

Variabilidad genética del cerdo Congo Santandereano mediante marcadores microsatélite

Jiménez, Á.P.®; Albarracín, M. y Estupiñán, S.

Grupo de Investigación en Ciencias Animales. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ). Universidad Cooperativa de Colombia. Bucaramanga, Santander. Colombia.

RESUMEN

El cerdo Congo Santandereano es un recurso zoogenético de importancia para la seguridad alimentaria y la economía campesina propio del departamento de Santander, Colombia. Se determinó su variabilidad genética mediante la genotipificación de 12 marcadores microsatélite, reportados por la FAO y la ISAG. Se recolectaron 37 muestras de sangre porcina. El ADN fue extraído mediante el kit DNA 2000 de Corpogen®, y cuantificado por fluorometría (Qubit Fluorometer Invitrogen®). Los microsatélites se amplificaron mediante PCR simple, para la genotipificación se sometieron los amplificadores a electroforesis en cámara vertical en geles de poliacrilamida. Mediante el programa Genetix® se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), el número de alelos para cada *locus*, las frecuencias alélicas y el coeficiente de endogamia F_{IS} ; con la herramienta Toolkit microsatélite de Excel® se calcularon los índices polimórficos (PIC). Los 12 microsatélites resultaron polimórficos y se detectó un total de 52 alelos. El número medio de alelos encontrado en el cerdo Congo fue de 4,3. La H_e varió entre un mínimo de 0,42 para los marcadores S009 y SW240 y un máximo de 0,76 para el marcador CGA1. La heterocigosidad media observada fue de 0,35, la mayoría de los marcadores utilizados resultaron muy informativos de variabilidad genética con valores de PIC superiores a 0,5. El índice de endogamia (F_{IS} 0,5) revela un alto déficit de heterocigotos. Estos hallazgos sugieren baja variabilidad genética del cerdo Congo, con una tendencia al incremento de consanguinidad, posiblemente relacionada con un tamaño poblacional reducido.

Genetic variability of Congo pig using microsatellite markers

SUMMARY

The Congo pig is a zoogenetic resource characteristic of the Santander Department in Colombia. Its genetic diversity was evaluated using 12 different microsatellites, from 37 blood samples. DNA was extracted using Corpogen 2000 kit®; the microsatellites were amplified using PCR (Polymerase Chain Reaction) and electrophoresis of vertical chamber for typification. Using software (Genetix®) the observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e), the number of alleles for each locus, the allelic frequency and the F_{IS} statistics were calculated. The polymorphic indices (PIC) were calculated using the microsatellite excel Toolkit. The twelve microsatellites employed were polymorphic, a total of 52 alleles were detected, with a median of 4.3 alleles. The (H_e) range interval values was 0.42 (minimal markers S009 and SW240) – 0.76 (Maximal marker CGA1). The medium H_o was 35%, the majority of the markers were useful with polymorphism information content (PIC) superior to 0.5. The inbreeding index (F_{IS} 0.5) reveals a high deficit of heterozygotes. This finding strongly suggests a low genetic variability of the Santander Congo pig, suggests a possible trend of increase in consanguinity, possibly related to a reduced population size.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Porcinos.
Colombia.
SSR.
Diversidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

Pigs.
Colombia.
SSR.
Diversity.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 22.07.2016
Aceptado/Accepted: 29.05.2017
On-line: 15.10.2017
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
angela.jimenez@campusucc.edu.co

INTRODUCCIÓN

La Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO, señala que: *La gestión*

efectiva de la diversidad genética animal es esencial para la seguridad alimentaria mundial, el desarrollo sostenible y el sustento de cientos de millones de personas (FAO, 2007). Los recursos zoogenéticos constituyen una posibilidad

para consolidar estrategias de seguridad alimentaria, integración familiar y fuente de ingresos de las poblaciones campesinas; debido a que están adaptados a ecosistemas diversos y son resistentes a diferentes enfermedades, las comunidades campesinas han desarrollado tecnologías de cría y producción acordes con el entorno y las necesidades de sus familias.

El cerdo Congo es un ejemplo de esta agrobiodiversidad, constituye un recurso criollo rústico en vía de extinción, con ventajas biológicas dadas principalmente por adaptación al entorno en el Departamento de Santander, Colombia. Su aprovechamiento, consiste en la integración con los demás componentes del sistema de producción familiar, al utilizar los subproductos agrícolas y pecuarios y áreas de pastoreo como fuente de alimentación, propiciando ingresos monetarios (Albarracín, 2014).

La información actual sobre el cerdo Congo Santandereano es escasa, la investigación de este recurso en el país se ha basado en el abordaje social, productivo y fenotípico (Albarracín, 2014). En la actualidad el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia reconoce tres razas de cerdos criollos colombianos; Zungo de la costa atlántica, Casco de Mula de los Llanos orientales y San Pedreño en Antioquia y Caldas (Oslinger *et al.*, 2006).

La FAO considera que una raza está en peligro de extinción cuando existen menos de 1000 hembras o 20 machos reproductores (FAO, 2010). De acuerdo a esto, los cerdos Congos, se encuentran al borde de la extinción, ya que para el año 2010 apenas se identificaron 65 individuos, en propiedad de 11 familias campesinas en tres corregimientos del municipio de Surata (Contreras y Guaracao, 2011). Sin embargo, por observación directa de los autores y comentarios de campesinos y profesionales del sector agropecuario en Santander; se han observado cerdos en municipios como Mogotes, Rionegro, Onzaga y Los Santos.

Para que este recurso zoogenético pueda ingresar a programas de conservación nacional e internacional es preciso caracterizarlo genéticamente con el propósito de identificar su diversidad genética entre núcleos y con otras razas porcinas criollas y comerciales presentes en el territorio nacional y determinar si es un ente racial con identidad propia. Los marcadores moleculares tipo microsatélite por su alto polimorfismo han sido los más empleados para estudios de variabilidad genética en diversas especies animales: bovino, ovejas, cabras, cerdos, gallinas, peces (Barrera *et al.*, 2006); ampliamente se describe su uso para análisis filogenéticos en cerdos criollos de distintos orígenes geográficos (Martínez *et al.*, 2000; Thuy *et al.*, 2006; Meléndez *et al.*, 2014; Pardo *et al.*, 2015)

El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética de cerdos Congo Santandereano, mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélite.

MATERIAL Y MÉTODOS

TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron 37 muestras de sangre de cerdo Congo, debido al número tan reducido de ejemplares disponibles, los cuales fueron muestreados al azar en el

Departamento de Santander, en los municipios de Mogotes (12), Piedecuesta (8), Lebrija (1), Cachira (15) y Matanza (1). A cada animal se le tomó una muestra de sangre en tubos con anticoagulante EDTA, las muestras fueron transportadas a 4°C para su procesamiento en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Bucaramanga.

SELECCIÓN DE MARCADORES TIPO MICROSATÉLITE

Se seleccionaron 12 marcadores microsatélite (**tabla I**), reportados previamente en estudios de variabilidad genética en cerdos (Martínez *et al.*, 2000; Nidup and Mora, 2011; Meléndez *et al.*, 2014; Pardo *et al.*, 2015). Los microsatélites utilizados en este proyecto han sido considerados por la FAO, la ISAG como los más útiles para el estudio de relaciones genéticas dentro y entre razas porcinas (ISAG, 2012).

EXTRACCIÓN DE ADN

Cada muestra de sangre fue centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos, los glóbulos blancos fueron transferidos a un vial estéril y el ADN fue extraído utilizando el kit DNA 2000 de Corpogen®. Los extractos de ADN fueron resuspendidos en buffer TE 1X (10Mm THCl y 1mM EDTA pH 8.0) y almacenados a -60 °C.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y LA CANTIDAD DE ADN

Los extractos de ADN fueron cuantificados por fluorometría, mediante el kit Qubit fluorometer de Invitrogen®. La concentración de cada ADN fue ajustada a 10ng/μL, la calidad de ADN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, empleando como colorante AZ Visiom Amresco® y visualizados en Transluminador de luz UV.

GENOTIPIFICACIÓN

A partir de cada uno de los 37 ADNs se amplificaron por PCR simple 12 marcadores microsatélites de acuerdo a las condiciones previamente estandarizadas

Tabla I. Locus analizados, número de alelos (Na), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), estadístico FIS de Wright (Loci analyzed, number of alleles (Na), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), F-statistics).

Locus	Na	Ho	He	FIS
S0228	4	0,30	0,48	0.57
S0068	5	0,22	0,50	0.69
S0005	5	0,46	0,60	0.35
SW240	3	0,27	0,42	0.57
S0225	3	0,49	0,64	0.25
SW24	6	0,30	0,56	0.61
S0090	4	0,18	0,42	0.72
S0226	5	0,44	0,56	0.42
S0227	5	0,51	0,65	0.32
CGA1	5	0,38	0,76	0.51
SW911	3	0,35	0,56	0.47
SW951	4	0,30	0,42	0.59
promedio	4.3	0.35	0.54	0.5
ds	0.98	0.10	0.10	0.15

(Serrano y Ascanio, 2013). Las condiciones óptimas para las PCRs incluyeron: 10 ng/μL de ADN; 2,5 mM de MgCl₂ (Corpogen S.A.®); 0,15 mM de cada dNTP (Promega®); 1X de buffer de reacción; 0,8 μM de cada iniciador y 2,5 U de Tucan Taq polimerasa (Corpogen S.A.®) en un volumen de 25 μL. Las PCR se realizaron en termociclador Thermo Scientific® con un precalentamiento inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55-60 °C dependiendo del marcador por 30 s, extensión a 72 °C durante 30 s y una extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Para la visualización de alelos, cada uno de los amplificadores obtenidos de las PCR para cada microsatélite, fueron evaluados en geles de poli(acrilamida) teñidos con tinción de plata en una cámara de electroforesis vertical, Thermoscientific OWL 3S3. Los geles fueron preparados a concentración 29:1 (29 partes acrilamida: 1 parte bisacrilamida (Sigma®), con 6.6 Mm de urea, 0,08% de TEMED (tetrametilendiamina) (Sigma®) y 0,05% de persulfato de amonio (Sigma®) de acuerdo a las condiciones previamente estandarizadas por Serrano y Ascanio (2013).

Los pesos moleculares de las bandas obtenidas fueron determinados por comparación directa con los marcadores de peso molecular de 25 pb y 10 pb (Promega®). Los alelos encontrados fueron registrados en una matriz en Excel. Esta matriz fue utilizada para realizar los análisis bioinformáticos.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Empleando el programa Genetix® se calculó la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), el número de alelos para cada locus, las frecuencias alélicas y el estadístico FIS, mediante la herramienta Toolkit microsatélite de excel® se calcularon los índices polimórficos (PIC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tamaño de muestra empleado en esta investigación fue reducido, debido a la dificultad en la consecución de ejemplares; puesto que el cerdo Congo de acuerdo a lo expuesto por la FAO (2010), se encontraría en peligro de extinción.

Los microsatélites estandarizados en este estudio fueron reportados por la FAO, la ISAG como muy informativos de variabilidad genética en porcinos (Thuy *et al.*, 2006; Nidup and Mora, 2011; Revidatti *et al.*, 2014; Pardo *et al.*, 2015).

Los microsatélites estudiados resultaron polimórficos. Se detectó un total de 52 alelos, el número medio de alelos encontrado en el cerdo Congo fue de 4,3. La He varío entre un mínimo de 0,42 para los marcadores S009 y SW240 y un máximo de 0,76 para el marcador CGA1. La heterocigosidad media observada fue de 0,35, la mayoría de los marcadores utilizados resultaron muy informativos de variabilidad genética con valores de PIC superiores a 0,5. El índice de endogamia (FIS 0,5) reveló un déficit de heterocigotos (**tabla I**).

Estos hallazgos sugieren una media a baja variabilidad genética del cerdo Congo, con una tendencia al incremento de endogamia, posiblemente relacionada

con un tamaño poblacional reducido, hecho que difiere con lo reportado por Pardo *et al.* (2015) en análisis con porcinos de varios municipios del Departamento de Córdoba, región norteña de Colombia, quienes detectaron un alto grado de heterocigosidad (0,58), y una alta variabilidad genética, pero empleando 20 microsatélites.

Sin embargo, la Ho en las muestras de cerdo Congo (0,35) resultó levemente mayor en comparación con los reportes en razas nativas del país: Oslinger *et al.* (2006) al evaluar individuos de las razas Zungo, San Pedroño y Casco de Mula utilizando la técnica molecular RAMS (Random Amplified Microsatellites), reportan heterocigosidades que oscilaron entre 0,10 para el cerdo San Pedroño y 0,23 para el Zungo Costeño, hecho que puede tener relación con el número de muestras tan reducido (14 San Pedroño, 11 Zungo y 5 Casco de Mula); la difícil consecución de muestras tanto en esta investigación como en las previas, reflejan el peligro de extinción al que están sometidos la mayoría de estos recursos zoogenéticos.

El número medio de alelos encontrado en la muestra del cerdo Congo en este estudio (4,3) es menor a lo reportado en el cerdo Pelón Mexicano (7,0), criollo Cubano (8,2) y en los criollos del Nordeste argentino (9,25) (Montenegro *et al.*, 2012), así como en distintas variedades de porcinos del tronco Ibérico (Martínez *et al.*, 2000). La heterocigosidad en el cerdo Congo (0,35) también fue menor lo reportado en otros cerdos nativos en países como México (0,63), Cuba (0,65), Uruguay (0,58), Argentina (0,68) y España (0,43-0,56) (Martínez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Resulta urgente diseñar programas de conservación *ex situ* e *in situ* del cerdo Congo, ya que la diversidad de este recurso puede estar en amenaza, por el número de animales tan reducido, con una posible tendencia al aumento de consanguinidad. Dichos programas deben permitir desde las comunidades y las instituciones, preservar para las futuras generaciones esta diversidad genética y cultural, como estrategia de seguridad y soberanía alimentaria campesina en el Departamento de Santander.

AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

Este proyecto fue desarrollado gracias a recursos internos de la Universidad Cooperativa de Colombia, con fondos aprobados en convocatoria interna CONADI (Comité para el Desarrollo de la Investigación). Los autores agradecen a los estudiantes Nelson Neira y Daniel Torres por su colaboración en la toma de muestras y desarrollo de prácticas de laboratorio para la obtención de resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Albarracín, M. 2014. La conservación del cerdo criollo Congo Santandereano (*sus scrofa domestica*), recurso alimentario de sistemas tradicionales de producción campesina en Santander alternativas planteadas con actores locales, regionales y nacionales. Tesis de

- Maestría en Desarrollo rural. Facultad de Estudios Ambientales Rurales. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Barrera, G. P.; Martínez, R.; Pérez, J. E.; Polanco, N. y Ariza, F. 2006. Evaluación de la variabilidad genética en Ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. *Anim Genet Resour Inform (AGRI)* 38: 35-45
- Contreras, F. y Guaracao, R. 2011. Caracterización del sistema de crianza tradicional del cerdo criollo congo santandereano en el municipio de Surata – Santander. Tesis pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia. Bucaramanga.
- FAO. 2007. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura – Resumen. FAO, comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma, Italia.
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. FAO. Roma. <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm> (traducción de la versión original en inglés, 2007).
- González, S.; Lemus, F.; Martínez, M.; Rodríguez, C.; Orozco, B. y Barreras, S. 2011. Diversidad genética en cerdos criollos mexicanos con genes candidatos asociados a características productivas. *Pesq Agropec Bras*, 46: 44-50.
- ISAG. 2012. Pig molecular comparison test report. Conference 2012. Cairns, Australia.
- Martínez, A.M.; Rodero, A. y Vega-Pla, J.I. 2000. Estudio con microsatélites de las principales variedades del ganado porcino del tronco ibérico. *Arch Zootec*, 49: 45-52
- Meléndez, I.; Pardo, E. y Cavada, T. 2014. Caracterización genética del cerdo doméstico (*Sus scrofa doméstica*) en Cereté – Colombia, usando marcadores microsatélites. *Rev MVZ Córdoba*, 19: 4150- 4157.
- Montenegro, M.; Llambí, S.; Castro, G.; Barlocco, N.; Vadell, A.; Landi, V.; Delgado, J. y Martínez A. 2012. Variabilidad genética en el cerdo Pampa Rocha de Uruguay. *AICA*, 2 : 203-205.
- Nidup, K. and Moran, C. 2011. Genetic diversity of domestic pigs as revealed by microsatellites: a mini review. *Genom Quant Genet*, 2: 5-18
- Oslinger, A.; Muñoz, J.E.; Alvaarez, L.A.; Ariza, F.; Moreno, F. y Posso, A. 2006. Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs. *Acta Agron*, 55: 45-50
- Pardo, E.; Maya, H. y Alvarino, G. 2015. Estudio de la diversidad genética del cerdo doméstico en el departamento de Córdoba (Colombia) utilizando marcadores microsatélites. *Rev Med Vet Zoot*, 62: 34-48.
- Revidati, M.A.; Delgado, J.V.; T. Gama, L.T.; Landi V.; Ginja C.; Alvarez L.A.; Vega J.L. and Martinez A.M. 2014. Genetic characterization of local criollo pig breeds from the americas using microsatellite markers. *J Anim Sci*, 92: 4823-4832.
- Serrano, C. y Ascanio, L. 2013. Estandarización de electroforesis en geles de poliacrilamida denaturante para la genotipificación de la Cabra Santandereana. Tesis de Pregrado Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia. Bucaramanga.
- Thuy, N.T.D.; Melchinger, E.; Kuss, A.W.; Cuong, N.V.; Bartenschlager, H. and Geldermann, H. 2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *J Anim Sci*, 84: 2601-2608.