de los factores que pueden contribuir a una menor heterocigosidad que la esperada son la consanguinidad, subdivisión de la población (efecto Wahlund),

presencia de alelos nulos o la falta de neutralidad relativa a la selección, con selección a favor de los homocigotos (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

En el caso de los cerdos Pampa Rocha, población en la cual se aplican planes de cruzamientos, no se puede descartar la selección, sin embargo, al tratarse de marcadores microsátelites, los cuales son neutros para la selección, se podría descartar este factor. El nivel de endogamia es bajo, pero igualmente se observa exceso de homocigotos.

Respecto a la prueba de equilibrio, el 95.8 % de los marcadores estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg, encontrándose únicamente el marcador SW72 fuera del equilibrio ( $p < 0.01$ ). El alto porcentaje de loci en equilibrio supone que las frecuencias alélicas de los individuos analizados se agrupan conformando una población homogénea. Uno de los factores que contribuyen en el desequilibrio es la selección, o en el caso de poblaciones cerradas el alto grado de consanguinidad. En el caso de los cerdos criollos, como los Pampa Rocha, si bien se supone que ha sido poca la selección artificial, al ser animales domésticos no puede descartarse este factor, menos aún al considerar que se trata de una población pequeña y en riesgo de extinción sobre los cuales se aplican apareamientos dirigidos. De acuerdo al resultado obtenido para el  $F_{IS}$  multilocus, indicando un bajo nivel de consanguinidad, este factor no sería una de las posibles causas para explicar el desequilibrio Hardy Weinberg, aunque si lo sería la selección. Pero igualmente que para el caso del parámetro  $F_{IS}$ , al tratarse de marcadores microsátelites, los cuales son neutros para la selección, este factor puede ser descartado.

En el presente estudio el panel de microsátelites utilizado ha sido útil y apropiado para alcanzar los objetivos y testear las hipótesis. Estudiar la variabilidad genética y establecer las relaciones genéticas del cerdo Pampa Rocha con otras poblaciones de referencia.

Los diferentes valores obtenidos para cuantificar la variabilidad genética, tales como el alto porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad esperada y observada, señalan una elevada variabilidad genética en la población de cerdos Pampa Rocha muestreada.

### **6.2.3 Comparación genética de los Pampa Rocha con otras poblaciones porcinas**

Para complementar la caracterización de los cerdos Pampa Rocha, se realiza una comparación de los resultados obtenidos con los marcadores microsatélites, con otras poblaciones comerciales: Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Large White y Meishan. Las razas españolas se incluyeron debido al origen de los recursos locales americanos a partir de estas razas, introducidas durante la conquista del continente americano. Las restantes poblaciones se incluyeron por ser razas utilizadas comúnmente a nivel comercial.

#### **6.2.3a Análisis molecular de la varianza (AMOVA)**

Los valores de  $F_{ST}$ , índice que indica el grado de diferenciación genética entre las poblaciones consideradas, fueron muy altos y similares cuando se consideran las diferentes estructuras empleadas en este análisis, con un rango entre 31,3 y 38,4%. Este valor aumenta cuando las frecuencias alélicas divergen, pero es difícil cuantificar la significación de la divergencia (Weir 1996).

Al contrastar al Pampa Rocha con el resto de las razas (Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Large White, Landrace y Meishan, estructura 5) se obtuvo un porcentaje de variación entre grupos de 7.18% con un  $F_{ST}$  de 0.333. Cuando se elimina la raza asiática Meishan de esta comparación, aumenta el porcentaje de variación al 11.81%, con un  $F_{ST}$  de 0.327 (Estructura 6). Al comparar al Pampa Rocha con las razas comerciales europeas, eliminando las españolas, también aumenta la variación entre grupos al 9.51%, con un  $F_{ST}$  de 0.333 (Estructura 3).

El mayor porcentaje de variación se registro al comparar el Pampa Rocha con las razas españolas (Ibérico y Celta), con un porcentaje de variación de 20.44 % y un  $F_{ST}$  de 0.313, indicando un grado alto de diferenciación genética (Estructura 2). Al agrupar al Pampa Rocha con las razas europeas, y

compararlo ese grupo con Meishan, el porcentaje de variación alcanza un 17.19% y un  $F_{ST}$  de 0.384 (Estructura 4).

En suma, se observa el valor más bajo de variación entre grupos cuando se incluye a la raza Meishan, lo cual indicaría cierta proximidad entre los cerdos Pampa Rocha y esta raza asiática.

A partir del AMOVA puede inferirse un mayor relacionamiento del Pampa Rocha con la raza china Meishan, ya que siempre que ésta raza es eliminada de la comparación, se produjo un incremento en los porcentajes de variación entre grupos. A su vez, no se demuestra la influencia de las razas españolas en los Pampa Rocha, lo cual cabría esperar debido al origen a partir de estas razas. No se puede descartar esta influencia, pero con los resultados obtenidos en el presente trabajo no es posible probarla. Una posible explicación sería la acumulación de diferencias como consecuencia principalmente de la deriva, junto con los cruzamientos posteriores con otras razas comerciales, que acercan más al Pampa Rocha a estas líneas.

En estudios entre variedades del cerdo ibérico, se obtuvo un  $\theta$  (análogo  $F_{ST}$ ) del 13%, mientras que el valor medio encontrado en razas porcinas europeas fue de 27 % (Laval et al., 2000) y en razas chinas de 18 % (Fan et al., 2002). Se han reportado menores medidas de diferenciación genética entre razas criollas de una misma región, tales como los Criollos del NEA de la Zona Seca y los de la Zona Húmeda ( $F_{ST}$  4.4%), y entre los Criollos Cubanos ( $F_{ST}$  0.12%) (Revidatti, 2009; Pérez Pineda, 2005). En comparación con estos valores, los cerdos Pampa Rocha muestran una mayor diferenciación con las razas de referencia incluidas en este estudio, pero teniendo en cuenta que no se han incluido otras poblaciones criollas.

A partir del AMOVA y los valores  $F_{ST}$  ( $>0.25$ ), se concluye que existe una elevada diferenciación genética entre los cerdos Pampa Rocha y las razas Ibérica, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Large White y Meishan.

### **6.2.3b Asignación de individuos a clusters**

El programa Structure v2.3.4 (Pritchard et al., 2000), asigna de forma individual a los individuos en clusters en función de su parecido genético, suponiendo que las frecuencias génicas están correlacionadas, que las poblaciones están mezcladas y que se encuentran en equilibrio Hardy Weinberg. Al observar la representación gráfica (Fig. 10), si la barra vertical es de un sólo color el 100 % del genoma de ese individuo pertenece a ese cluster, mientras que si tiene más de un color significa que comparte el genoma con otras poblaciones ancestrales.

Se asumieron de K=2 a K=9. En K=2, los individuos Pampa Rocha se agrupan junto con la raza asiática Meishan (color amarillo), separándose en K=6. De esta manera, si bien se agrupan al principio, lo cual indica en cierto modo ascendencia, los Pampa Rocha terminan diferenciándose completamente de todas las razas.

La separación en un claro cluster individual señala que los Pampa Rocha constituyen una entidad genética definida. El uso del programa Structure, clarifica aún más la diferenciación genética de los Pampa Rocha con las restantes poblaciones.

### **6.2.3c Distancias Genéticas**

Al comparar las distancias genéticas entre el Pampa Rocha y las restantes razas se observan valores altos. La distancia estimada más baja se da con la raza Celta (0.57), mientras que la raza más distante ha sido la Meishan (0.73). Sin embargo, en el árbol construido a partir de esta distancia, los cerdos Pampa Rocha se agrupan con la raza asiática Meishan con un porcentaje alto de bootstrap de 97%, cluster que se separa visiblemente del resto de las razas. Estas dos agrupaciones se encuentran separadas a nivel de las ramas del árbol. A partir del Network (Figura 13) también puede verse como los cerdos Pampa Rocha se agrupan con la raza Meishan. Igualmente se observan splits que relacionan a los Pampa Rocha con los otros grupos (Landrace con Large White, Pietrain con Berkshire, y Duroc con Celta e Ibérico). De este modo, en

ambas representaciones gráficas, la distribución de las poblaciones es similar, con mayores longitudes de las ramas en el árbol y de los bordes en el network para los cerdos Pampa Rocha y Meishan, ratificando los datos obtenidos en el cálculo de la distancia genética.

El cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones da una estimación relativa del tiempo que ha pasado desde que las poblaciones se diferenciaron. Estimaciones pequeñas de distancias genéticas pueden estar indicando subestructura y existencia de flujo génico entre las poblaciones, o también un aislamiento completo de las mismas con separación hace poco tiempo (Martínez, 2008-Tesis Doctoral).

En el caso de las razas españolas, de las cuales se asume una influencia importante en los orígenes de todas las poblaciones criollas, el tiempo de separación ya es lo suficientemente grande como para acumular diferencias genéticas, principalmente por deriva, lo cual podría estar explicando en parte la separación que se observa en los diferentes árboles. En el caso de las razas comerciales se supone que ha sido menor la influencia, a excepción de las razas Berkshire y Meishan, en el primer caso no se observa agrupamiento con los Pampa Rocha mientras que con la raza asiática esto si se visualiza en todos los análisis realizados, pero con la contradicción de que la distancia genética resultó mayor entre ambas. Sin embargo, cuando se observan las distancias genéticas para la raza Meishan con el resto de las razas, la mayor distancia no se da con los Pampa Rocha, lo cual podría estar explicando en parte el agrupamiento entre ambas razas. Por otro lado, como ya se mencionó, en la literatura se hace referencia a un inconveniente que presenta la reconstrucción de árboles filogenéticos, y es que presupone que durante la evolución los linajes pueden divergir, pero nunca ser resultado de cruces entre linajes. Este supuesto generalmente no se aplica en especies domésticas, ya que frecuentemente las nuevas razas se originan por cruce entre dos o más razas ancestrales.

### 6.2.3d Análisis Factorial de Correspondencia

En el análisis factorial de correspondencia se confirma las diferencias genéticas manifestadas en el análisis de AMOVA, distancia genética y asignación individual. Se observa un claro agrupamiento y separación de los cerdos Pampa Rocha de las restantes razas. La raza Meishan también aparece separada, mientras que el resto de las poblaciones forman una agrupación.

Mediante los análisis efectuados para ver las relaciones de los Pampa Rocha con otras razas, vemos que existe concordancia entre todos los datos obtenidos. Se observa un agrupamiento inicial con la raza asiática Meishan, por lo cual existiría influencia de líneas asiáticas. Esto concuerda con los estudios de Kelly et al., (2004) quienes determinaron que el origen materno de los Pampa Rocha podría ser europeo y asiático ya que identificaron el haplotipo más frecuente en cerdos salvajes y domésticos europeos y el haplotipo característico de las razas asiáticas como el Jabalí de Japón y la raza Meishan. Esto se ha descrito en las razas Large White, Landrace, Berkshire, Duroc y en el cerdo Negro de Islas Canarias, lo que indicaría la participación de razas asiáticas en su formación. Estos autores concluyen que la procedencia del haplotipo asiático en los cerdos Pampa Rocha podría provenir de las cruzas con Poland China o del cerdo Negro de las Islas Canarias (introducido durante la colonización ibérica) y que el origen más probable del Pampa Rocha serían las razas europeas, algunas de las cuales estarían introgressadas con razas chinas, según los haplotipos del ADN mitocondrial.

Al comparar los datos de asignación individual, los árboles elaborados a partir de la distancia genética y el gráfico del análisis factorial de correspondencia, vemos que presentan una alta diferenciación genética y conforman un grupo bien definido y diferenciado.

Ninguno de los análisis realizados relaciona a los cerdos Pampa Rocha con los cerdos ibéricos, de los cuales se supone que existe influencia debido al proceso histórico que han experimentado las razas criollas. Esto puede deberse al tiempo de separación entre estos recursos, en donde la deriva genética puede haber influido en la diferenciación. A la vez habría que

considerar el flujo genético con otras razas, como las asiáticas. Si bien no puede descartarse un origen a partir de razas ibéricas, no habría existido posterior influencia en la formación de los cerdos Pampa Rocha. Por otro lado hay que considerar aportes posteriores de otras razas, siendo la asiática Meishan la que aparece más cercana en los análisis realizados.

En el caso de otros recursos porcinos iberoamericanos, se han obtenido resultados similares, como es el caso del criollo argentino, donde Revidatti (2009), tampoco encontró relación con ninguna de las variedades del Cerdo Ibérico. Sin embargo, en el Criollo Cubano si se demostró proximidad con el grupo genético Ibérico (Pérez-Pineda, 2005).

### **6.3 Caracterización morfométrica**

Un tipo de variable incluidos en una caracterización morfométrica son las cuantitativas, las cuales se expresan de forma continua y permiten conocer el valor de determinadas regiones corporales (principalmente alzadas, longitudes, diámetros, anchos y perímetros) (Barba, 2004). Los parámetros zoométricos son el primer factor a considerar para la descripción y análisis discriminatorio de las poblaciones a estudiar, así como para el reconocimiento e inclusión de individuos y determinación de sus aptitudes. Las características cuantitativas proporcionan una descripción más objetiva de la población estudiada, basada en valores numéricos (Sanz et al., 2004).

En América, los recursos criollos se encuentran en proceso de definición racial y caracterización, así como la discriminación entre subpoblaciones y la cuantificación de la erosión genética producida por los cruzamientos indiscriminados con razas exóticas, son motivo de estudio (Revidatti, 2009-Tesis Doctoral).

En la presente tesis se observa que para la mayoría de las variables los valores promedios en machos son mayores a los hallados en hembras (peso, longitud y ancho del hocico, longitud y ancho de la oreja, alzada a la cruz, grupa y nacimiento de la cola, perímetro de la caña y longitud corporal). Otras variables presentan valores promedios muy similares, en algunos casos mayores en machos (ancho interorbital), en otros ligeramente superiores en hembras

(longitud de la cabeza). Algunas variables son superiores en hembras (ancho de la cabeza, ancho y largo de la grupa, y diámetro longitudinal). Las cifras mayores registradas en machos, podrían ser un indicio de dimorfismo sexual, pero debido al bajo número de machos muestrados, esto no se puede afirmar, siendo deseable aumentar la cantidad de animales muestreados. Generalmente el cálculo de los diferentes estadísticos se realiza por separado por considerar al sexo como una causa de variabilidad.

### **6.3.1 Peso**

El peso vivo es la medida con mayor influencia ambiental. El peso adulto se alcanza a los 3 años de vida y los factores más importantes que inciden en el mismo son la alimentación, el sexo y la raza. Es indicativo del crecimiento en los animales jóvenes, del estado nutricional en los adultos y del grado de cebamiento en los animales de engorde.

En los Pampa Rocha se obtuvieron promedios de 148.6 y 173.66 Kg en hembras y machos respectivamente. En hembras el porcentaje de variación fue alto (25.35%). Anteriormente se había reportado un CV del 21,9 % para esta variable (Vadell, 2000). En comparación con otros recursos porcinos de nuestro País, se reportaron CV elevados para todas las medidas en el cerdo Mamellado (Macedo et al., 2008).

Estos promedios son superiores a los descritos en los criollos argentinos, con valores de 60.47 Kg (Revidatti et al., 2005). En el cerdo Pelón mexicano también se determinaron promedios inferiores, con medias de 57,35 y 71,31 en hembras y machos respectivamente (Pérez et al., 2005). En este último caso se percibe una diferencia entre hembras y machos de 15 Kg, mientras que en los Pampa Rocha dicha diferencia alcanza los 25 Kg, pero hay que considerar que los Pampa Rocha superan ampliamente al Pelón Mexicano en peso.

El peso vivo promedio también es superior a lo hallado en el cerdo ibérico, donde se registraron promedios de 128 y 140 kg en hembras y machos respectivamente (Sanz et al., 2004; Cabello, 2005). En cerdos Malhado de Alcobaça se encuentran promedios superiores con valores de 212 y 250 Kg para hembras y machos (Vicente, 2006); lo cual también ocurre con el

Mamellado uruguayo con un valor medio de 180 Kg (Macedo et al., 2008).

En general se observa que los cerdos criollos presentan menor tamaño corporal en comparación a las razas mejoradas. En comparación a las razas Poland China, Duroc, Berkshire, Hampshire, Landrace y Yorkshire (Díaz, 1953), los cerdos Pampa Rocha muestran peso vivo inferior.

### **6.3.2 Longitud y ancho de la cabeza**

Las medidas tomadas a nivel de la cabeza son las que muestran mayor variación en porcinos. Las cifras registradas en Pampa Rocha para longitud de la cabeza, 35,6 y 35,16 cm, son superiores a las reportadas para otros recursos criollos, como el criollo cubano (33,62 y 31,49 cm) y venezolano (32,05cm). También son superiores a lo hallado en cerdos ibéricos (32 y 31,14 cm). En comparación a las informadas para el cerdo Malhado de Alcobaça son un poco menores (37,50 y 36,34 cm) y muy similares a la del cerdo Mamellado de Uruguay (35,67), (Cabello, 2005; López Fernández et al., 1992; Barba et al., 1998; Hurtado & González Araujo, 2004; Vicente, 2006; Macedo et al., 2008). Respecto al ancho de la cabeza, las medida de 20,3 y 18,3, vuelven a asemejarse a las del Mamellado Uruguayo (19,79 cm) (Macedo et al., 2008) y son superiores a lo reportado en otros criollos. (Hurtado & González Araujo, 2004; Silva Filha, 2006, Arredondo, 2011).

### **6.3.3 Ancho interorbital**

Los valores promedios de esta variable fue de 16,92 en hembras y 17,5 en machos. En criollos del Nordeste brasileiro (región de Curimataú Paraibano), se reportaron valores de 5,61 a 7,88 cm y en criollos venezolanos valores de 6,06 cm (Silva Filha et al., 2010; Arredondo et al., 2011).

#### **6.3.4 Longitud y ancho del hocico**

La longitud del hocico presento valores de 19,27 y 20,83 cm en hembras y machos respectivamente; mientras que las cifras para ancho de hocico fueron de 11,67 cm en hembras y 17,33 en machos. Para longitud de hocico, en el criollo cubano se reportó una media superior de 17,85 cm, mientras que en el criollo de Brasil se observaron datos menores de entre 10,08 y 14,41 cm. En el criollo colombiano la media fue de 15,08 cm. Para el ancho de hocico en los cerdos brasileños estos datos oscilan entre 7,70 y 10,51 cm, mientras que en los criollos colombianos está variable presentó un valor de 7,11 cm (Barba et al., 1998; Silva Filha et al., 2010; Arredondo et al., 2011).

#### **6.3.5 Longitud y ancho de la oreja**

En los cerdos Pampa Rocha se registró una media de 25,82 cm en hembras y 27,3 cm en machos para la longitud de oreja, y de 13,82 y 15,5 cm para hembras y machos respectivamente en el ancho de oreja. En comparación con otros cerdos criollos se han reportado promedios para longitud y ancho de oreja de 18,73 a 20,12 cm y de 20,54 a 23,47 cm respectivamente en criollos del Nordeste de Brasil; y de 17,97 cm y 10,49 cm en el criollo colombiano (Silva Filha et al., 2010; Arredondo et al., 2011).

#### **6.3.6 Longitud y ancho de la grupa**

Respecto a la grupa, la longitud exhibió un promedio de 32 cm en hembras y 29,66 en machos, y el ancho 26,97 y 25,55 en hembras y machos respectivamente. Estas cifras son mayores a las mostradas por el criollo colombiano, con valores de 22,07 para longitud y 17,29 cm para ancho; y a criollos argentinos, con medias de 24,65 y 18,64 cm respectivamente (Arredondo et al., 2011; Revidatti, 2009).

### **6.3.7 Perímetro de la caña**

El perímetro de la caña expresa en números el desarrollo esquelético del animal, con mayor exactitud que otras medidas (Revidatti, 2009). En cuanto a esta variable, se encontraron medias de 22,66 y 19,82 para machos y hembras respectivamente. Estas son similares a las halladas para los criollos venezolanos (19,92) y para el Mamellado uruguayo (21,42) (Hurtado & González, 2002; Macedo et al., 2008). Los Pampa Rocha vuelven a mostrar medidas mayores en comparación con otros cerdos criollos, las cuales oscilan entre 11 y 17 cm (Arredondo et al., 2011, Revidatti, 2009; Martínez, 2006; Barba et al., 1998, Pérez et al., 2005, Silva Filha, 2010).

### **6.3.8 Perímetro torácico**

El perímetro torácico mostró medias de 118,93 cm en hembras y 132,33 en machos. Para el criollo colombiano se reportaron medias de 85,66 cm, para el brasileño valores entre 96,60 y 107,50, para el criollo argentino 97,59 cm.

### **6.3.9 Alzada a la cruz**

La alzada a la cruz es una característica poco afectada por las condiciones del medio, siendo de esta manera muy estable en relación con otras medidas corporales (Díaz Montilla, 1965, citado por Revidatti, 2009), por lo que se usa como base étnica de clasificación. Esta medida, con valores de 74.97 y 82.33 cm en hembras y machos respectivamente, es similar a las encontradas en el cerdo ibérico (80 y 77 cm en machos y hembras) y en el cerdo Mamellado de nuestro País (80 cm) (Cabello, 2005; López Fernández et al., 1992; Macedo et al., 2008) . Son superiores a los encontrados en varios criollos, con promedios que oscilan entre 56 y 67 cm (Arredondo et al., 2011; Revidatti, 2009; Barba et al., 1998; Pérez et al., 2005; Hurtado & Gonzáles Araujo, 2004).

### **6.3.10 Alzada a la grupa**

La alzada a la grupa exhibió valores en los Pampa Rocha de 87,77 y 93,16 cm, siendo mayor a lo encontrado en los cerdos ibéricos (81 y 83 cm hembras y machos), cubanos (66 en hembras y 73 cm en machos y), argentinos (64,44 cm), y venezolanos (63, 26 cm). En comparación con el Mamellado del Uruguay, este valor es similar (87 cm) (Macedo et al., 2008).

### **6.3.11 Alzada al nacimiento de la cola**

Para esta variable las medias obtenidas son de 73,2 cm en hembras y 80,5 cm en machos. Son muy superiores a los encontrados en los criollos brasileños donde las medias fluctúan entre 51.09 y 55.27cm

### **6.3.12 Diámetro longitudinal**

El diámetro longitudinal es otra de las medidas importantes para la caracterización de las razas. En Pampa Rocha se registraron valores de 102 cm en hembras y 99 en machos, muy parecidos a los hallados en el Mamellado (102,67 cm) y superior a lo reportado para Criollos Cubanos (76 y 71 cm), venezolanos (74,69 cm) y criollos colombianos (67,10 cm) (Macedo et al., 2008; Barba et al., 1998; Hurtado & González Araujo, 2004; Arredondo et al., 2011).

### **6.3.13 Índices**

Los índices son relaciones proporcionales entre dos o más características corporales y son más elevados cuanto mayor sea la diferencia entre estas.

La medida que menos varía es la alzada a la cruz y por lo tanto se toma como base. La variabilidad, de menor a mayor, es la siguiente: alzada a la cruz, profundidad del pecho, perímetro de la caña, perímetro torácico, longitud del tronco y longitud de grupa. La medida relativa se halla dividiendo la medida absoluta por cien sobre la medida de la alzada.

De acuerdo al índice facial, los cerdos pueden clasificarse en: braquicéfalos (cara corta), mesocéfalos (dimensiones medias) y doliocéfalos (cara larga). Las razas asiáticas y celtas son braquicéfalas, y las del tronco ibérico doliocéfalas.

En Pampa Rocha el índice cefálico mostró valores de 57,56 en hembras y 54,65 en machos, y el facial 54,22 y 59,38, de acuerdo a estos valores los Pampa Rocha exhiben proporciones mesocéfalas. En cerdos argentinos, los índices cefálico y facial mostraron medias de 51,5 y 56,4cm respectivamente (tendencia a la mesocefalia). En los ibéricos, se informaron valores de 45,75 y 44,30 para el cefálico en machos y hembras, y de 68,27 y de 66,78 para el facial (tendencia doliocéfala) (Revidatti, 2009; Cabello, 2005). Lima Silva, (2006) en cerdos del Nordeste de Brasil, determino índices cefálico y facial de 31,18 y 39,52 respectivamente.

El índice pelviano en los cerdos Pampa Rocha presenta valores de 86,92 y 86,32; mientras que el de proporcionalidad presentó medias de 73,67 y 84,66 en hembras y machos respectivamente. El índice pelviano en cerdos Ibéricos, se situó en 74,43 y 73,53 en ambos sexos, mientras que en los criollos colombianos este índice presenta medias de 76.91 en hembras y 83.77 en machos (Cabello, 2005; Arredondo et al., 2011). Este índice en los criollos cubanos es de 71,92 cm (Barba et al., 1998). El índice de proporcionalidad en cerdos colombianos resultó superior a los observados en Pampa Rocha, con promedios de 83,23 y 86,89 cm para hembras y machos respectivamente, mientras que en los criollos argentinos este índice es de 75,22 cm (Arredondo et al., 2011; Revidatti, 2009).

Los índices de compacidad y carga de caña fueron en Pampa Rocha de 50,45 y 47,57 para el primero y de 13,34, y 13,13 para el segundo, en hembras y machos respectivamente. El índice de compacidad en cerdos Ibéricos fue de 57,31 y 62,42 en machos y hembras y los de de carga de la caña mostraron valores medios en machos y hembras de 12,68 y 12,93, respectivamente. Se observa como el índice de compacidad es superior en los ibéricos, mientras que el de carga de caña es superior en los Pampa Rocha. Lima Silva et al., (2010) encuentra valores mayores para el índice de compacidad (52,38).

Para el índice corporal se obtuvo un promedio de 73,67 cm en hembras y 84,66

en machos. En el criollo cubano para el índice corporal este valor fue de 77,25cm, en los cerdos argentinos de 80,99 cm. En los criollos venezolanos se reportó un valor superior a al obtenido en los cerdos Pampa Rocha, con un valor de 88,30 (Hurtado & Gonzáles Araujo, 2004). De acuerdo a Díaz Montilla (1965) se pueden clasificar como brevilineos, por presentar un índice corporal menor a 86.

Respecto al índice metacarpo-torácico estas cifras son de 16,86 y 17,15 en hembras y machos respectivamente, siendo similar a los reportado en el criollo cubano de 17,12 cm, y mayores a los valores de los criollos argentinos de 14,93 cm (Barba et al., 1998; Revidatti, 2009).

#### **6.3.14 Coeficientes de variación**

Respecto a los coeficientes de variación, en hembras se registraron porcentajes elevados para el peso vivo, ancho de cabeza, longitud del hocico, longitud de la oreja, longitud de la grupa, y en todos los índices, a excepción del de proporcionalidad, superando el 15%. En machos las variables que superaron este porcentaje fueron longitud y ancho del hocico, longitud de la oreja, perímetro de la caña e índices cefálicos y de carga de caña.

En el estudio de Silva Filha en cerdos del Nordeste brasileño, se reseñan CV muy elevados para casi todas las variables con cifras de hasta 54,40 % para el peso vivo. Esta autora atribuye esta variación a la posible diferencia de edades, la influencia del ambiente y los sistemas de manejo utilizados. Barba et al., (1998), registraron en el Cerdo Criollo Cubano que la mayoría de las variables mantuvieron un coeficiente de variación menor al 15 %, exceptuando el perímetro de caña en machos, y ancho de la grupa y perímetro torácico en hembras. En los criollos argentinos se observaron coeficientes de variación relativamente elevados para la mayoría de las características, siendo la medida que presento la menor variación la alzada a la grupa, con una variación de 12,90%. Dentro de los índices, el de proporcionalidad exhibió un porcentaje de variación del 9,78% (Revidatti, 2009).

Los datos obtenidos permiten determinar que el Cerdo Pampa Rocha presenta

ciertas particularidades morfométricas, pudiéndolos diferenciar de otros cerdos criollos iberoamericanos, ya que presentan medidas generalmente mayores a las reportadas en estos casos. Si muestran datos similares a los hallados por Macedo et al., (2008), en el Mamellado de nuestro País.

También podemos diferenciarlos de los cerdos ibéricos, registrándose también medidas superiores a estos. Por otro lado, en la comparación entre el Pampa Rocha y las variedades oficialmente reconocidas del cerdo Ibérico, mediante el análisis de varianza, todas las variables resultaron con las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), por lo cual se puede concluir que no existe similitud entre los Pampa Rocha y los cerdos ibéricos.

## **7. Conclusiones**

Se identifica por primera vez el alelo mutante n para el gen CRC1 (causante del SEP), en cerdos Pampa Rocha.

Para el polimorfismo analizado en el gen FUT1, se encontró una variabilidad similar a la reportada en la literatura. Se identificó un segundo polimorfismo próximo a la mutación analizada.

Para el gen ESR la muestra analizada resultó homogénea, con un 100% de individuos homocigotas AA. También se identificaron otras variantes, tales como gaps y sustituciones.

El análisis mediante microsatélites demostró una alta variabilidad en la muestra de cerdos Pampa Rocha, con valores de heterocigosidad esperada de 0,603 y observada de 0,583, con un bajo nivel de endogamia ( $F_{IS}$ : 0,0475)

A partir de los porcentajes de variación entre grupos (31.3 - 38.4 %) y los valores  $F_{ST}$  ( $>0.25$ ), se concluye que existe una elevada diferenciación genética entre los cerdos Pampa Rocha y las razas Ibéricas, Celta, Berkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Large White y Meishan.

Los cerdos Pampa Rocha presentan dimorfismo sexual, proporciones mesocéfalas y son brevilíneos.

La caracterización morfológica evidenció características particulares de los cerdos Pampa Rocha, con medidas generalmente superiores a las halladas en otras razas iberoamericanas (peso vivo, longitud y ancho de cabeza, longitud y ancho de hocico, perímetro de la caña, perímetro torácico, alzada a la cruz, alzada a la grupa y diámetro longitudinal). Esto permitiría diferenciar a los Pampa Rocha de estas razas criollas.

No se encontró similitudes con el cerdo Ibérico, desde el punto genético molecular y tampoco en cuanto a las variables morfométricas.

Se contribuyó en la caracterización genética del cerdo Pampa Rocha mediante marcadores microsatélites y SNPs de genes mayores.

Se realizó la caracterización morfométrica del cerdo Pampa Rocha.

Los cerdos Pampa Rocha constituyen un grupo genético bien definido y que merece ser conservado.

## **8. Perspectivas**

En los genes FUT1 y ESR se pretende profundizar en el análisis de los polimorfismos, principalmente para identificar las nuevas variantes.

Para el caso de los datos obtenidos mediante marcadores microsatélites, se continuará con el estudio de la diversidad genética de los cerdos criollos iberoamericanos, incluidos los Pampa Rocha. Esto se realizará en el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad de Córdoba-España, con el cual se mantiene un intercambio.

En cuanto a las variables morfométricas se pretende realizar un estudio comparativo (análisis de varianza) con cerdos criollos americanos.

Con el objetivo de indagar en el origen poblacional de los cerdos Pampa Rocha, se realizará un análisis con marcadores de ADN mitocondrial.

## Bibliografía

Armstrong E. (2004). Análisis de la diversidad genética del bovino criollo Uruguayo mediante microsatélites. Tesis de Maestría, PEDECIBA-UdelaR. 1:188.

Arredondo J., Muñoz J., Arenas L., Pacheco E. & Álvarez L. A. (2011). Caracterización zoométrica de cerdos criollos en el departamento del Chocó-Colombia. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 1: 57-59

Bao W., Ye I., Pan Z., Zhu J., Zhu G., Huang X., Wu S. (2011). Beneficial genotype of swine *FUT1* gene governing resistance to *E. coli* F18 is associated with important economic traits. *Journal of Genetics*. 90(2): 315-318

Barba C. (2002). Caracterización morfológica y productiva. En: III Curso Internacional de Especialización en la conservación y utilización de las razas de animales domésticos locales en sistemas de explotación tradicionales. Universidad de Córdoba (España).

Barba C., Velázquez F., Pérez F. & Delgado J.V. (1998). Contribución al estudio racial del Cerdo Criollo Cubano. *Arch. Zootec.*, 47(177): 51–59

Barlocco N. & Vadell A. (2011). Producción de Cerdos a Campo. Aportes para el desarrollo de tecnologías apropiadas para la producción familiar. Facultad de Agronomía p1-132.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi V., Raufaste N., Bonhomme F. (2004). Genetix 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, Francia.

Bonelli A., & Schifferli R. (2001). Síndrome Estrés Porcino. *Arch. Med. Vet.* 33(2): 125-135.

Botstein D., White R., Skolnick M. & Davis R. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.

Bruford M. & Wayne R. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetic and Development*. 3: 939-943.

Cabello Robles A. (2005). Contribución a la diferenciación morfológica de las variedades del cerdo ibérico como base para su conservación. Memoria para optar al grado de Doctor en Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

Callen D., Thompson A., Shen Y., Phillips H., Richards R., Mulley J. & Sutherland G. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers.

*American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.

Canul M., Sierra A., Martínez A., Ortiz O., Delgado J.V., Vega-Pla J. & Pérez G. (2005). Caracterización genética del cerdo pelón mexicano mediante marcadores moleculares. *Arch. Zootec.* 54: 267-272.

Castro G. (2011). En Curso: Situación y conservación de recursos zoogenéticos porcino. Curso-Taller de Posgrado. Facultad de Veterinaria-UdelaR.

Castro G. (2007). Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. *Arch. Zootec.* 56(1): 783-788.

Castro G., Mc Manus C., Llambí S., Rezende S., Fernández G., Pena B., & Gagliardi R. (2007b). Caracterización Genética preliminar del cerdo mamellado Uruguayo. *Memorias VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, Univ. Técnica Estatal Quevedo-Ecuador.* p193-197

Castro G., Fernández G., Delgado J. & Rodríguez D. (2004). Contribución al estudio racial del cerdo Mamellado Uruguayo. *Veterinaria (Montevideo).* 39 (155-156): 11-14.

Castro-Molina S., Ariza M., Ríos M., Moreno D. & Guerrero G.(2011). Detección del Polimorfismo 1843 en el Gen Receptor de Ryanodina Mediante la Técnica de PCR-SSCP. *Orinoquia* 15(2): 192-200

Ciobanu D., Day A., Nagy A., Wales R., Rothschild M., Plastow G. (2001). Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DAN markers. *Genet. Sel. Evol.* 33:417-432

Coddens A., Verdonck F., Mulinge M., Goyvaerts E., Miry C., Goddeeris B., Duchateau L., Cox E. (2008). The possibility of positive selection for both F18+ Escherichia coli and stress resistant pigs opens new perspectives for pig breeding. *Veterinary Microbiology* 126: 210–215

Coombs N., Gough A.& Primrose J. (1999). Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 27: p i-iii.

Dalton D. (1980). Introducción a la genética animal práctica. Editorial Acribia. p1-167.

Delgado J.V., Martínez A., Acosta A., Alvarez L., Armstrong E., Camacho E., Cañón J., Cortés O., Dunner S., Landi V., Marques J., Martín-Burriel I., Martínez O., Martínez R., Melucci L., Muñoz J., Penedo M., Postiglioni A., Quiróz J., Rodellar C., Sponenberg P., Uffo O., Ulloa-Arvizu R., Vega-Pla J., Villalobos A., Zambrano D., Zaragoza P., Gama L.T., Ginja C.(2012). Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 43 (1): 2–10.

Delgado J.V., Martínez A., Camacho M., Vega-Pla J.L. (2010). Conservación de razas de especies domésticas. En: *Genética de Animales Domésticos*. Giovambattista G., Peral García P. p105-121

Delgado J.V. (2007). Un estudio sociogenético de la colonización zootécnica Iberoamericana. *Memorias VIII Simposio Iberoamericano sobre utilización de recursos zoogenéticos*. Quevedo. Ecuador. p1-21.

Delgado J. (2002). Gestión genética de las poblaciones. *Jornadas Iberoamericanas sobre la Mejora y Conservación de Razas Ganaderas Locales para el Desarrollo Rural Sostenible*. Antigua-Guatemala: 12-37.

Delgado J., Vega Pla J., Barba C., Martínez A. & Zamorano M. (1998). Caracterización morfológica y genética de las variedades del Tronco Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico, AECERIBER* 1: 27-44.

Díaz Montilla R. (1965). *Ganado Porcino*. Tercera Edición. Editorial Salvat. Barcelona, España.

Egito A., Albuquerque S., Sereno J., Castro S. & Mariante A. (2004). Situación actual de la explotación de cerdos naturalizados en Brasil. *Biodiversidad Porcina Iberoamericana. Caracterización y uso sustentable*. Servicios de Publicaciones Universidad de Córdoba, España. p 43-47.

Excoffier L. & Lischer H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Excoffier L., Smouse P. & Quattro J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 136: 343-359

Falush D., Stephens M. & Pritchard J. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587

Fan B., Wang Z., Li X., Zhao B., Liu S., Zhao M., Yu M., Li S., Chen T., Xiong K. (2002). Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Animal Genetics* 33: 422-427

FAO (2011). *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*. FAO Animal production and health Guidelines. Nº9, Roma.

FAO (2010). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En: *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma. p393-41

FAO (1998). Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of small populations at risk, FAO. Rome.

FAO (1996). Plan de Acción Mundial para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

FAO (1993). An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. FAO. Rome.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 29: 783-791.

Fuji J., Otsu K., Zorsato F., de Leon S., Khanna V., Weiler J., O'Brien P. & MacLennan D. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253: 448-451.

Giuffra E., Kijas J., Amarger V., Carlborg O., Jeon J. & Andersson L. (2000). The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics* 154: 1785–1791.

Guo S. & Thompson E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. 48: 361-372.

Hartl D. (1988). A primer of population genetics. Segunda Edición. Editado por Sinauer Associated Inc. Sunderland Mass.

Hernández S., Lemus Flores C., Alonso R. & Herrera Haro J. (2006). Efecto de genes candidatos sobre características reproductivas de hembras porcinas. *Revista Científica, FCV-LUZ XVI(6)*: 648 - 654

Hernández D., Posso Terranova A. & Muñoz Flores J. (2008). Detección de una mutación puntual en el gen receptor Ryanodina (Ryr1) en cerdos criollos colombianos. *Acta Agron (Palmira)*. 57(4): 275-278.

Hernández S., Lemus C., Alonso R. & Herrera Haro J. (2007). Influencia del gen Receptor de los Estrógenos (ESR) sobre la capacidad reproductiva de cerdas en condiciones de producción comercial. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 14(2): 132-136

Hernández S., Lemus C., Alonso R. & Herrera Haro J. (2006). Effect of candidate genes on reproductive traits of sows. *Rev. Cient. (Maracaibo)*. 16(6): 648-654

Herrera M. (2002). Criterios etnozootécnicos para la definición de poblaciones animales. Actas V. Cong. SERGA, III Cong. Ibérico sobre Rec. Gen. Anim. Córdoba, España p 41 – 48.

- Hodges J. (1990). Animal genetic resources. *Impact Sci. Soc.* 158: 143-153.
- Huang S., Chung M., Tsou H. & Li H. (2008). Association of polymorphism in the alpha (1,2) fucosyltransferase gene with growth performance in two Western pig breeds in Taiwan. *Livestock Science* 114: 336–340
- Hurtado E. & González Araujo C. (2002). Aspectos generales y situación actual del cerdo Criollo en Venezuela. <http://www.PortalVeterinaria.com>
- Huson D. & Bryant D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.* 23(2):254-267
- Institut Technique du Porc. (1997). Manual del Porcicultor. Edición en lengua española. Editorial Acirbia, S.A. Zaragoza, España. pp 3-70.
- Jarne P. & Lagoda P. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree.* 11(19): 424-429.
- John S., Weitzner G., Rozen R. & Scriver C. (1991). Rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research* 19: 211-212.
- Kelly L., Clop A., Vadell A., Nicolini P., Monteverde S., Amills M., Sanchez A. (2004). El cerdo Pampa-Rocha como recurso zoogenético en Uruguay. *Marcadores Moleculares. Veterinaria (Montevideo).* 39(155-156): 15-16.
- Kmieć M., Kulig H., Konik A. (2003). Preliminary results on associations between leptin gene (*LEP*) and some reproduction performance traits of boars. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 46 1:63-70
- Lacadena J. (1981). *Genética*. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid
- Laguna E. (1998). El cerdo Ibérico en la colonización y poblamiento porcino de América. *Sólo Cerdo Ibérico. AECERIBER.* Nº 1: 7-13.
- Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisso-Smith E., Robins L., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Anderson L. y Cooper A. (2005). Worldwide phylogeography of wild boars reveals multiple centres of pig domestication. *Science.* 307: 1618-1621.
- Laval G.; Iannuccelli N., Legault C., Milan D., Groenen M., Giuffra E., Andersson L., Nissen P., Jorgensen C., Beeckmann P., Geldermann H., Foulley J., Chevalet C. & Ollivier L. (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetic Selection Evolution.* 32: 187-203.
- Leach L., Ellis M., Sutton D., Mckeith F. & Wilson E. (1996). The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *J Anim. Sci* 74: 934-943.

- Lemus-Flores C., Mejía K., Rodríguez J., Barrears A., Herrera J., Alonso R. (2009). Genetic Diversity and variation of ESR, RBP4 and FUT1 Genes in Mexican Creole and Yorkshire Pig Populations. *Journal Biological Sciences* 9(8): 878-883
- Li M., Sternbauer K., Haahr P. & Kantanen J. (2005). Genetic components in contemporary Faroe Islands cattle as revealed by microsatellite analysis. *Journal Animal Breeding and Genetics* 122: 309-317.
- Linville R., Pomp D., Johnson R. & Rothschild M. (2001). Candidate genes for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J Anim Sci* 79: 60-67
- López Fernández J., Arguello J., Henríquez J., Capote A. & Darmanin N. (1992). Contribution to the study of Black Canary pig. *Arch. Zootec.* 41(154): 531-536.
- Luo Y., Qiu X., Li H. & Zhang Q. (2010). Association between the Polymorphism in FUT1 Gene and the Resistance to PWD and ED in Three Pig Breeds Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* 23(10) : 1268-1275
- Macedo F., Castro G. & Fernández G. (2008). Estudio preliminar de Componentes principales en características morfométricas y peso vivo de una muestra de cerdos mamellados del Uruguay. IX Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de recursos Zoogenéticos: 225 -259. Mar Del Plata. Argentina
- Mariante A., Castro S., Albuquerque M., Paiva S. & Germano J. (2003). Biodiversidad Porcina en Brasil. *Arch. Zootec.* 52: 245-248.
- Martínez, R. (2008). Caracterización genética y morfológica del Bovino Criollo Argentino de origen patagónico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. pp. 1-244
- Martínez A., Rodero A & Vega-Pla J.L. (2000). Estudio con microsatélites de las principales variedades de ganado porcino del tronco Ibérico. *Archivos de Zootecnia.* 49(185-186): 45-52
- Martínez A. (2001). Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España. pp1-174.
- Martínez A., Quiroz J., Marques J. & Delgado J.V. (2007). Estudio de la diversidad genética del cerdo Negro Canario con microsatélites de ADN. *Arch. Zootec.* 56 (1): 425-428.
- McManus C., Rezende Paiva S., Rezende Silva A., Sayori Murata L., Louvandini H., Barrera Cubillos G., Castro G., Martinez R., Llambi S. & Perez J. (2010). Phenotypic Characterization of Naturalized Swine Breeds in Brazil, Uruguay and Colombia. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(3): 583-591.

Meijerink E., Fries R., Vögeli P., Masabanda J., Wigger G., Stricker C., Neuenschwander S., Bertschinger H.U., Stranzinger G. (1997). Two alpha (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mamm. Genome* 8: 736–741.

Moazami-Goudarzi K., Vaiman D., Mercier D., Grohs C., Furet J., Leveziel H. & Martin P. (1994). Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines francaises: premiers resultants. *Genetics Selection and Evolution* 26: 155-165.

Montenegro M, Castro G., Barlocco N., Llambí S (2010). Frecuencia alélica del Síndrome de Estrés Porcino en Uruguay (análisis por PCR-RFLP). *Veterinaria, (Montevideo)* 46(177-178-179-180): 23-26

Moore S., Sargeant L., King T., Mattik J., Georges M. & Hetzel J. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primers pairs in closely related species. *Genomics*. 10: 654-660

Nagamine Y. & Higuchi M. (2001). Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *J. Anim. Breed. Genet.* 118(3): 101-109.

Nagylaki T. (1998). Fixation indices in subdivided populations. *Genetics*. 148: 1325-1332.

Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-282.

Nei M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Genetics*. 41: 225-233.

Nei M. (1983). Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. *Evolution of genes and proteins* (Nei, M. and Khoen., R. Ed.). 165-190, Sunderland.

Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York

Nei M. & Roychoudhury A. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 76: 379-390.

Oldenbroek J. (1999). Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. Capítulo 1. *Publisher DLO Institute for Animal Science and Health*. 1-9.

Padilla J., Portilla F., Salazar J., Parejo J., Martínez-Tracón M., Rabasco A., Sansiforiano M., Corral J., Izquierdo M. & Hernández-García F. (2010). Detección múltiple de SNPs relacionados con crecimiento y calidad de carne en porcino. *Arch.*

Page R. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

Park S. (2001). Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Tesis doctoral, University of Dublin.

Pérez-Pineda E. (2005). Caracterización genética del cerdo Criollo Cubano utilizando marcadores moleculares. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad de Granma Cuba. Universidad de Córdoba España.

Pérez F., Sierra A.C., Ortiz J., Ortiz A., Romualdo J. & Canul M. (2005). Caracterización Morfométrica del cerdo pelón en Yucatán, México. VI Simposio Iberoamericano sobre la conservación y utilización de Recursos Zoogenéticos, Chiapas, México. 85-88.

Pinheiro Machado L. C. (1973). Los cerdos. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp: 13-144.

Pommier S., Pomar C., & Godbout D. (1998). Effect of the Halothane genotype and stress on animal performance, carcass composition and meat quality of crossbred pigs. *Can J. Anim. Sci.* 78: 257-264.

Porter B. & Tebbit J. (1993). Pigs. A Handbook to the Breeds of the World. Hartnolls Limited, Cornwall. Inglaterra.

Pritchard J., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959

Puentes Martínez & Pérez Ede T. (2007). Canalopatías en veterinaria: dos ejemplos de interés. *Rev.Complutense de Ciencias Veterinarias* 1(2): 603-611.

Ramos E., Rojas R., Herrera haro J., García A., Lemus Flores C. & Hernández A. (2008). Estandarización de una técnica de extracción de ADN en sementales porcinos para evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP. *Revista Complutense de Ciencias Veterrinaria* 2(1): 39-59

Raymond M. & Rousset F. (1995). Genepop (Version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.

Raymond, M. & Rousset, F. (1996). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.

Reiner G. (1993). A new physiological pathway controlling muscle growth and its potencial relevance for pig production. *Pig News and Information.* 14: 123-125.

Revidatti M.A. (2009). Caracterización de cerdos criollos del Nordeste Argentino. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España. 1-260

Riojas Valdés V., Canales J., Gómez de la Fuente J., Dávalos G., Hernández Vidal G. & Salina J. (2005). Allele frequency of porcine stress syndrome in Nuevo Leon by PCR-RFLP análisis. *Vet. Mex.* 36(3): 261-267.

Rodero A., Delgado J.V. & Rodero E. (1992). Primitive Andalusian Livestock and their implications in the discovery of America. *Arch. Zootec.* 41(extra): 383-400.

Rothschild M. (2003). Approaches and challenges in measuring genetic diversity in pigs. *Arch. Zootec.* 52:129-135.

Rothschild M. & Ruvinsky A. (1998). The genetics of the pig. Cabi Publishing. Cabi International. p1-622

Rothschild M., Tuggle C., Jacobson C., Vaske D., Mileham A. & Plastow G. (1996). Genetic markers for pig litter size. *Patent Lens*.

Ruane J. (1999). Selection breeds for conservation. En: Genebanks and the management of farm animal genetic resources. Netherlands: Ed. J.K.Oldenbroek, 1999. p.59-73

Sabogal R. (2002). El cerdo Criollo colombiano. Disponible en: Sánchez, G. L. (1995) Ecosistemas y Poblaciones Ganaderas. Colombia.

Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Ecology.* 4: 406-25.

Sancristobal M., Chevalet C., Haley C., Joosten R., Rattink A., Harlizius B., Groenen M., Amigues Y., Boscher M., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., de Saute´ C., Alderson I., Fimland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla J., Martinez A., Ramos M., Glodek P., Meyer J., Gandini G., Matassino D., Plastow G., Siggins K., Laval G., Archibald A., Milan D., Hammond K., Cardellino R. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37: 189–198.

Sancristobal M., Chevalet C., Foulley J., & Ollivier L. (2003). Some methods for analysing genetic marker data in a biodiversity setting—Example of the PigBioDiv data. *Arch. Zootec.* 52:173–183.

Sanz R., Diéguez E. & Cabello A. (2004). Caracterización morfológica, productiva y reproductiva de las variedades del Cerdo Ibérico. Biodiversidad Porcina Iberoamericana. Caracterización y uso sustentable. Servicios de Publicaciones Universidad de Córdoba, España. pp209-217.

Shi Q., Huang S., Liu X., He C. & Jiang J., 2003. Polymorphism of E. coli F18 receptor gene in different pig breeds. *Acta Genetica Sinica* 30: 221–224

Short T., Rothschild M., Southwood O., McLaren D., de Vries A., van der Steen H., Eckardt G., Tuggle C., Helm J., Vaske D., Mileham A. & Plastow G. (1997). Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J Anim Sci* 75: 3138-3142

Silva Filha O., Pimenta Filho E., Silva L., Pereira W., Oliveira R., Delgado J.V. & Sereno R. (2010). Morfometría corporal de cerdos locales en Curimataú Paraiano. Caracterización de factores. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 17 (3): 197-202

Silva Filha O. (2007). Caracterização da criação de suínos locais no Curimataú Paraibano. *Revista Computadorizada de Producción Porcina Volumen* 14 (2): 107-114

Sollero B., Paiva S., Faria D., Guimaraes S., Castro S., Egito A., Albuquerque M., Piovezan U., Bertani. & Mariante A. (2008). Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livestock Science*. Artículo en prensa

Sotillo J. & Serrano V. (1985). Producción Animal. Etnología Zootécnica. Tomo I. Imp. Flores. Albacete.

Sneath P. & Sokal H. (1973). *Numerical taxomomy*. Freeman Ed. San Francisco.

Stallings, R. (1992). Cpg suppresion in vertebrate genomes does not account for the rarity of (cpg)n microsatellites repeats. *Genomics*. 17:890-891.

Vadell A. (2011). Los cerdos criollos en el ecosistema de los palmares de Rocha. En Situación y conservación de recursos zoogenéticos porcinos. Curso-taller de Posgrado. Facultad de Veterinaria-UdelaR. p27-30.

Vadell, A. (2008). Una reseña corta sobre la raza criolla de cerdos Pampa Rocha y su utilización en Uruguay. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. Cerdos criollos uruguayos/Uruguayan creole pigs. Volumen 15 (número 2), p105-112.

Vadell A., Barlocco N., Methol R., Vaselli M. & Castillos A. (1994). Diagnóstico de la producción porcina en el departamento de Rocha. PROBIDES/UDELAR. Uruguay: 44.

Vicente A., Carolino M., Sousa M., Ginja C., Silva F., Martínez A., Vega-Pla J., Carolino N., Gama L. T. (2008). Genetic diversity in native and commercial breeds of pigs in Portugal assessed by microsatellites. *J. Anim. Sci*. 86:2496–2507.

Vicente, A. (2006). Caracterização do porco Malhado de Alcobaça. Tese de Mestrado em Produção Animal da Universidade Técnica de Lisboa.

Villareal P., Diéguez F., & Rodríguez M. (2005). Estandarización de una prueba de ADN para detectar el Síndrome de Estrés Porcino (SEP) en cerdos cubanos. *Rev. Ciencia Agrícola*, 39(1): 69-74.

Walsh P., Metzger D. & Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10(4):506-13.

Weir B. (1990). Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Weir B. (1996). *Genetic data analysis II*. Sinauer Ed. Sunderland.

Wellek S. (2004). Tests for establishing compatibility of an observed genotype distribution with Hardy–Weinberg equilibrium in the case of a biallelic locus. *Biometrics* 60: 694-703.

Wright S. (1969). Evolution and the Genetics of Populations. *The Theory in Gene Frequencies*. University of Chicago. Chicago.

<http://biopig.ijmido.com/marcadores-moleculares/>

<http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

<http://www.cnrs-qif.fr/pge/bioinfo/populations/>

<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>

<http://www.stanford.edu/group/rosenberglab/distruct.html>

<http://folk.uio.no/ohammer/past/>

<http://www.user.gwdg.de/FAO/pig.htm>