

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES LÍNEAS DE CUYES *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae) MEDIANTE EL MARCADOR MOLECULAR RAPD

WILLIAM ORLANDO BURGOS PAZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
SAN JUAN DE PASTO
2007

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES LÍNEAS DE CUYES *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae) MEDIANTE EL MARCADOR MOLECULAR RAPD

WILLIAM ORLANDO BURGOS PAZ

Informe final de trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Zootecnista

Presidente
CARLOS SOLARTE PORTILLA
Zoot. Ph.D.

Copresidente
CAROL ROSERO GALINDO
Biol. Candidata Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
SAN JUAN DE PASTO
2007

“las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

CARLOS SOLARTE PORTILLA Zoot. M. Sc. Ph. D. Presidente

CAROL ROSERO GALINDO Biol. M. Sc. Candidata Ph. D. Copresidente

OSCAR CHECA CORAL I.A. M. Sc. Ph. D. Jurado Delegado

ALBERTO CAYCEDO I.A. M. Sc. Jurado

San Juan de Pasto, 1 de junio 2007

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño - VIPRI por haber facilitado los recursos necesarios para la culminación exitosa de esta investigación

Al Profesor, Heiber Cárdenas de la Universidad del Valle

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

A Dios, por mostrarme el camino,
A mis Padres, por ser la luz,
A mi Hermano, por sus locuras.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	21
1. DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA	23
2. FORMULACION DEL PROBLEMA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
4. MARCO TEORICO	27
4.1 GENERALIDADES DEL CUY (<i>Cavia porcellus</i>).	27
4.1.1 Mejoramiento Genético aplicado en cuyes (<i>Cavia porcellus</i>)	29
4.2 GENERALIDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES	30
4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa- PCR	32
4.2.1.1 Los primers o cabadores	32
4.2.1.2 Muestra de ADN	32

4.2.1.3 dNTP's	33
4.2.1.4 Buffer de reacción	33
4.2.1.5 ADN polimerasa	33
4.2.2 Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente – RAPD's	34
4.2.3 Polimorfismo de fragmentos de longitud variable –AFLP	36
4.2.4 Comparación de los marcadores RAPD y AFLP	37
4.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	38
4.3.1 Diversidad génica (Heterocigosidad)	38
4.3.2 Estadísticos F	38
4.3.3 Distancia genética	40
5. DISEÑO METODOLOGICO	41
5.1 LOCALIZACIÓN	41
5.2 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA EL ANALISIS MOLECULAR	41
5.2.1 Colección, almacenamiento y transporte de las muestras de sangre en tarjetas FTA®	41
5.2.2 Extracción de ADN	44

5.2.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica RAPD	45
5.2.3.1 Repetibilidad de la técnica	46
5.2.4 Visualización de los fragmentos amplificados	46
5.2.4.1 Nomenclatura de los fragmentos	48
5.2.5 Evaluación y selección de los cebadores mas polimórficos	48
5. 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POLIMORFISMOS, HETEROCIGOSIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA	51
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
6.1 SELECCIÓN DE LOS CEBADORES MÁS POLIMORFICOS	53
6.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	55
6.2.1 Análisis de polimorfismos	55
6.2.2 Heterocigosidad esperada (H_e)	59
6.2.3 Análisis molecular de varianza AMOVA	62
6.2.4 Distancia genética	65
6.2.5 Prueba de diferenciación poblacional	72
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73

7.1 CONCLUSIONES	73
7.2 RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Descripción de las líneas comerciales y los individuos de <i>Cavia porcellus</i> analizados.	42
Tabla 2. Nombre y secuencia de los cebadores	49
Tabla 3. Ejemplo de la matriz creada para determinar los cebadores Polimórficos	50
Tabla 4. Valores de Homocigosidad esperada, Heterocigosidad esperada (H_e), PIC y número de alelos para la selección de cebadores RAPD's Polimórficos	54
Tabla 5. Proporción de loci polimórficos encontrados en cada población con cada cebador	56
Tabla 6. Número de bandas y tamaños de fragmentos obtenidos con cada cebador	57
Tabla 7. Distribución de bandas en las poblaciones de <i>Cavia porcellus</i> obtenidas con el marcador RAPD	58
Tabla 8. Heterocigosidad promedio encontrada con el marcador molecular RAPD para las poblaciones de <i>Cavia porcellus</i>	60
Tabla 9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre poblaciones	63
Tabla 10. Valores de Theta promedio e intervalos de confianza obtenidos en el análisis de las poblaciones de <i>Cavia porcellus</i>	65
Tabla 11. Medidas de distancia e identidad genética obtenidas para las poblaciones de <i>Cavia porcellus</i>	66
Tabla 12. Análisis de agrupamiento UPGMA de las poblaciones de <i>Cavia porcellus</i> usando la distancia genética de Nei, con cada uno de los Cebadores	67
Tabla 13. Prueba de diferenciación poblacional de Raymond and Rousset para cada uno de los cebadores utilizados	72

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Cuy criollo de pelo corto	28
Figura 2. Cuy de pelo largo	28
Figura 3. Cuy mejorado Genéticamente	29
Figura 4. Extracción de sangre mediante punción cardiaca	42
Figura 5. Preservación de las muestras de sangre en Tarjetas FTA	43
Figura 6. Almacenamiento de las tarjetas de FTA	44
Figura 7. Extracción de un disco de la tarjeta FTA	44
Figura 8. a) Termociclador Perkin Elmer Gene amp PCR System 9700. b) Diagrama del ciclo RAPD-PCR, el asterisco en la temperatura de extensión indica la modificación realizada en la rampa de temperatura	46
Figura 9. Cámara de electroforesis para geles de agarosa	47
Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	47
Figura 11. Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 6% y 3M de urea	48
Figura 12. Marcador de Peso Molecular empleado en la determinación de los tamaños moleculares de los fragmentos RAPD's amplificados para <i>Cavia porcellus</i> .	48
Figura 13. Selección de fragmentos polimórficos en un gel de poliacrilamida al 6% y 3M de urea	50
Figura 14. Árboles construidos con cada uno de los cebadores usando el agrupamiento UPGMA con la distancia original de Nei	68

GLOSARIO

ALELO: cualquiera de las formas distintas de un gen que ocupa la misma posición o locus, en cromosomas homólogos y que sufren apareamiento meiótico. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

CODON: unidad de codificación genética; triplete de nucleótidos adyacentes en el DNA o RNA mensajero que especifica a un aminoácido en particular.

COOMIGRACION: movimiento de dos o mas secuencias de ADN, de igual peso molecular pero diferente secuencia de bases por medio de electroforesis.

DNA o ADN: acido desoxirribonucleico; material genético básico de una célula; polímero de los siguientes nucleótidos: adenina, citocina, guanina, timina. Contiene típicamente dos cadenas polinucleotídicas en forma de doble hélice; la sucesión de apareamientos de nucleótidos en las cadenas es la base del código genético; las moléculas de DNA son las moléculas mas largas biológicamente activas que se conocen.

ELÉCTROFORESIS: técnica de separación de mezclas de moléculas orgánicas basadas en las distintas velocidades de desplazamientos de las moléculas en un campo eléctrico.

EXONES: secuencias de ADN específicas de genes, que codifican secuencias de aminoácidos en las proteínas.

FENOTIPO: suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo.

FRECUENCIA GÉNICA O FRECUENCIA ALÉLICA: proporción de copias de un gen en una población determinada.

GEL DE POLIACRILAMIDA: medio de soporte para separaciones electroforéticas, formado por la copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida

GEN: unidad básica de la herencia, comprende una sucesión específica de nucleótidos en la cadena de DNA que desarrolla una función específica y ocupa un lugar específico en un cromosoma; las formas alternas de un gen se denominan alelos.

GENOTIPO: constitución hereditaria o genética de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos.

GERMOPLASMA: variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos.

HAPLOTIPO: constitución genética de un individuo con respecto a uno de los miembros de un par de genes alélicos. Un haplotipo puede referirse a un locus o a todo el genoma, a nivel de genoma, un haplotipo comprendería la mitad de un genoma diploide incluyendo un alelo de cada par de alelos de un gen.

INTRONES: secuencias de ADN que no codifican genes y cuya función es desconocida.

KILOBASE (Kb): unidad empleada para medir la longitud de los fragmentos de ADN constituidos por una serie de bases. 1 Kb = 1.000 bases.

LOCI: latín, plural de locus

LOCUS: punto particular del cromosoma en el que se encuentra el gen que determina un rasgo determinado. Loci, plural de locus.

MONOFILÉTICO: derivado del mismo taxón ancestral; grupo que comparte el mismo antepasado común.

MONOMÓRFICO: población con respecto a la cual un alelo particular está presente en todos sus miembros.

MUTACIÓN: cambio del material genético. Puede afectar a cambios en un par de bases del ADN, en un gen específico o en la estructura cromosómica. La mutación en la línea germinal o relativa a las células sexuales, puede conducir a patologías genéticas o a cambios substanciales de la evolución biológica.

POBLACIÓN MENDELIANA: comunidad en la que sus individuos se reproducen y en la que se pueden identificar los procesos de segregación y recombinación según las leyes de Mendel.

POLIMÓRFICO: coexistencia de dos o más formas segregantes discontinuas, determinada genéticamente, en una población en donde la frecuencia del tipo más raro no se mantiene solo por mutación. Son las diferentes formas de un alelo en un locus.

SINAPOMÓRFIA: carácter derivado compartido entre dos o más de dos taxones o grupo de secuencias, debido a un antecesor común.

TFPGA: Tools For Population Genetic Analysis. Software especializado para el cálculo de parámetros genéticos de poblaciones.

UPGMA: Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean. Procedimiento diseñado para proporcionar a los usuarios una representación gráfica de los datos de distancia genética de los cuales se puede realizar inferencia de las relaciones entre poblaciones

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar, mediante el marcador molecular RAPD, la diversidad genética existente en tres poblaciones de *Cavia porcellus*. Para este fin se utilizaron 12 animales por línea para un total de 36 individuos. Cada línea se considero como una población que se identificó como, mascota o línea 1, criollo o línea 2, y mejorada genéticamente o línea 3.

Para obtener el ADN, se extrajo sangre mediante punción cardiaca, en cantidad que varió entre 0.5 y 2.5 ml. Las muestras se almacenaron en tarjetas FTA y se transportaron hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, donde se llevaron a cabo los procesos de purificación y extracción, acorde con lo indicado por la casa fabricante con las modificaciones descritas por Burgos *et al*, (2007) y de amplificación, según lo sugerido por Chiappero y Gardenal, (2003), quienes para el orden Rodentia recomiendan utilizar veinte cebadores, los cuales fueron sintetizados por la casa IDT Technologies y se probaron por primera vez en el *Cavia porcellus* en esta investigación.

De los veinte cebadores inicialmente estudiados, se escogieron seis para realizar los análisis finales, puesto que indicaron mayor especificidad para el *Cavia porcellus*, de acuerdo con su Contenido Informativo Polimórfico (PIC).

Los seis cebadores seleccionados produjeron un total de 526 bandas en las tres poblaciones, con las que se construyó la matriz de datos presencia-ausencia de bandas, con la que se calculó mediante el programa TFGA, el porcentaje promedio de loci polimórficos en 92.02% y la heterocigosidad esperada en 0.20 ± 0.0445 . Con el programa WINAMOVA se obtuvieron los valores ϕ_{ST} , análogos del estadístico F_{ST} , que variaron entre 0,1907 ($P=0,0320$) con el cebador B03, hasta 0,6136 ($P=0,0000$) con el cebador B02, valores que se consideran entre grandes y muy grandes, e indican separación de las poblaciones debida a las diferencias en las frecuencias alélicas.

Esta diferenciación se confirmó mediante los análisis de distancia genética y agrupamiento (UPGMA), cuyos resultados indicaron separación genética entre las líneas criollas y la mejorada y un mayor grado de similitud entre las primeras, en las que además se presentó mayor pérdida de variabilidad genética.

Los resultados de esta investigación, permiten recomendar al marcador molecular RAPD como una herramienta útil para determinar la variabilidad genética de poblaciones de *Cavia porcellus*, y en la ejecución de programas de conservación y selección con fines de Mejoramiento Genético en esta especie.

ABSTRACT

The main goal of this research work was to determinate the genetic variability in three populations of *Cavia porcellus* with the RAPD molecular marker. In order to achieve the goal 12 animals per line were analyzed for a total of 36 individuals. Each line was considered as a population, identified as “pet” or line 1, “creoles” or line 2 and “genetically improved” or line 3.

To obtain DNA, the blood was extracted trough heart puncture. The amount extracted ranged between 0.5 and 2.5 ml. The samples were stored in FTA cards and then carried to molecular laboratory of the Universidad del Valle in order to purify and extract the DNA taking into account the specifications of the manufacturing house with the modifications recommended by Burgos *et al*, (2007). The amplifications were made according to Chiappero y Gardenal, (2003) who recommended using twenty primers for Rodentia. The primers were synthesized by IDT Technologies Company, which were never tested in *Cavia porcellus* prior to this research work.

Out of twenty primers selected for the final analysis, six were chosen. Those six showed the biggest specificity in *Cavia porcellus* in according to its Polymorphism Information Content (PIC).

526 bands were obtained in the three populations with the six primers. These bands were used to construct the presence-absence data matrix. The TFPGA program was used to calculate the percentage of polymorphic loci, 92.02% and expected heterocigosity 0.20 ± 0.0445 . The ϕ_{ST} values, analogies to F_{ST} values were calculated with the WINAMOVA program. These values had a variation ranging between 0,1907 ($P=0,0320$) with primer B03, up to 0,6136 ($P=0,0000$) with primer B02. These results are considerate to be significant and showed differentiation among populations by the differences in the allelic frequency.

The differentiation was confirmed through UPGMA and genetic distances analysis which showed genetic separation between creole lines and genetically improved line. Creoles lines also presented greater similarity and showed high loss of genetic variability.

The results in this research allow recommending the RAPD molecular marker as a useful tool to determine the *Cavia porcellus* populations' genetic variability and in the implementation of conservation programs and genetic improvement programs of this specie.

INTRODUCCION

La producción de cuyes *Cavia porcellus* Lin. constituye uno de los principales renglones de la economía en el departamento de Nariño, donde se encuentran distintos niveles de tecnificación, desde el familiar hasta el comercial, de tal manera que la cuyicultura genera ingresos a muchas familias y al mismo tiempo juega un importante papel en la seguridad alimentaria de la región andina.

Si bien las técnicas de producción tradicionales se han mantenido a lo largo de muchos años, en la actualidad son evidentes los avances tecnológicos en procura de obtener animales más precoces y con mejores características para satisfacer las necesidades del mercado.

Según Caicedo¹, desde hace aproximadamente unos 20 años se han importado reproductores de *C. porcellus* provenientes principalmente de Perú. Los productores han buscado aumentar el desempeño productivo y reproductivo de los animales mediante la hibridación con el material genético local.

Para Solarte, Soto y Pérez², el flujo permanente de genes de estas variedades, podrían producir una saturación de los mismos, producto de la consanguinidad por efectos de la selección intensiva, hecho que reduciría la diversidad genética existente en los cuyes criollos de Nariño, los cuales jamás fueron objeto de un programa de selección intrapoblacional, es decir que la introducción de estas líneas mejoradas a nuestro país y más exactamente al departamento de Nariño, como lo sugiere Segura y Montes³, se hizo a expensas de las líneas criollas adaptadas a las condiciones locales y los efectos del vigor híbrido del cruzamiento enmascararon la pérdida de variabilidad genética.

Los estudios con marcadores moleculares son una herramienta eficaz para determinar el grado de variabilidad genética existente en las poblaciones y su aplicación en los programas de mejoramiento. Según Carrera, Tranquilli y

¹ CAICEDO Alberto. Experiencias investigativas en la producción de cuyes. Pasto : Universidad de Nariño, 1999. p. 506

² SOLARTE, Carlos; SOTO, Fernando y PÉREZ, T. Modelo Animal Multicarácter para la selección de reproductores *Cavia porcellus* en Colombia. En: Revista Cubana de Ciencias Agrícolas. Vol. 36, No. 1 (2002); p. 25

³ SEGURA CORREA, José y MONTES PÉREZ, Rubén. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. En: Revista Biomed. Vol. 12, No. 3 (jul. – sep. 2001); p. 199

Helguera⁴, los marcadores pueden aportar una ventaja muy importante basada en su naturaleza molecular ya que la selección se complementa con la información fenotípica y se identifican rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes, con lo que se favorece la incorporación de varios genes de interés en un fondo genético.

Por otro lado, los estudios con marcadores moleculares pueden ser utilizados para identificar correctamente un individuo y establecer el grado de similitud con otros de la misma o diferente población. En el caso de los cuyes, Solarte *et al.*⁵, en un trabajo realizado conjuntamente entre las Universidades de Nariño y del Valle mediante el marcador molecular AFLP, estimaron la variabilidad genética y determinaron la estructura poblacional entre tres líneas, dos criollas y una mejorada genéticamente. Este trabajo constituye el único antecedente de estudios moleculares en los cuyes destinados a la producción de carne.

Para Fernández⁶, los RAPD, (polimorfismos de ADN amplificados al azar), permiten estimar la variabilidad genética presente en las poblaciones. El procedimiento se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando fragmentos de ADN que se separan por electroforesis, y de esta manera se visualiza una serie de bandas que dan una clara idea del polimorfismo presente en el genoma de los distintos individuos.

En el presente estudio se logró determinar la variabilidad genética en tres líneas de *C. porcellus* mediante el marcador molecular RAPD, la presencia de alelos privados en cada línea y la similitud o dispersión de las poblaciones. Por ultimo los resultados obtenidos con la técnica RAPD fueron contrastados con los resultados encontrados en el estudio con el marcador molecular AFLP.

⁴ CARRERA, Alicia; TRANQUILLI, Gabriela y HELGUERA Marcelo. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires : INTA, 2004. p. 152.

⁵ SOLARTE, Carlos; CARDENAS, Heiber; ROSERO, Carol y BURGOS, William. Caracterización molecular de tres líneas de *Cavia porcellus* mediante el marcador molecular AFLP. En: Revista colombiana de ciencias pecuarias. Vol. 20, No. 1 (2007); p. 49.

⁶ FERNÁNDEZ, Hilda. Uso de marcadores moleculares RAPD en la caracterización de bancos de germoplasma en Venezuela. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela CENIAP HOY. [Online], No. 5. may.-ago. 2004 [cited 25 September 2005]; Available from internet:<www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n5/arti/hfernandez.htm>

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En los cuyes, al igual que en otras especies animales, la clasificación de un ejemplar en una u otra línea se lleva a cabo mediante el análisis de los marcadores fenotípicos, cuando se carece de estudios sobre la diversidad genética, a través de la observación de marcadores en la molécula de ADN. Sin embargo, en la última década se han realizado diversos trabajos de investigación referentes a dichos marcadores, cuyos resultados ofrecen grandes perspectivas de beneficio para la producción y la salud animal.

En el caso concreto de los cuyes, es necesario consolidar la trayectoria investigativa de la Universidad de Nariño en el área de Genética y una manera de incursionar en este campo es mediante el estudio de los marcadores moleculares y su aplicación en aspectos como la correcta identificación de las líneas de *Cavia porcellus* existentes, el estudio de la variabilidad genética con el objetivo de preservar genofondos y desarrollar programas de selección y mejoramiento asistidos con marcadores de ADN.

En cualquier programa de preservación de los patrimonios genéticos, un paso previo e indispensable es el estudio de la variabilidad existente entre y dentro de las poblaciones, ya que así se puede establecer las diferencias o similitudes genéticas de las mismas y de esta manera se facilita el diseño de las estrategias conducentes a evitar la erosión Genética

El marcador molecular RAPD, permite determinar la estructura existente de las poblaciones en estudio, con lo que se vence la dificultad de asignar individuos a cada línea considerando únicamente el fenotipo, además posibilita la cuantificación de la variabilidad genética existente, con lo que se dispone de una herramienta adicional para el seguimiento de los programas de Mejoramiento Genético.

La aplicación de la técnica RAPD, también permitirá corroborar los resultados obtenidos en cuanto a variabilidad Genética en la misma especie con el marcador molecular AFLP, donde de los cinco pares de cebadores utilizados, solo uno produjo información suficiente para establecer diferencias entre las poblaciones estudiadas, lo que indica la necesidad de utilizar otros marcadores y por ende con otro tipo de cebadores.

Por otra parte, con los resultados de la presente investigación es posible identificar genotipos mediante el análisis de alelos endémicos, enriqueciendo así el conocimiento a nivel genotípico de la especie.

Adicionalmente, el conocimiento de la diversidad genética es necesario a la hora de llevar un control de los límites de la selección o a la introducción de nuevos genotipos y puede, potencialmente, contribuir a una mayor ganancia genética por unidad de tiempo al combinar la información fenotípica con la información molecular, por la selección más temprana de individuos con genotipos favorables.

Las ventajas de los marcadores moleculares están debidamente documentadas en diversos aspectos de la producción animal y es necesario introducir estas técnicas en los programas de investigación del cuy, con el propósito de contribuir a la tecnificación de esta importante especie regional.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿EL marcador molecular RAPD permite establecer el grado de variabilidad genética inter e intraespecífica de tres líneas de *Cavia porcellus*? ¿Los patrones de variabilidad genética obtenidos con marcadores RAPD`s confirman los resultados obtenidos con marcadores AFLP`s en el *Cavia porcellus*?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la variabilidad genética inter e intraespecífica de tres líneas de *C. porcellus* mediante el marcador molecular RAPD y comparar los resultados con los patrones de variabilidad obtenidos previamente con marcadores AFLP's en los mismos animales.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Identificar alelos característicos que permitan asignar individuos a su correspondiente línea.
- Estimar la distancia genética existente entre dos líneas criollas y una mejorada genéticamente.
- Determinar la relación existente entre la variabilidad genética y los procesos de selección en las tres líneas de *C. porcellus*.

4. MARCO TEORICO

4.1 GENERALIDADES DEL CUY (*Cavia porcellus*).

Como menciona Chauca⁷, el *C. porcellus* es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, Forma parte de la alimentación del hombre, debido a su fácil manejo y el sabor de su carne. Las ventajas de la crianza de cuyes incluyen su calidad de especie herbívora, su ciclo reproductivo corto, la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas y su alimentación versátil que utiliza insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos.

Según Caicedo⁸ en Colombia, la producción de esta especie se encuentra concentrada en el Departamento de Nariño, con un número aproximado de 2.5 millones de ejemplares y su producción va desde el nivel familiar, hasta la producción tecnificada.

En la zona se diferencian fenotípicamente algunas líneas de *C. porcellus*, de las cuales tres se incluyeron en el presente estudio con las siguientes denominaciones:

Cuyes criollos de pelo corto: se encuentran en mayor cantidad en las áreas rurales y en sistemas de producción tradicional o familiar, son animales pequeños, generalmente de color negro con mezcla de blanco y amarillo, presentan índices productivos bajos y son poco exigentes en cuanto a condiciones de manejo. Son animales de crianza familiar, en donde no existe un control de la producción, de ahí que sean animales presumiblemente consanguíneos, sin sometimiento a un proceso de selección artificial, posiblemente expuestos a deriva génica y con selección negativa por la extracción de animales de buen tamaño para la comercialización, dejando los pequeños como pie de cría.

⁷ CHAUCA, Lilia. Producción de cuyes *Cavia porcellus*. FAO INIA [online], 1997 [cited 20 September 2005]: Available from internet: <www.fao.org>

⁸ CAICEDO, Op. Cit., p. 509

Figura 1. Cuy criollo de pelo corto



Cuyes criollos de pelo largo: son animales poco prolíficos, de baja ganancia de peso y rendimiento en canal, lo que ha dificultado su explotación con fines comerciales; son de colores claros en los que predomina el blanco y por las características de su pelaje y piel tendrían un uso potencial para la producción de piel y pelo o como mascotas.

Figura 2. Cuy criollo de pelo largo



Cuyes mejorados: Solarte *et al*⁹ aseguran que estos animales han sufrido un proceso de selección, que se inició con el cruzamiento de animales criollos con animales importados del Perú desde el año de 1975 con miras a incrementar el potencial productivo. Son animales que requieren una alimentación balanceada con forrajes y concentrado, sistemas de alojamiento en jaulas o pozas y planes de sanidad. Esta línea se caracteriza por su precocidad, mayor ganancia de peso y mayor tamaño de camada; se encuentran ampliamente distribuidos en la región y en los sistemas de explotación tecnificados o semi tecnificados. Su pelo es corto y de colores claros como el amarillo, blanco, rojo, en menor escala el gris y la mezcla de todos los anteriores.

⁹ SOLARTE, Caracterización molecular de tres líneas de *Cavia porcellus* mediante el marcador molecular AFLP Op. Cit.,p.50

Figura 3. Cuy mejorado genéticamente



4.1.1 Mejoramiento Genético Aplicado en *Cavia porcellus*. Para Chauca¹⁰, Los cuyes desde su domesticación han sido sometidos a una selección natural y han mantenido una gran variabilidad genética, se han multiplicado y producido individuos similares a sus progenitores, pero a lo largo de ese tiempo deben haber sufrido mutaciones que les han permitido sobrevivir en medios adversos.

Solarte y Viteri¹¹, mencionan, que la necesidad de obtener cuyes con índices productivos mas altos ha motivado la selección por el mérito genético de los reproductores y para esto se han aplicado modelos de evaluación genética con métodos tradicionales como la selección masal y el cruzamiento, como principales herramientas.

Según Solarte, Soto y Pérez¹², el Mejoramiento Genético para esta especie, se ha basado en los métodos y procedimientos de la genética cuantitativa aplicada, básicamente para la estimación de heredabilidades y otros parámetros con modelos que cada vez han adquirido mayor complejidad, con el fin de seleccionar con mayores niveles de confiabilidad los reproductores de mérito genético superior, principalmente para rasgos como la velocidad de crecimiento y el tamaño de camada.

En cuanto a los análisis con técnicas moleculares en el orden Rodentia, la mayor parte de las investigaciones se ha orientado a las especies silvestres, con el objetivo de determinar la estructura y función de las poblaciones, debido a su

¹⁰ CHAUCA, CHAUCA, Lilia. Producción de cuyes *Cavia porcellus*. FAO INIA [online], 1997 [cited 20 September 2005]: Available from internet: <www.fao.org>

¹¹ SOLARTE, Carlos y VITERI, Luis. Índice de selección, prueba de progenie, y prueba de comportamiento en cuyes. En: Revista de Zootecnia. Vol. 4, No. 7 (2001); p. 36

¹² SOLARTE, Modelo Animal Multicarácter para la selección de reproductores *Cavia porcellus* en Colombia Op. Cit., p. 26

característica de hospedero de agentes causantes de enfermedades, como puede apreciarse en los trabajos de Almeida *et al.*¹³, Chiappero y Gardenal¹⁴, y Dragoo *et al.*¹⁵

Con respecto a *C. porcellus* se destaca el trabajo de Spotorno *et al.*¹⁶ el cual brinda una idea de su relación filogenética a partir de estudios de ADNmt y específicamente del gen de citocromo b. en este estudio se determinó que el pariente más cercano a *C. porcellus* es el *Cavia Tshudii*, además *C. porcellus* cuenta con un antecesor común reciente y los animales criollos no forman un grupo monofilético con los cuyes mejorados peruanos.

Respecto a estudios moleculares tendientes a la evaluación de poblaciones de *C. porcellus* con fines de mejoramiento genético solo ha sido desarrollado el proyecto denominado “caracterización molecular de tres líneas de *C. porcellus* mediante el marcador molecular AFLP” Solarte *et al.*¹⁷, que es el primer estudio de esta categoría que se realiza en esta especie en Colombia. Este estudio permitió establecer una relación monofilética entre las dos líneas criollas y su separación de la mejorada genéticamente, debido a la selección intensiva que ocasiono la absorción del genotipo criollo por el peruano; además determino que existe una baja variabilidad intrapoblacional causada por la intensidad de selección en la población mejorada y el bajo tamaño efectivo de las poblaciones criollas.

4.2 GENERALIDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES

Para Lui y Cordes¹⁸, hasta no hace muchos años, las principales técnicas de diagnóstico de variabilidad genética se basaban en métodos de interacción entre productos mas o menos cercanos al ADN, principalmente las proteínas. Según

¹³ ALMEIDA, Francisca; MOREIRA, Miguel; BONVICINO, Cibele y CERQUEIRA, Rui. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 23 No. 4 (2000); p. 793

¹⁴ CHIAPPERO, M y GARDENAL, C. Restricted gene flow in *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae). The natural reservoir of junin virus. En: Journal of Heredity. Vol. 94 No. 6 (2003); p. 490

¹⁵ DRAGOO, J; SALAZAR BRAVO, J; LAYNE, L y YATES, T. Relationships within the *Calomys callosus* species group based on amplified fragment length polymorphisms. En: Biochemical Systematics and Ecology. No. 31 (2003); p. 704

¹⁶ SPOTORNO, Ángel; VALLADARES, Jhon; MARÍN, Juan y ZEBALLOS Horacio. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationship with the Andean wild species *Cavia tshudii*. En: Revista Chilena de Historia Natural. Vol. 77 No. 2 (2004); p. 247

¹⁷ SOLARTE, caracterización molecular de tres líneas de *Cavia porcellus* mediante la aplicación de la técnica AFLP. Op. Cit., p.49

¹⁸ LIU, Z y CORDES, J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. En : Aquaculture. 238 (2004); p. 5

San Primitivo¹⁹, el descubrimiento de los polimorfismos (1970-1980) en las secuencia de ADN condujo a identificar diferencias entre los individuos, gracias a la aparición de enzimas de restricción, que cortaban la cadena de ADN y permitían identificar los polimorfismos.

Pero es a partir de 1980, con el descubrimiento de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis & Faloona²⁰, cuando se logra el mayor avance en cuanto a la detección de polimorfismos. Este descubrimiento ha conllevado el desarrollo de diversas técnicas moleculares que combinan eficientemente el uso de las enzimas de restricción y la amplificación de segmentos de ADN, vía PCR.

Los marcadores moleculares funcionan como señaladores en diferentes regiones del genoma y permiten determinar variaciones en la secuencia de ADN, con lo que se facilitan los estudios en genética de poblaciones, identificación de individuos, análisis de diversidad genética, selección asistida por marcadores y detección de genes para características cuantitativas a través de QTL's.

Según Picca *et al.*²¹, un marcador debe mostrar variaciones detectables entre individuos y que se hereden de forma mendeliana, evaluada desde cambios fenotípicos, hasta variación en un solo nucleótido, además de ser insensible a cambios ambientales.

El interés por detectar variación molecular para diversas aplicaciones ha conducido a un enorme incremento en el tipo y número de marcadores disponibles para análisis genético, entre los que se destacan los RFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción) que involucra la detección de un segmento específico de ADN mediante la hibridación con un fragmento marcado radioactivamente y enzimas de restricción; los que combinan enzimas de restricción y PCR como los AFLP's (polimorfismo de fragmentos amplificados de longitud variable) y los que combinan cebadores o "primers" y PCR como los RAPD's (fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente) y los microsátélites o secuencias repetidas en tandem.

¹⁹ SAN PRIMITIVO, F. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo xx. En : Archivos de zootecnia. Vol. 50 No. 192 (2001); p.526

²⁰ MULLIS, K B y FALOONA, F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. En : Methods Enzymol, No. 155 (1987); p. 335

²¹ PICCA, Aurora; HELGUERA, Marcelo; SALOMÓN, Nelly y CARRERA, Alicia. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires : INTA, 2004. p. 64.

4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR. Como menciona Taylor²², la reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica usada para la amplificación en el número de copias de regiones específicas de ADN. Para Sharma, Singh y Sharma²³, es una técnica potente que se ha convertido rápidamente en una de las más ampliamente usadas en la Biología Molecular porque es rápida, de bajo costo y sencilla. La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón, aun cuando ese ADN sea de calidad relativamente baja, y produce una gran cantidad de ADN específico a partir de una muestra compleja de ADN.

El procedimiento general de PCR es llevado a cabo con una mezcla de reacción que contiene una muestra de ADN de doble hélice, dos primers o cebadores específicos, aunque para el caso de los RAPD's solo se utiliza un primer o cebador, dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatos), una ADN polimerasa y un buffer que contenga magnesio (Mg^{+2}).

4.2.1.1 Los primers o cebadores. Son oligonucleótidos sintetizados con un rango de siete a 30 bases que hibridizan la región final 5' de la secuencia blanco. Taylor²⁴ afirma que es posible la utilización de cebadores con un número menor de bases, los cuales pueden ser usados en ADN de menor complejidad como en plásmidos o ADN preamplificado. Una de las características importantes de estos cebadores es que se debe evitar su complementariedad particularmente en la región 3', pues así se lograra evitar la formación de dímeros.

4.2.1.2 Muestra de ADN. En cuanto a la muestra de ADN, ésta debe estar libre de contaminación, sin ningún tipo de sustancia, como detergentes o EDTA, ya que como mencionan Sharma, Singh y Sharma²⁵, estas sustancias reducen la eficiencia de la técnica PCR, incluso se necesita que la muestra no este contaminada con ADN de otra especie, puesto que la PCR es de tan alta sensibilidad que solo se necesita de unos pocos picogramos de ADN para que lo amplifique. Cantidades altas de ADN aumentan la amplificación de secuencias de ADN no específicas.

²² TAYLOR, G. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. PCR a practical approach. s. l.: M.J. McPherson, 1991. p. 21

²³ SHARMA, Rishi; SINGH, Manjeet y SHARMA, Ajay. Polymerase chain reaction: an emerging tool for research in pharmacology. En: Indian Journal of Pharmacology. Vol.34 (2002); p. 229

²⁴ TAYLOR, Op. Cit., p. 70

²⁵ SHARMA, Op. Cit., p. 230

4.2.1.3 dNTP's. La concentración de cada **dNTP** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción debe ser igual para que haya una incorporación igual de nucleótidos en la extensión.

4.2.1.4 Buffer de reacción. Es una vía para la adición de Mg^{+2} , el cual forma complejos con los cebadores y los patrones de ADN. El Mg. forma un cofactor con la ADN polimerasa, además interactúa con los dNTP's de tal modo que si se incrementa la concentración de dNTP's puede ser necesario incrementar la concentración de magnesio, de ahí que se deba establecer la concentración óptima de $MgCl_2$ para cada experimento. Si los iones Mg^{+2} son demasiado escasos, se obtiene un bajo rendimiento del producto de la PCR y si son demasiado abundantes, aumentará el rendimiento de productos no específicos, es decir complejos formados por los componentes de reacción.

4.2.1.5 ADN polimerasa. Según Ferreira y Grattapaglia²⁶, en las primeras pruebas de PCR, se utilizó la enzima ADN polimerasa de *Escherichia coli* y se agregaba manualmente en cada ciclo pues por su característica termolábil, se destruía al llegar a los 95°C. El avance significativo de la técnica PCR se dio como tal con el aislamiento de la ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* que se encuentra en fuentes térmicas y mantiene su actividad a 95°C por algunas horas, a esta se la denominó *Taq* DNA polimerasa, y dejó a un lado la adición de esta en cada ciclo, y solo se agrega el volumen necesario a la mezcla de componentes de reacción. La *Taq* DNA polimerasa tiene un rango de actividad entre 65 y 72°C y amplifica fragmentos mayores de 1Kb.

El procedimiento de la PCR se realiza en tres etapas correspondientes a un ciclo que son: desnaturalización, hibridación y extensión.

El proceso inicia con la **desnaturalización** del ADN, los componentes de la reacción se calientan de 92-96°C, con el fin de reducir la cadena de doble hélice de ADN a cadenas simples, el tiempo de este paso depende de la complejidad de la hélice, por ejemplo cadenas con gran cantidad de C≡G necesitara mas tiempo para romper el triple enlace que los une. La mayor cantidad de fallas en la PCR se debe a que no se emplea una temperatura adecuada durante la desnaturalización. Enseguida se disminuye la temperatura de 37 a 65°C en este momento inicia la segunda etapa, **hibridación**, en donde la temperatura depende del tamaño y secuencia del primer, el cual hibrida con las regiones complemento de la secuencia blanco desde la parte final 5' del cebador, formando nuevamente

²⁶ FERREIRA, Márcio y GRATTAPAGLIA, Darío. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia : EMBRAPA- CENARGEN, 1998 p. 38.

cadenas dobles de ADN a partir de cadenas sencillas. Luego la temperatura sube a los 72°C, para que la enzima *Taq* polimerasa realice la **extensión** de la cadena a partir de cada terminal 3'. Sharma, Singh y Sharma²⁷ sugieren que la enzima se encarga de leer la secuencia de la cadena opuesta y extiende los cebadores agregando nucleótidos en el orden en que puedan emparejarse.

Este ciclo, según Ferreira y Grattapaglia²⁸, se repite varias veces generando así en cada ciclo un duplicado de la secuencia blanco, por lo tanto, el producto de la amplificación por PCR incrementara de manera exponencial y después de 20 ciclos se producirá mas de un millón de veces la cantidad de secuencia blanco.

4.2.2 Polimorfismo de ADN amplificado al azar – RAPD's. La técnica RAPD, del ingles Random amplified polymorphic DNA desarrollada por Williams *et al.*²⁹, es una técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, y se basa en la amplificación de segmentos de ADN utilizando primers o cebadores generalmente cortos de tamaño de 10 pares de bases. Sin embargo según Picca *et al.*³⁰, para que se presente una banda RAPD es necesario que la doble cadena del ADN, presente sitios e hibridación con el primer en orientación opuesta y a una distancia no mayor de 3000pb (pares de bases), aunque Ferreira y Grattapaglia³¹ aseguran que la amplificación puede ocurrir si las secuencias de ADN complementarias están a una distancia menor a 4000pb.

Becerra y paredes³² afirman que una de las ventajas de los RAPD es que no se necesita del conocimiento previo de la secuencia del genoma estudiado, así que el primer hibridizará de manera aleatoria a lo largo del genoma, produciendo fragmentos de secuencia desconocida que dependerán del genoma en estudio, del primer y de las condiciones de la reacción.

Una vez los fragmentos son amplificados la separación de éstos se hace por medio de un gel, que bien puede ser de agarosa y tinción con bromuro de etidio o si se desea mayor resolución se puede realizar en geles de poliacrilamida y tinción

²⁷ SHARMA, Op. Cit., p. 230

²⁸ FERREIRA, Op. Cit., p. 38

²⁹ WILLIAMS, Jhon; KUBELIK, Anne; LIVAK, Kenneth; RAFALSKI, J Antoni y TINGEY, Scott. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. En: Nucleic Acids Research. Vol. 18, No. 22 (1990); p. 6531

³⁰ PICCA, Op. Cit., P. 65

³¹ FERREIRA, Op. Cit., p. 40

³² BECERRA, Viviana y PAREDES, Mario. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. En: Agricultura Técnica Chile. Vol. 60, No. 3 (jul.-sep. 2001); p. 274

con plata, y el polimorfismo entre los individuos se determinará por la presencia o ausencia de las bandas.

Según Ferreira y Grattapaglia³³, el marcador RAPD posee un comportamiento dominante, es decir, al observar una banda en el gel, no se puede distinguir si esa banda se originó de una o dos copias de la secuencia y solo es posible distinguir a los homocigotos y no a los heterocigotos, además la técnica RAPD solo detecta un alelo por locus de ahí que la ausencia de la banda, se pueda deber a factores de mutación, inserción o delección.

Becerra y paredes³⁴ afirman también que la técnica RAPD permite una obtención rápida de resultados, pues no requiere de conocimiento previo de la secuencia del genoma, ni de sondas como en el caso del marcador RFLP, el costo de la técnica es bajo, pues no se necesita de marcaje radioactivo ni de laboratorios especializados para este tipo de proceso, el hecho de utilizar primer arbitrarios permite un estudio de todo el genoma siendo así mas sensible para detectar polimorfismos en la secuencia de ADN.

Por otro lado, Liu y Cordes³⁵ mencionan dentro de las desventajas con que cuenta la técnica, su característica dominante, lo que conlleva a pensar que la ausencia de la banda a una secuencia determinada, no se pudo distinguir debido a procesos de mutación que no permitieron la hibridación del primer, o a mala calidad del ADN entre otros, contribuyendo a una ambigüedad de los resultados

Dado lo anterior, al trabajar con esta técnica, Hatanaka y Galetti³⁶ recomiendan que se debe asumir previamente que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, presentan segregación mendeliana de las bandas polimórficas y que no hay coomigración de alelos de diferente loci, es decir que no ocupan la misma posición en el gel.

Existen ciertos problemas de repetibilidad de los resultados obtenidos por la técnica, debido a su alta sensibilidad, ya que el mínimo cambio en el método de amplificación puede producir resultados diferentes, aun si se utiliza los mismos

³³ FERREIRA, Op. Cit., p. 47

³⁴ BECERRA, Op. Cit., p. 274

³⁵ LIU, Op. Cit., p. 12

³⁶ HATANAKA, Terumi; GALETTI, Pedro. RAPD Markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 26, No. 1 (2003); p. 20

primers, debido a factores entre los cuales está el grado de competencia entre los sitios de amplificación dada la homología con el primer en la extremidad 3' desde donde inicia la hibridación, por otro lado Ferreira y Grattapaglia³⁷, mencionan que las uniones entre bases C≡G son mas estables que A=T entonces el primer tomará mas tiempo en la hibridación de la secuencia. Estos factores pueden producir un menor número de bandas amplificadas y que en la visualización en el gel serán menos intensas, aunque esta desventaja se puede disminuir si se tiene una buena estandarización de los procesos en el laboratorio.

4.2.3 Polimorfismo de fragmentos de longitud variable – AFLP. La técnica de AFLP del ingles amplified fragment length polymorphisms desarrollada por Vos *et al.*³⁸, es un método relativamente nuevo que permite el análisis del ADN de organismos.

Esta técnica al igual que los RAPD no requiere de un conocimiento previo de la secuencia del genoma de la especie a estudiar, además, Dragoo *et al.*³⁹ Menciona que gracias al alto número de fragmentos que amplifica, permite una gran detección de la variabilidad genética de los individuos, combinando la especificidad y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción y la técnica de PCR.

Esta técnica consta de cuatro etapas, en la primera, el ADN es cortado con dos enzimas de restricción, una de corte raro (EcoRI) con 6-8 pb. y la otra de corte frecuente (MseI) con 4 pb. En la segunda etapa, se incorporan los adaptadores, que son terminales complementarios a los sitios donde realizó la enzima el corte, estos adaptadores tienen una longitud de 20-30 bases y luego se adicionan los primers de pre-amplificación que contienen un solo nucleótido arbitrario. En la tercera etapa una fracción de los fragmentos pre-amplificados son nuevamente amplificados, esto ya que se utiliza combinaciones de primers de 3 nucleótidos conocidos, (p.e. MseI AAG / EcoRI CGA). Para Becerra y paredes⁴⁰, una cuarta etapa consiste en la observación de las bandas que puede ser por medio de geles de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata. El polimorfismo de los AFLP depende en gran parte a la interacción que tengan los primers dirigidos con la complejidad del genoma.

³⁷ Ferreira, Op. Cit., p.47

³⁸ VOS, Pieter; HOGERS, Rene; BLEEKER, Marjo; REIJANS, Martin; VAN DE LEE, Theo; HORNES, Miranda; FRIJTERS, Adrie; POT, Jerina; PELEMAN, Johan; KUIPER, Martin y ZABEAU, Marc. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *En* : Nucleic Acids Research. Vol. 23, No. 21 (1995); p.4407

³⁹ DRAGOO, Op. Cit., p. 705

⁴⁰ BECERRA, Op. Cit., p. 275

Ferreira y Grattapaglia⁴¹ resumen las ventajas del marcador AFLP en tres principales, la primera es el gran número de fragmentos que se originan, siendo muy eficiente en el muestreo amplio del genoma; la segunda se desprende de la anterior y es la variabilidad genética que se puede obtener, pues explora el polimorfismo de presencia- ausencia de los sitios de restricción y la existencia o no de amplificación de secuencias aleatorias. La tercera es la robustez de la técnica frente a los RAPD's debido al uso de primers más largos en la etapa de PCR lo que aumenta la especificidad de la amplificación.

García *et al*⁴² menciona como limitación de los AFLP's su bajo contenido de información por locus, detectando solo un alelo o sea el fragmento que amplifica; las demás variaciones son clasificadas como la presencia de alelos nulos. En síntesis el marcador AFLP es de carácter dominante y los heterocigotos no se pueden diferenciar de los homocigotos.

4.2.4 Comparación de los marcadores RAPD y AFLP. El nivel de complejidad de los AFLP es mayor que los RAPD's ya que se requiere de un mayor número de reactivos y de equipos de biología molecular. La calidad del ADN es fundamental para el corte por medio de las enzimas de restricción, pues una mala digestión lleva consigo problemas de interpretación del polimorfismo asociados con pérdida de bandas o ADN desnaturalizado. La cantidad de ADN requerida es mayor que en los otros marcadores, requiriendo de 250 ng de ADN en comparación con RAPD que solo requiere de 10-30 ng.

Fernández⁴³, afirma que los RAPD's al igual que los AFLP's permiten estimar variabilidad genética a nivel de ADN, pero los RAPD's son mejores estimadores que los AFLP's para detectar huellas y establecer grados de similitud entre individuos, detectando la presencia de alelos particulares.

Hadrys, Balick y Schierwater⁴⁴ aseguran que los RAPD's, permiten analizar la posición de los genotipos en niveles diferentes taxonómicos. A nivel del individuo los RAPD's pueden ser aplicados al análisis de la familia, mientras que a nivel demográfico, pueden descubrir poblaciones híbridas, especie o subespecie. Como

⁴¹ FERREIRA, Op. Cit., p. 66

⁴² GARCIA, Antonio; BENCHIMOL, Luciana; BARBOSA, Antonia; GERALDI Isaías, SOUZA junior, Claudio y DE SOUZA, Anete. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *En* : Genetics and Molecular Biology. Vol. 27, No. 4 (2004); p. 580

⁴³ FERNANDEZ, Op. Cit., p. 2

⁴⁴ HADRY S H, BALICK M, SCHIERWATER B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *En* : Molecular Ecology. Vol. 1, No. 1 (1992); p. 56

lo muestra Morera, Capote y Garrido⁴⁵, donde la detección de genotipos híbridos se basa en la identificación de marcadores diagnósticos RAPD para genotipos paternos.

4.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Ferreira y Grattapaglia⁴⁶ mencionan que de los resultados obtenidos con los marcadores se obtiene una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas del germoplasma utilizado por el mejorador, proporcionándole así datos útiles para la selección de progenitores de las poblaciones básicas.

4.3.1 Diversidad Génica (Heterocigosidad). Un valor mas apropiado de la variación genética es el promedio de heterocigosidad o diversidad génica. Esta medida no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo; puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias génicas. Si se considera una población apareada al azar y X_i es la frecuencia en la población del i -ésimo alelo de un locus, la heterocigosidad para este locus se define como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Donde m es el número de alelos observados, el promedio de heterocigosidad (H) es la media de esta cantidad para todos los loci. Está claro que H es la proporción media de heterocigotos por locus escogidos al azar en una población y también la proporción esperada de loci heterocigotos en un individuo seleccionado al azar.

4.3.2 Estadísticos F. También llamados índices de fijación, fueron desarrollados por Sewall Wright⁴⁷ y miden la reducción de heterocigosis esperada al azar en cualquier nivel de jerarquía poblacional en relación a otro nivel más inclusivo de la misma.

La endogamia dentro de un subpoblación es causada por cruzamientos no aleatorios entre miembros de la misma, esa característica genera que los

⁴⁵ MORERA, L; BARBA, C Y GARRIDO J. Detección de variabilidad en razas caninas autóctonas españolas mediante marcadores RAPD. En : Archivos de Zootecnia. Vol. 50, No. 191 (2001); p. 381

⁴⁶ FERREIRA, Op. Cit., p. 74

⁴⁷ WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. En : Genetics 16 (1931); p. 97

individuos tengan un ascendiente común y por lo tanto un alto nivel de homocigosidad ocasionando por consiguiente un bajo nivel de heterocigosidad esperada. Cada estructura jerárquica está conformada por grupos de individuos (I) denominados subpoblación (S) dentro de una población total (T), a partir de este concepto, Wright introduce 3 estadísticos F, (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}) que pueden ser estimados a partir de la tasa de heterocigosidad esperada y observada:

F_{IS} , que mide la subdivisión intrapoblacional y se calcula así

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

Donde H_S es el promedio esperado de heterocigosidad estimado para cada subpoblación y H_I es el promedio de heterocigosidad observado para las subpoblaciones.

El estadístico F_{ST} , mide la subestructura poblacional generada por el coeficiente de endogamia, en otras palabras mide el grado de subdivisión a través de los efectos de aumento de endogamia con respecto a la población global sin subdivisión y se calcula así:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Donde H_T es el promedio esperado de heterocigosidad estimado para todas las subpoblaciones y H_S es el promedio esperado de heterocigosidad estimado para cada subpoblación. Si la diferencia entre H_T y H_S incrementa por lo tanto F_{ST} sería un estimador de la distancia genética existente entre subpoblaciones.

F_{IT} , mide la endogamia total, es decir es un coeficiente de endogamia en la población total resultado de la endogamia dentro de las subpoblaciones y el efecto Wahlund entre subpoblaciones y puede ser estimado de:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

Slatkin⁴⁸ afirma, que uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo genético, puesto que determina en que grado una población local de una especie es una unidad evolutiva

⁴⁸ SLATKIN, Montgomery. Gene flow and population structure. En : Ecological Genetics, Princeton University Press, Princeton, (1994); p. 3

independiente. La cantidad de flujo genético entre poblaciones locales, les permitirá evolucionar juntas, pero si no hay flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente y por ende no llegar al equilibrio.

4.3.3 Distancia genética. La distancia genética es muy útil para cuantificar el grado de diferenciación genética entre dos o más poblaciones de la misma especie. Los datos de electroforesis son los más usados para este propósito, ya que los loci han sido los encargados de representar las diferencias de una muestra al azar a lo largo del genoma. Muchos de los loci detectados electroforéticamente codifican proteínas, así podemos estimar la frecuencia (P_{ij}) del alelo i en la población j .

Nei⁴⁹, define la distancia genética como: “una medida entre poblaciones expresada como una función de la frecuencia del genotipo”. Es una medida estadística que provee una escala estandarizada para la cuantificación de las diferencias. Se ha creado gran variedad de medidas, pero la que se usa comúnmente es la distancia genética estandarizada de Nei para polimorfismos de proteínas.

Una medida de similaridad genética (I) se multiplica por el logaritmo natural (\ln) que genera un parámetro que es cero para genotipos que son completamente diferentes. La distancia genética estándar es $D = -\ln(I)$, donde I esta dada por $I = j_{xy} / (j_x j_y)$ es la probabilidad media (tomada sobre los loci) de que dos genes escogidos al azar, cada uno de diferentes poblaciones X y Y sean idénticos.

Por otra parte J_x y J_y representan la probabilidad media de que dos genes escogidos al azar de una población (X o Y respectivamente), sean idénticos.

Si la proporción de cambios de codones varía de locus a locus D será un sobreestimado. En este caso la distancia genética se estima con la misma formulación para D de Nei (1972), excepto que J_{xy} , J_x y J_y se calculan como promedios geométricos. Esto se designa como la distancia genética máxima D' .

⁴⁹ NEI, Masatoshi. Genetic distance between populations. *En*: The American Naturalist, Vol. 106, No. 949 (may.-jun. 1972); p. 283

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

Los animales incluidos en este estudio son procedentes de la Granja Botana de la Universidad de Nariño ubicada a 9 kilómetros de la Ciudad de San Juan de Pasto, en el sur occidente de la Republica de Colombia, con coordenadas 01 09' latitud norte y 77 08' longitud oeste, una altura de 2820 msnm, temperatura promedio de 12.7°C, 967 mm de precipitación pluvial media anual y humedad relativa de 73%⁵⁰

Para realizar los procedimientos de purificación y amplificación de ADN, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle en la ciudad de Cali, al sur occidente de la Republica de Colombia, con coordenadas 3°27'26" latitud norte, 76°31'42" longitud Oeste; tiene una altura promedio de 1000 msnm y temperatura promedio de 23°C.

5.2 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR

5.2.1 Colección, almacenamiento y transporte de las muestras de sangre en tarjetas FTA[®]. Las muestras utilizadas para éste estudio se obtuvieron de 36 animales machos. De éstos animales, doce pertenecían a la línea 1 o ejemplares criollos mascota; doce a la línea 2 o criollos de pelo corto y los doce restantes de la línea 3 o animales mejorados genéticamente y que son utilizados en la actualidad como pie de cría en las explotaciones tecnificadas y semitecnificadas de la región⁵¹, en la Tabla 1 se indica la identificación de cada individuo.

La extracción de sangre se realizó en el laboratorio de fisiología de la Universidad de Nariño, mediante punción cardiaca en animales no mayores de 3 meses, bajo condiciones de asepsia idóneas, como se puede apreciar en la Figura 4. siguiendo

⁵⁰ INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). 1999. reporte de climatología de la estación botana. pasto, Colombia. 5 p

⁵¹ CAICEDO Alberto. Experiencias investigativas en la producción de cuyes. Pasto: Universidad de Nariño, 1999.

las especificaciones descritas por Burgos *et al*⁵², La cantidad de sangre extraída por animal varió entre 0.5 y 2.5 c.c.

Para efectos del análisis poblacional, cada línea se consideró una población y para la identificación de cada individuo se asignó el número de la respectiva población y luego el correspondiente código individual; por ejemplo el animal 3 de la población 1 se identificó con el numero 103.

Tabla 1. Descripción de las líneas comerciales e identificación de los individuos de *Cavia porcellus* analizados.

LÍNEA 1. MASCOTAS		LÍNEA 2. CRIOLLOS		LÍNEA 3. MEJORADOS	
Individuo	Identificación	Individuo	Identificación	Individuo	Identificación
279k	101	303k	201	530	301
290k	102	255k	202	588	302
295k	103	309k	203	596	303
276k	104	283k	204	603	304
277k	105	382k	205	555	305
204k	106	263k	206	590	306
209k	107	322k	207	10	307
214k	108	270k	208	16	308
221k	109	210k	209	24	309
234k	110	261k	210	22	310
128Cr	111	301k	211	598	311
57Cr	112	317k	212	582	312

Figura 4. Extracción de sangre mediante punción cardiaca.



⁵² BURGOS, William; ROSERO, Carol; CARDENAS, Heiber y SOLARTE, Carlos. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA[®] para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). Vol. 20, No. 1 (2007); p. 68

Una vez extraída la muestra, la sangre se preservó en tarjetas FTA[®] Whatman Bioscience, Clasic card CAT No. WB12 0205., las cuales conservan el ADN al inactivar la acción de las DNAsas.

Como se muestra en la figura 5, en cada tarjeta se almacenaron cuatro muestras de individuos diferentes. Se adicionaron dos gotas de sangre por individuo, dentro del área circular delimitada y posteriormente se codificó cada muestra anotando el número correspondiente en la parte inferior de la tarjeta.

Todas las muestras se secaron a temperatura ambiente durante una hora, según lo indicado por la casa fabricante⁵³. Pasado este tiempo las tarjetas se envolvieron en papel aluminio en grupos de 25 y se almacenaron en un lugar fresco y aislado de la luz solar como se puede apreciar en la Figura 6.

Figura 5. Preservación de las muestras de sangre en Tarjetas FTA



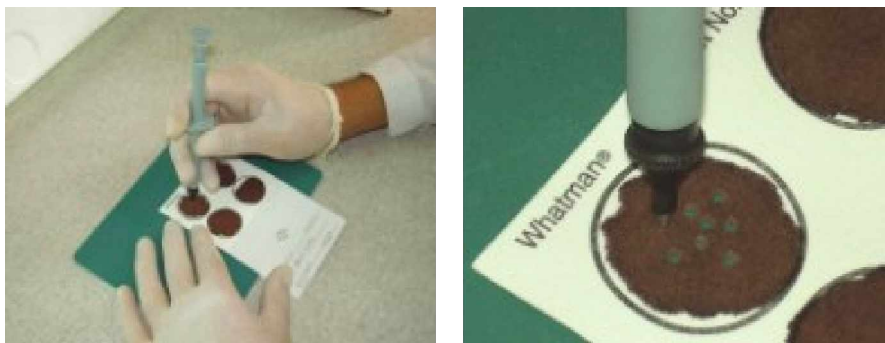
⁵³ WHATMAN. FTA[®] Protocols: Collect Transport, Archive and Access Nucleic Acids...All at Room Temperature. [online], 2002 [cited septiembre 2005]; Available from internet:< <http://www.cosmobio.com.ar/docs/FTA%20Protocols.pdf2002>>

Figura 6. Almacenamiento de las tarjetas de FTA



5.2.2 Extracción de ADN. Para la obtención de ADN de *Cavia porcellus* se utilizó el kit FTA de la casa fabricante Whatman Biosciences, el cual incluye las tarjetas de aislamiento FTA, el buffer de extracción de ADN (FTA Purification Reagent No. WB12-0204) y el instrumental para corte de discos FTA (Harris Micropunch 1.2 mm with Math No. WB10-0005). Por cada muestra almacenada en la tarjeta, se corto un disco de 1.2 mm como se puede ver en la Figura 7.

Figura 7. Extracción de un disco de la tarjeta FTA



El disco extraído de la tarjeta FTA, se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, donde se adicionaron 200 μ l del buffer de extracción y se incubó por cinco minutos, mientras se agitó suavemente mediante inversión. Pasados los cinco minutos se descartó el buffer del tubo sin retirar el disco, este procedimiento se repitió tres

veces hasta que el disco tomo un color blanco y se eliminaron los residuos de hemoglobina.

Luego se adicionaron 200µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) incubando por cinco minutos y agitando por inversión; pasados los cinco minutos se retiró el buffer, dejando el disco dentro del tubo. Este procedimiento se repitió dos veces a fin de eliminar cualquier tipo de agente contaminante de la tarjeta. Finalmente los discos se dejaron secar durante dos horas a temperatura ambiente.

5.2.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica RAPD. Para la amplificación de los fragmentos de ADN se siguió el protocolo descrito por Chiappero y Gardenal⁵⁴, con las modificaciones descritas por Burgos *et al*⁵⁵ para el uso de tarjetas FTA en *Cavia porcellus*.

Como muestra de ADN, se utilizó un disco FTA de 1.2 mm, previamente tratado con el buffer de extracción y de lavado el cual, según la casa fabricante⁵⁶, contiene aproximadamente de 5 a 25 ng de ADN.

El volumen final de reacción para la PCR fue de 25µl el cual contenía: Buffer 1X (10mM Tris HCl pH 8.3, 50mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM de cada dNTP, 0.45 µM de primer (IDT Technologies) y una unidad de *Taq* polimerasa (Promega), el volumen se completó con agua miliQ estéril según lo indicado por Burgos *et al*⁵⁷.

La amplificación de fragmentos se llevo a cabo en un termociclador Perkin Elmer (Figura 8a), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 92°C por 5 min. seguido de 45 ciclos, cada ciclo de 1 min a 92°C, 1 min. a 35°C y 2 minutos a 72°, Para la extensión se utilizó una rampa de temperatura de 1°C cada 8 seg. y finalizando con una extensión de 5 min a 72°C (Figura 8b).

⁵⁴ CHIAPPERO, Marina y GARDENAL, Cristina. Inheritance of random amplified fragment polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population genetic studies of *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever, *Op. Cit.*, p. 87

⁵⁵ BURGOS, *Op. Cit.*, p. 67.

⁵⁶ WHATMAN. FTA® Protocols: Collect Transport, Archive and Access Nucleic Acids...All at Room Temperature. [online], 2002 [cited septiembre 2005]: Available from internet:< <http://www.cosmobio.com.ar/docs/FTA%20Protocols.pdf>2002

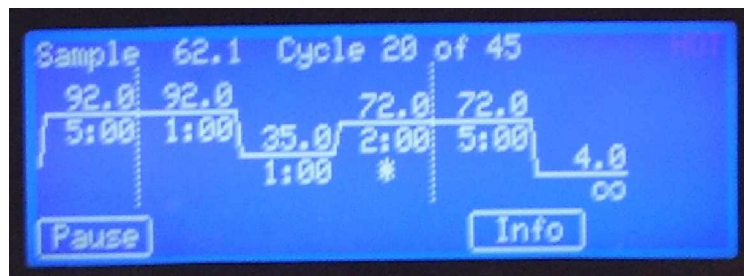
⁵⁷ BURGOS, *Op. Cit.*, p. 69

Figura 8a. Termociclador Perkin Elmer Gene amp PCR System 9700. 8b) Diagrama del ciclo RAPD-PCR, el asterisco en la temperatura de extensión indica la modificación realizada en la rampa de temperatura.

a.



b.



5.2.3.1 Repetibilidad de la técnica. Para verificar la repetibilidad de la técnica RAPD, se decidió seguir estrictamente las condiciones estandarizadas en el protocolo descrito anteriormente. La evaluación del protocolo se realizó aplicando dos veces o más las condiciones de reacción a una misma muestra, en lapsos superiores a 15 días.

Por otro lado, para detectar la presencia de productos inespecíficos producidos por contaminación de los componentes de reacción o exceso de reactivo, en todos los procesos de amplificación se utilizaron cuatro testigos, tres de los cuales correspondían a muestras de ADN de *Periplaneta americana*, bovino, tomate, y un cuarto que no contenía ADN.

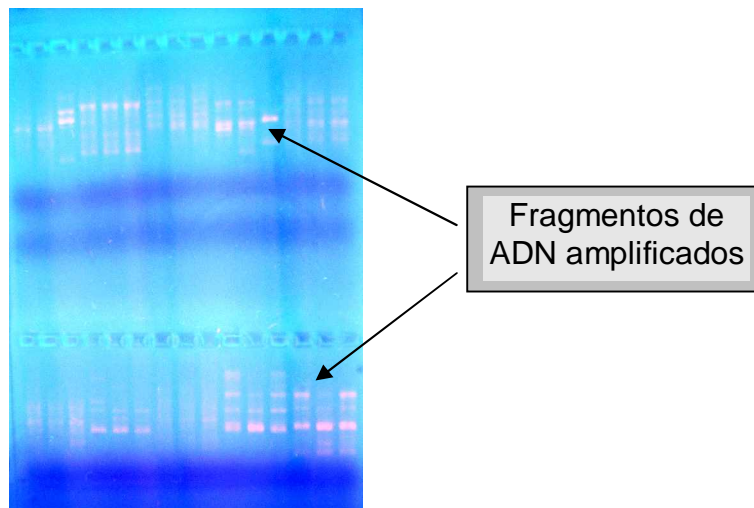
5.2.4 Visualización de los fragmentos amplificados. Una vez realizada la amplificación del ADN vía PCR, y a fin de determinar la amplificación de los fragmentos, estos se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con 1µl de

bromuro de etidio, utilizando una cámara de electroforesis horizontal mini sub-cell BIORAD como se puede ver en la figuras 9 y 10. Las condiciones de corrida para la electroforesis fueron de 80W durante 40 min.

Figura 9. Cámara de electroforesis para geles de agarosa



Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio



Luego de confirmar la amplificación de los fragmentos RAPD's en los geles de agarosa, se corrieron las muestras en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y 3M de urea, en una cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen GT Sequencing Cell de BIO-RAD, véase Figura 11. Las condiciones de corrida fueron 100 W, 50°C y 4 horas. Finalmente los productos se visualizaron utilizando tinción con plata.

Figura 11. Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 6% y 3M de urea.



5.2.4.1 Nomenclatura de los fragmentos. Para determinar el peso y posición de los fragmentos en el gel, se utilizó un marcador de peso molecular de 25 pb. Promega como se indica en la Figura 12. El nombre del marcador se determinara por medio de letras y números que lo identifican, además será seguido del tamaño de la banda RAPD observada medida en pb.

5.2.5 Evaluación y selección de los cebadores mas polimórficos. Con el objetivo de establecer cuales cebadores ofrecían información suficiente para determinar el grado de polimorfismo existente entre las tres líneas de *Cavia porcellus*, se realizó la amplificación de las muestras de ADN utilizando los 20 cebadores, relacionados en la Tabla 2, en un individuo de cada población.

Figura 12. Marcador de Peso Molecular empleado en la determinación de los tamaños moleculares de los fragmentos RAPD's amplificados para *Cavia porcellus*.

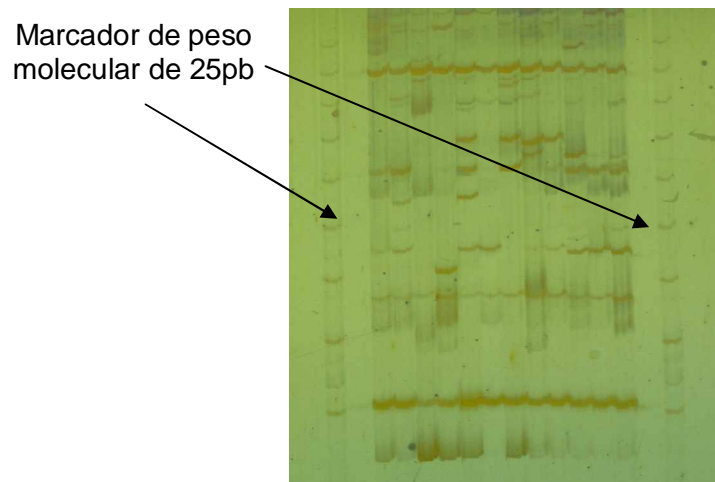


Tabla 2. Nombre y secuencia de los cebadores.

<i>NOMBRE</i>	<i>SECUENCIA DEL CEBADOR (5' - 3')</i>
A01	CCC AAG GTG C
A02	GGT GCG GGA A
A03	AAG ACC CCT C
A04	CTT CAC CCG A
A05	CAC CAG GTG A
A06	GAG TCT CAG G
A07	CCC GAT TCG G
A08	ACG CAC AAC C
A09	CTA ATG CCG T
A10	ACG GCG TAT G
B01	TCG AAG TCC T
B02	GCA TCT CAG A
B03	ACT TCG ACA A
B04	TCG CAT CAG T
B05	GCG CTC ACG C
B06	GTG ACA TGC C
B07	AGA TGC AGC C
B08	TCA CCA CGG T
B09	ATG GCT CAG C
B10	CAG GCA CTA G

Luego, se elaboró una matriz de datos a partir de los fragmentos obtenidos en el gel, de la manera indicada en la tabla 2. Para ello se asignó el código 1 (uno) para representar la presencia del fragmento, es decir el homocigoto dominante o el heterocigoto y 0 (cero) para representar la ausencia o el homocigoto recesivo, tal como se indica en la Figura 13.

Figura 13. Selección de fragmentos polimórficos en un gel de poliacrilamida al 6% y 3M de urea.

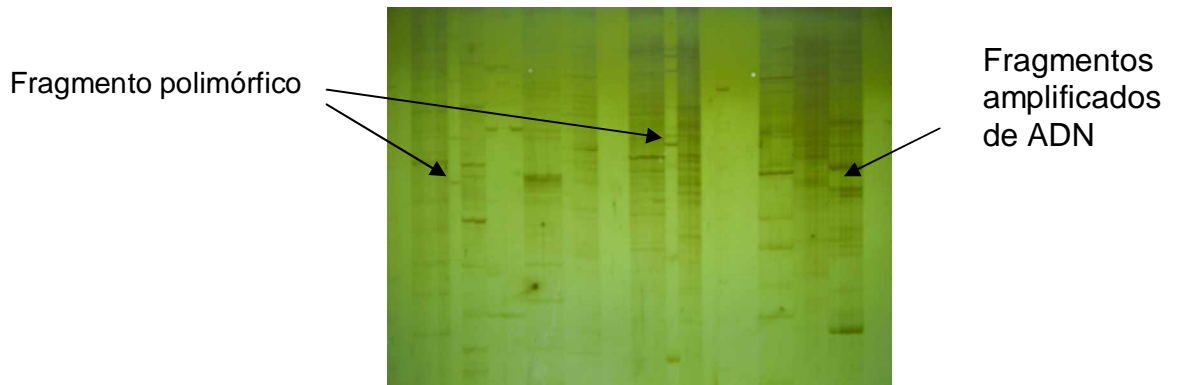


Tabla 3. Ejemplo de la matriz creada para determinar los cebadores polimórficos.

CEBADOR	INDIVIDUOS	ALELOS OBSERVADOS																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A01	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
	2	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
	3	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
A02	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
A03	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1

Con los datos de la matriz se calculo el PIC o Contenido Informativo Polimórfico, desarrollados por Botstein *et al*⁵⁸. el cual relaciona la heterocigosidad esperada del individuo y su covarianza con la de otro individuo en otro sistema o loci. La formula utilizada para este cálculo es la siguiente:

⁵⁸ BOTSTEIN, David; WHITE, Raymond L; SKOLNICK, Mark y DAVIS Ronald W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *En*: American Journal of Human Genetic. No.32 (1980); p. 320

$$PIC = 1 - \sum_i^n p_i^2 - 2 \sum_i^n p_i^2 q_i^2$$

Para la selección de los cebadores mas polimórficos se consideraron los valores más altos de PIC, Heterocigosidad esperada (H_e) y número de alelos (A), esto con el fin de aumentar la probabilidad de obtener una mayor cantidad de fragmentos que permitan detectar polimorfismos en las poblaciones.

5. 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POLIMORFISMOS, HETEROCIGOSIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA.

Para estimar el porcentaje de polimorfismo obtenido con cada cebador, se utilizó el método de estimación no sesgada de Lynch y Milligan⁵⁹ y se determinó el porcentaje de polimorfismo obtenido dentro de cada población mediante el paquete estadístico TFPGA⁶⁰ (Herramientas para análisis genético de poblaciones).

La heterocigosidad promedio, entre y dentro de poblaciones, se estimó utilizando el método convencional, es decir la raíz cuadrada de la frecuencia del genotipo recesivo y el método de estimación no sesgada de Lynch y Milligan⁶¹, y por tratarse de un marcador dominante se asumió equilibrio Hardy - Weinberg.

La matriz de distancia entre pares de poblaciones se generó mediante coeficiente de apareamiento simple a partir de los datos de RAPD's, con el programa AMOVA-PREP⁶² y posteriormente, esta matriz, se procesó con el programa WINAMOVA 1.55⁶³ para realizar el correspondiente análisis de varianza con el fin de calcular los valores ϕ_{ST} , los cuales son análogos al estadístico F_{ST} de Wright⁶⁴.

⁵⁹ LYNCH, M y MILLIGAN, B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. En : Molecular ecology. No. 3 (1994); p. 94.

⁶⁰ MILLER, M P. Tools for Populations Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A Windows Program for the Analysis of allozyme and Molecular Population Genetic Data. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University.1997.

⁶¹ LYNCH, Op. Cit., p.94

⁶² MILLER, Op. Cit., p. 5

⁶³ EXCOFFIER, L; SMOUSE, P E y QUATTRO, J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA data. En : Genetics. 131 (1992); p.479.491.

⁶⁴ WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. En : Genetics 16 (1931); p. 97-159.

Para establecer el nivel de significancia de los componentes de varianza, se llevó a cabo un procedimiento no paramétrico Bottstrapping con 1000 permutaciones aleatorias de los loci evaluados, que además permitieron el cálculo de los intervalos de confianza.

El análisis de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones, se realizó utilizando el coeficiente de similitud de Nei⁶⁵ ⁶⁶.

Mediante el programa TFGA y se establecieron los valores de similitud entre pares de individuos y de esta manera se construyó el correspondiente dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean ó Agrupamiento con media aritmética no ponderada)

Para establecer la existencia de diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre grupos de individuos y analizar cada locus en la serie de datos y determinar se realizó la prueba exacta de diferenciación poblacional de Raymond y Rousset⁶⁷ por medio de tablas de contingencia de r filas (poblaciones) por c columnas (alelos o marcadores en un locus).

⁶⁵ NEI, Op. Cit., 284

⁶⁶ NEI, Masatoshi, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. En : genetics. 89 (1978); p.584.

⁶⁷ RAYMOND, M L y ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. En : Evolution. 49 (1995); p. 1280-1283.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 SELECCIÓN DE LOS CEBADORES MÁS POLIMÓRFICOS

Luego de realizada la amplificación de fragmentos con los veinte cebadores, se procedió a seleccionar los cebadores mas polimórficos. El criterio de elección fue el Contenido Informativo Polimórfico (PIC)⁶⁸, calculado en cada uno de ellos, a través del análisis de las frecuencias observada de los alelos e igualmente se calculó la Heterocigosidad esperada (H_e), cuyos resultados pueden apreciarse en la Tabla 4.

Entre más altos sean los valores PIC, se incrementa la probabilidad de obtener una mayor cantidad de fragmentos amplificados por cebador y por ende se espera detectar más polimorfismos en las poblaciones, de ahí la importancia de su calculo.

De acuerdo con los criterios de Botstein *et al.*, los valores PIC calculados en esta investigación, variaron entre 0.20 y 0.30, y pueden considerarse como razonablemente informativos, si se tiene en cuenta que los valores de marcadores microsatélites y SNP's, son mayores o iguales a 0.30⁶⁹ y proporcionan información abundante en estudios de variabilidad.

Según Lui y Cordes⁷⁰, los valores PIC obtenidos con el marcador RAPD, no pueden llegar a ser tan informativos como los obtenidos con el marcador AFLP, sin embargo al comparar los valores de este estudio, con los obtenidos en las mismas poblaciones pero con el marcador AFLP⁷¹, los resultados sugieren que los primers seleccionados, para este estudio, suministraron mayor información de los polimorfismos presentes en las poblaciones.

⁶⁸ BOTSTEIN, Op. Cit. p. 320

⁶⁹ BOTSTEIN, Ibid., p. 321

⁷⁰ LIU, Z.J. y CORDES, J.F. DNA Marker technologies and their applications in aquaculture genetics. En: Aquaculture. No. 3 (2004); p. 6

⁷¹ SOLARTE, Caracterización molecular de tres líneas de *Cavia porcellus* mediante el marcador molecular AFLP. Op. Cit., p. 51

Tabla 4. Valores de Homocigosidad esperada, Heterocigosidad esperada (H_e), PIC y número de alelos para la selección de cebadores RAPD's polimórficos.

CEBADORES EVALUADOS	HOMOCIGOSIDAD ESPERADA	HETEROCIGOSIDAD ESPERADA (H_e)	PIC	No. DE ALELOS OBSERVADOS (A)
A01	0,62	0,38	0,30	19
A02	0,78	0,22	0,17	19
A03	0,87	0,13	0,11	19
A04*	0,62	0,38	0,30	36
A05	0,91	0,09	0,07	32
A06	0,99	0,01	0,01	36
A07	0,87	0,13	0,10	23
A08	0,95	0,05	0,04	40
A09*	0,75	0,25	0,20	30
A10	0,84	0,16	0,13	35
B01	0,85	0,15	0,12	36
B02*	0,58	0,42	0,33	40
B03*	0,72	0,28	0,23	31
B04	0,92	0,08	0,07	36
B05*	0,67	0,33	0,26	52
B06	0,88	0,12	0,09	43
B07*	0,64	0,36	0,28	55
B08	0,84	0,16	0,13	33
B09	0,81	0,19	0,14	48
B10	0,93	0,07	0,06	46

* Valores PIC más altos

El número de alelos por cebador varió entre 30 y 55, cifra mayor en comparación con otros estudios en diferentes especies pero con el mismo marcador^{72 73 74}. Según Lui y Cordes⁷⁵, la importancia de este criterio radica en que si se tiene un mayor número de alelos por cebador se incrementa el valor PIC y al incrementar la información que se puede derivar del marcador, la probabilidad de encontrar alelos raros, o alelos con una frecuencia $q \leq 0.05$, en los individuos también se incrementa.

⁷² HATANAKA, Terumi; GALETTI, Pedro. RAPD Markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. En : Genetics and Molecular Biology. Vol. 26, No. 1 (2003); p. 22

⁷³ PAREJO, J; SANSINFORIANO, A; RABASCO, M; MARTÍNEZ, Trancón; Fernández-García, J.; y Padilla, J. Utilización De La Técnica RAPD Para Estudios Poblacionales En La Raza Bovina Blanca Cacereña. En : Archivos de Zootecnia. No.47 (1998) p. 282.

⁷⁴CHIPPERO, Op. Cit., p. 88

⁷⁵ LIU, Op. Cit., p. 6

El primer A01 tuvo un valor PIC alto (0,30), sin embargo el numero de alelos esperados con este cebador fue el mas bajo ($A= 19$), lo que indica que es probable que al evaluar las poblaciones de *Cavia porcellus* con este cebador, no se obtenga la misma información de polimorfismos que podría obtener con el cebador A09, el cual tiene un numero PIC mas bajo (0,20) pero con un 50% más de alelos observados.

Lo anterior puede deberse a que, debido al comportamiento dominante del marcador, existe un sesgo a causa de la imposibilidad de distinguir los homocigotos dominantes y los heterocigotos, de los homocigotos recesivos, que son los alelos no observados en el gel.

Luego de realizar los análisis correspondientes, se seleccionaron seis de los veinte cebadores para realizar la amplificación final de fragmentos, los cebadores seleccionados fueron A04, A09, B02, B03, B05 y B07.

6.2 ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

6.2.1 Análisis de polimorfismos. Al amplificar el ADN de los 36 individuos, con los seis cebadores seleccionados, se obtuvo un total de 526 bandas, de las cuales 42 fueron monomórficas, de acuerdo con el criterio que establece que un alelo se considera polimórfico cuando su frecuencia es menor o igual al 95 o 99%.^{76 77}

Al realizar el conteo directo, la proporción de loci monomórficos fue de 0.0798, lo que significa que el 7.98% de los loci encontrados estaban presentes en todos los individuos, lo que permitió establecer que los cebadores utilizados produjeron un buen número de bandas con información suficiente para analizar la variabilidad genética existente entre las poblaciones estudiadas.

En la Tabla 5 se describe la proporción de loci polimórficos, para cada población y con cada uno de los cebadores.

⁷⁶ CHASSIN NORIA, Omar; LÓPEZ ZAVALA, Rigoberto; CANO CAMACHO, Horacio; SUAREZ CORONA, Edgar; JUÁREZ CARATACHEA, Aureliano y ZAVALA PÁRAMO, Ma. Guadalupe. Diversidad y similitud genética entre poblaciones de guajolotes mexicanos utilizando un método de amplificación aleatoria de ADN polimórfico. En: Técnica Pecuaria en México. Vol. 43, No. 3 (2005); p. 418

⁷⁷ DE VICENTE, M.C., LÓPEZ, C. Y FULTON, T. Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. 2004. capitulo3 p. 6

Tabla 5. Proporción de loci polimórficos encontrados en cada población con cada cebador

Población	Número de individuos	Numero total de loci	Numero de loci monomórficos	% de Loci polimórficos (criterio del 95%)
Cebador B07				
1	12	80	33	58,75
2	12	80	32	60,00
3	12	80	15	81,25
Todas las poblaciones	36	80	13	83,75
Cebador B05				
1	12	75	2	97,33
2	12	75	6	92,00
3	12	75	5	93,33
Todas las poblaciones	36	75	2	97,33
Cebador B03				
1	12	104	1	99,04
2	12	104	3	97,12
3	12	104	5	95,19
Todas las poblaciones	36	104	0	100,00
Cebador B02				
1	12	44	21	52,27
2	12	44	27	38,64
3	12	44	28	36,36
Todas las poblaciones	36	44	19	56,82
Cebador A09				
1	12	102	4	96,08
2	12	102	8	92,16
3	12	102	7	93,14
Todas las poblaciones	36	102	3	97,06
Cebador A04				
1	12	121	8	93,39
2	12	121	8	93,39
3	12	121	8	93,39
Todas las poblaciones	36	121	8	93,39

El cebador B03, resultó ser bastante informativo, puesto que con éste se encontró la mayor cantidad de polimorfismos dentro y entre poblaciones, por el contrario, el cebador B02 fue el que presentó la menor proporción de loci polimórficos en los dos casos.

El mayor número de bandas se obtuvo al analizar los individuos con el cebador A04, mientras que el menor número se obtuvo con el cebador B02. El tamaño de

los alelos amplificados con el cebador A04, osciló entre 131 pb. y 2100 pb., sin embargo la mayor cantidad de alelos presentaron una longitud entre 225 y 1200 pb. En la Tabla 6 se presenta un resumen del número de bandas totales y los tamaños de los fragmentos obtenidos por cada cebador.

Tabla 6. Número de bandas y tamaños de fragmentos obtenidos con cada cebador.

Cebador	Numero de Bandas	Tamaño de los fragmentos en pb. (pares de bases)
A04	121	131 a 2100 pb.
A09	102	157 a 1983 pb.
B02	44	200 a 1450 pb.
B03	104	167 a 1233 pb.
B05	75	155 a 1316 pb.
B07	80	151 a 666 pb.

También se determinó la distribución de la presencia de las bandas, con el fin de evaluar el comportamiento de los alelos en las tres poblaciones y medir la frecuencia de bandas compartidas dentro de las mismas. Shalem *et al*⁷⁸, consideran que de este modo es posible seleccionar alelos característicos en cada una de las poblaciones evaluadas para su posterior identificación. En la Tabla 7 se puede apreciar el comportamiento de presencia-ausencia de las bandas.

Los alelos A04-351 y A04-358 se encontraron en todos los individuos analizados de la población 3 o animales mejorados; por otro lado el alelo B07-495 es un alelo que se encontró en las dos poblaciones criollas, es decir la población mascota y criollos, y por ultimo, el alelo A09-306 se encontró únicamente en la población 2 o animales criollos de pelo corto.

⁷⁸ SALEM, H.H.; ALI, B.A.; HUANG, T.H. y QIN, D.N. Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in poultry research. *En* : International journal of poultry science. Vol. 4, No. 10 (2005), p. 806

Tabla 7. Distribución de bandas en las poblaciones de *Cavia porcellus* obtenidas con el marcador RAPD

Cebador	Numero total de bandas polimórficas (frecuencia alelo comun $\geq 1/36$ o $\leq 35/36$)	Bandas únicas presentes		Bandas únicas raras (f=1/36, 2/36)		Bandas con frecuencias alélicas significativamente diferentes (P<0,05)		Bandas con frecuencias alélicas similares	
		Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
B07	67	11	16,42	22	32,84	0	00,00	34	50,75
B05	73	33	45,21	20	27,40	2	2,74	18	24,66
B03	104	31	29,81	17	16,35	3	2,88	53	50,96
B02	25	16	64,00	3	12,00	0	00,00	6	24,00
A09	99	47	47,47	34	34,34	1	1,01	17	17,17
A04	116	37	31,90	32	27,59	2	1,72	45	38,79
Totales	484	175	36,16	128	26,45	8	1,65	173	35,74

Según Hatanaka y Galetti⁷⁹, el marcador RAPD puede ser utilizado en la detección de diferencias entre líneas mediante la asignación de alelos específicos, por otro lado Liu y Cordes⁸⁰, mencionan que por su característica de marcador de herencia mendeliana, en poblaciones bajo cría, se esperaría ver en la generación F₁ la suma de las bandas observadas en los parentales, si se asume que los parentales son homocigotos en cada locus.

Esta condición, podría aprovecharse, con fines de conservación o mejoramiento genético, ya que con el marcador RAPD sería posible hacer seguimiento en cuanto a la conservación de alelos de los parentales en la descendencia.

Igualmente, el marcador RAPD puede ser un marcador especie-específico o inter-específico, como lo asegura Bardakci⁸¹, y puede ser usado en estudios en la especie *Cavia porcellus*, que permitan, por una parte, determinar el flujo genético de esta especie, y por otra, identificar los individuos híbridos mediante el análisis de individuos en poblaciones de otras regiones del país, e inclusive de otros países, que en el caso de Nariño sería con los individuos provenientes del Perú, que como ya se mencionó, fueron los que mayoritariamente se cruzaron con las poblaciones criollas de esta zona de Colombia.

6.2.2 Heterocigosidad esperada (He). Para el análisis de los polimorfismos y la estimación de la heterocigosidad y la homocigosidad esperada, se descartaron las bandas con frecuencia igual a 1,000, acorde con lo recomendado por Lynch y Milligan⁸², para estimar con mayor exactitud las frecuencias génicas, dado el carácter dominante del marcador RAPD, y así alcanzar un parámetro genético para un locus, con la misma frecuencia que un marcador codominante.

Con el procedimiento antes indicado se encontraron valores de heterocigosidad esperada promedio para *Cavia porcellus* de 0.20 ± 0.0445 , con un valor mínimo y máximo de 0.097 para la población 1 o mascota y 0.4569 para la población 3 o mejorados respectivamente. Los valores de heterocigosidad obtenidos en este estudio se encuentran en la Tabla 8.

⁷⁹ HATANAKA, Op. Cit., p. 20

⁸⁰ LIU, Op. Cit., p. 11

⁸¹ BARDAKCI, Fevzi. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. En : Turkish Journal of Biology. No. 25 (2001); p. 190

⁸² LYNCH, op. Cit., p. 94.

Tabla 8. Heterocigosidad promedio encontrada con el marcador molecular RAPD para las poblaciones de *Cavia porcellus*.

Población	Número de individuos	Número de loci observados	Heterocigosidad promedio (insegada)
Cebador B07			
1	12	67	0,3804
2	12	67	0,4026
3	12	67	0,3963
Todas las Poblaciones	36	67	0,2500
Cebador B05			
1	12	73	0,2368
2	12	73	0,2501
3	12	73	0,2401
Todas las Poblaciones	36	73	0,1974
Cebador B03			
1	12	104	0,1788
2	12	104	0,1936
3	12	104	0,2205
Todas las Poblaciones	36	104	0,1560
Cebador B02			
1	12	25	0,1914
2	12	25	0,3510
3	12	25	0,4569
Todas las Poblaciones	36	25	0,3482
Cebador A09			
1	12	99	0,0957
2	12	99	0,2271
3	12	99	0,2912
Todas las Poblaciones	36	99	0,1791
Cebador A04			
1	12	116	0,2465
2	12	116	0,2704
3	12	116	0,3345
Todas las Poblaciones	36	116	0,2169

Los resultados encontrados indicaron que existe baja variabilidad genética de las poblaciones criollas, con valores que oscilaron entre 0,097 a 0,4026, con respecto a la población mejorada. Por otro lado la población mascota o población 1, es la que presentó el menor valor (0.19 ± 0.0316) seguida de la población de animales de pelo corto o población 2 (0.26 ± 0.0224), como se aprecia en la tabla 8.

Se destaca en estas cifras el bajo error de estimación, lo que confirma la confiabilidad de los parámetros estimados.

Parker *et al*⁸³ aseguran, que los estudios de variabilidad genética de las poblaciones tienen como objetivo principal determinar la diferenciación o similitud de las mismas, en donde además la estructura de una población refleja el movimiento efectivo de individuos y de sus genes. Egito *et al*⁸⁴, por otro lado, resaltan que en el Mejoramiento Genético de poblaciones animales, dedicadas a la producción pecuaria, uno de los principales propósitos es el mantenimiento de una muestra representativa de la variabilidad genética en la población. La sustentación teórica de esta afirmación, esta ampliamente documentada^{85 86 87 88 89 90}

Los resultados obtenidos por Solarte *et al*⁹¹, con el marcador molecular AFLP para la misma especie, sugirieron perdida de variabilidad genética para todas las poblaciones, que en los animales mejorados se evidencia fenotípicamente por un alto grado de “homogenización” de las líneas comerciales, y en las líneas criollas, la perdida de variabilidad se atribuyó al bajo tamaño efectivo de las dos poblaciones.

⁸³ PARKER, Patricia G.; SNOW, Alison A.; SCHUG, Malcom D.; BOOTON, Gregory C. y FUERTS, Paul A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. En: Ecology. Vol. 79, No. 2 (1998);p. 371

⁸⁴EGITO, A.A.; FUCK, B.; SPRITZE, A.L.; OLIVEIRA, R.R.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S.; RIBEIRO, M.N.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PAIVA, S.R.; CASTRO, S.T.R. Y SANTOS, S.A. RAPD markers utilization on the formation or maintenance of conservation nuclei of livestock species. En: Archivos de Zootecnia. No. 54 (2005); p. 278

⁸⁵GENGLER, N. y MISZTAL, I. Approximation of reliability for multiple trait animal models with missing data by canonical transformation. En: Journal of Dairy Science. No. 79 (1996); p. 318

⁸⁶ GRASER, H. U.; SMITH, S. P. y TIER, B. A derivative - free approach for estimating variance components in animal models by restricted maximum likelihood. En: Journal of Animal Science. No. 64 (1987); p.1365

⁸⁷ GARFÍAS, V. Evaluación de la heterosis individual y los efectos aditivos maternos entre líneas de cuyes peruanos y bolivianos. Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia, 1993. p. 42

⁸⁸ GABRIELLE, L.; JOHANSSON, K. y LUNDEHEIM, N. Selection for Litter Size, Body Weight, and Pelt Quality in Mink (*Mustela vison*): Experimental Design and Direct Response of Each Trait. En: Journal Animal Science. No. 71 (1993); p. 3264

⁸⁹ CARABAÑO, M. J. Estima de componentes de varianza. 5^o curso internacional sobre mejora genética animal. CIT-INIA. Madrid, España, 1995. p. 38.

⁹⁰ ALFONSO, L. y HALEY, C. S. Power of different F₂ schemes for QTL detection in livestock. En: Journal of Animal Science. No. 66 (1998);p. 3

⁹¹ SOLARTE, Carlos; CARDENAS, Heiber; ROSERO, Carol y BURGOS, William. Caracterización molecular de tres líneas de *Cavia porcellus* mediante el marcador molecular AFLP. En: Revista colombiana de ciencias pecuarias. Vol. 20, No. 1 (2007); p. 50.

Con el marcador molecular RAPD, se estableció la mayor pérdida de variabilidad en las líneas criollas, y dentro de éstas la denominada mascota, lo que confirma la afirmación referente a éstas poblaciones. Sin embargo, con el marcador RAPD, en este estudio, con los mismos animales mejorados, la pérdida de variabilidad observada no es tan grande, hecho que obliga a analizar con detenimiento varias situaciones, entre las que podrían mencionarse, el mayor tamaño efectivo, el control de los apareamientos para evitar la consanguinidad estrecha y el sistema de selección, donde la intensidad teórica no se aplica con todo el rigor, lo que obliga a una renovación de reproductores con cierta regularidad.

Otro de los factores que podrían estar asociados con la mayor diversidad genética dentro de la línea mejorada, es la utilización de individuos criollos que se aparearon con animales procedentes de Perú, los cuales, según el estudio molecular de Spotorno *et al.*⁹², son procedentes de distintas regiones geográficas del Perú como Piura, San Luís o Trujillo.

Por otra parte, si bien las líneas criollas han perdido variabilidad, estas poseen características deseables como la adaptación y supervivencia a condiciones ambientales adversas y mayor resistencia a enfermedades, pero nunca ha sido sometida a un proceso sistemático y sostenido de selección con fines de Mejoramiento Genético. Por lo tanto es necesario promover su conservación como material genético autóctono y de importancia tanto científica como económica para el departamento.

6.2.3 Análisis molecular de varianza AMOVA. Una vez realizado este análisis para cada cebador, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0.005$), lo que indica que existe variabilidad genética entre las tres poblaciones y por ende es posible establecer relaciones en cuanto a la estructura jerárquica de en cada una de ellas, e igualmente sugiere la existencia del impacto causado por la introgresión de genes provenientes de los animales peruanos, que como se ha reiterado, fueron introducidos como pie de cría en esta región hace más de 20 años. En la Tabla 9. se indican los resultados del análisis molecular de varianza para cada uno de los cebadores.

⁹² SPOTORNO, Op. Cit., p. 249

Tabla 9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre poblaciones

Cebador	Fuentes de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Componentes de Varianza	% de la Varianza	F	P
B07	Entre poblaciones	2	68,5000	34,2500	2,4148	31,41%	6,4957**	0,0042
	Dentro de poblaciones	33	174,0000	5,2727	5,2727	68,59%		
	Total	35	242,5000					
B05	Entre poblaciones	2	74,6667	37,3334	2,5021	25,51%	5,1085*	0,0117
	Dentro de poblaciones	33	241,1667	7,3081	7,3081	74,49%		
	Total	35	315,8334					
B03	Entre poblaciones	2	70,2778	35,1389	2,1633	19,07%	3,8281*	0,0320
	Dentro de poblaciones	33	302,9167	9,1793	9,1793	80,93%		
	Total	35	373,1945					
B02	Entre poblaciones	2	79,6111	39,8056	3,1517	61,36%	20,0547**	0,0000
	Dentro de poblaciones	33	65,5000	1,9848	1,9848	38,64%		
	Total	35	145,1111					
A09	Entre poblaciones	2	132,2222	66,1111	4,7635	34,74%	7,3871**	0,0022
	Dentro de poblaciones	33	295,3333	8,9495	8,9495	65,26%		
	Total	35	427,5555					
A04	Entre poblaciones	2	110,7778	55,3889	3,5943	22,67%	4,5187*	0,0184
	Dentro de poblaciones	33	404,5000	12,2576	12,2576	77,33%		
	Total	35	515,2778					

* diferencias estadísticas significativas $p \leq 0.05$

**diferencias estadísticas altamente significativas $p \leq 0.01$

Con todos los cebadores, el mayor porcentaje de variación se explica por las diferencias dentro de los individuos en las poblaciones, excepto con el cebador B02, donde la mayor variación se observó entre poblaciones, pero en todos los casos, la variación entre poblaciones es estadísticamente significativa, lo que indica que existen diferencias entre cada uno de los grupos.

Los valores de ϕ_{ST} , análogos del estadístico F_{ST} , encontrados en las poblaciones variaron entre 0,1907 ($P=0,0320$) con el cebador B03, hasta 0,6136 ($P=0,0000$) con el cebador B02. Según De Vicente, Lopez y Fulton⁹³, los valores de variación entre poblaciones se consideran entre grandes y muy grandes, e indican que existe una clara diferenciación de las poblaciones de *Cavia porcellus*, es decir, las frecuencias alélicas se han alterado por efecto de la población.

Los resultados encontrados con el marcador AFLP (ϕ_{ST} 0,2716), así como los encontrados en este estudio indican que las poblaciones de *Cavia porcellus* están altamente diferenciadas, hecho en gran medida provocado por los cruzamientos de animales criollos con el pie de cría traído de Perú y la posterior selección intensiva hacia los animales mejorados. Por otra parte es claro que dicho cruzamiento proporcionó características de adaptabilidad al pie de cría peruano, de tal modo que tras varias generaciones de selección, éste absorbió el genotipo criollo, del cual ahora solo se conserva un núcleo muy pequeño.

Por otra parte, el bajo tamaño de la población de cuyes criollos, obliga a realizar cruces endogámicos a fin de mantener el germoplasma autóctono, lo que aumenta el número de individuos homocigotos y disminuye su variabilidad genética, y provoca una mayor diferenciación de estas poblaciones con la mejorada

Los valores estimados de theta, presentados en la Tabla 10, describen de igual manera la proporción de variación existente debida a la subdivisión de poblaciones dentro de la especie.

Los valores encontrados para Theta varían de 0,2088 hasta 0,5994, y confirman los valores encontrados de ϕ_{ST} , que indican una alta diferenciación de las poblaciones de cuyes a causa de la selección hacia la línea mejorada y los cruces endogámicos en las líneas criollas.

⁹³ DE VICENTE, Op. Cit., p. 22

Tabla 10. Valores de Theta promedio e intervalos de confianza obtenidos en el análisis de las poblaciones de *Cavia porcellus*

Cebador	Numero de loci	Theta promedio	S.D.	Intervalos de confianza al 95% Bootstrapping sobre todos los loci	
				Superior	Inferior
B07	67	0,3159	0,0506	0,4160	0,2179
B05	73	0,2089	0,0365	0,2769	0,1359
B03	104	0,2088	0,0524	0,3018	0,103
B02	25	0,5994	0,0913	0,7469	0,4008
A09	99	0,3137	0,0496	0,4035	0,2175
A04	116	0,2315	0,0417	0,3142	0,1546

De la variación genética total encontrada en el análisis molecular de varianza, el mayor valor de variación debida al componente dentro de población se obtuvo con el cebador B03 el cual fue de 80.93%, esta variación podría indicar la posible existencia de mas niveles de subdivisión a los ya evaluados.

6.2.4 Distancia genética. Los valores obtenidos indicaron una clara separación de las dos poblaciones de animales criollos, con respecto a la línea mejorada, debido principalmente a que las poblaciones de animales criollos conforman un núcleo cerrado de animales con baja cantidad de reproductores, hecho que no ha permitido el la entrada de nuevos genes de animales criollos en las mismas, manteniendo una alta proporción de alelos compartidos, mientras que la población de animales mejorados, a través de los planes de selección, ha sufrido la introgresión de genes de animales provenientes del Perú y que provocaron una modificación en las frecuencias alélicas de los alelos existentes por lo cual, los alelos originales disminuyeron su frecuencia y los nuevos genes los sustituyeron.

En la tabla 11 se describen los valores de distancia e identidad genética entre las poblaciones estudiadas.

La mayor separación se encontró entre la población 1 o mascota con la mejorada, lo que puede atribuirse a la forma en la que se realizaron los cruces, ya que se aparearon animales criollos de pelo corto con los animales traídos del Perú, con lo que se originó la actual población mejorada. En este proceso, de acuerdo con los resultados obtenidos en otras investigaciones⁹⁴, paulatinamente se han fijado

⁹⁴ SOLARTE, Modelo Animal Multicarácter para la selección de reproductores *Cavia porcellus* en Colombia Op. Cit., p. 26

genes con características deseables para la producción, como es la velocidad de crecimiento y prolificidad, características que se continúan conservando con la selección, a expensas de la rusticidad y resistencia a enfermedades desarrollada por los animales criollos a lo largo de su proceso evolutivo y adaptativo.

Tabla 11. Medidas de distancia e identidad genética obtenidas para las poblaciones de *Cavia porcellus*

Cebadores	Poblaciones comparadas	NEI'S (1972) IDENTIDAD/DISTANCIA		NEI'S (1972/1978) IDENTIDAD/DISTANCIA	
		Dist.	Ident.	Dist. insesgada	Ident. insesgada
B07	1 vs. 2	0,0449	0,9560	0,0392	0,9616
	1 vs. 3	0,1582	0,8537	0,1477	0,8627
	2 vs. 3	0,1250	0,8825	0,1140	0,8923
B05	1 vs. 2	0,0345	0,9661	0,0254	0,975
	1 vs. 3	0,0783	0,9247	0,0694	0,933
	2 vs. 3	0,0802	0,9229	0,0724	0,9301
B03	1 vs. 2	0,0502	0,9511	0,0440	0,9570
	1 vs. 3	0,0670	0,9352	0,0603	0,9414
	2 vs. 3	0,0272	0,9732	0,0205	0,9797
B02	1 vs. 2	0,1571	0,8546	0,1504	0,8603
	1 vs. 3	0,5723	0,5642	0,5648	0,5685
	2 vs. 3	0,2996	0,7411	0,2901	0,7482
A09	1 vs. 2	0,0670	0,9352	0,0617	0,9402
	1 vs. 3	0,1054	0,9000	0,0982	0,9065
	2 vs. 3	0,0843	0,9192	0,0750	0,9277
A04	1 vs. 2	0,0567	0,9449	0,0475	0,9536
	1 vs. 3	0,1025	0,9026	0,0934	0,9109
	2 vs. 3	0,0746	0,9281	0,0653	0,9368

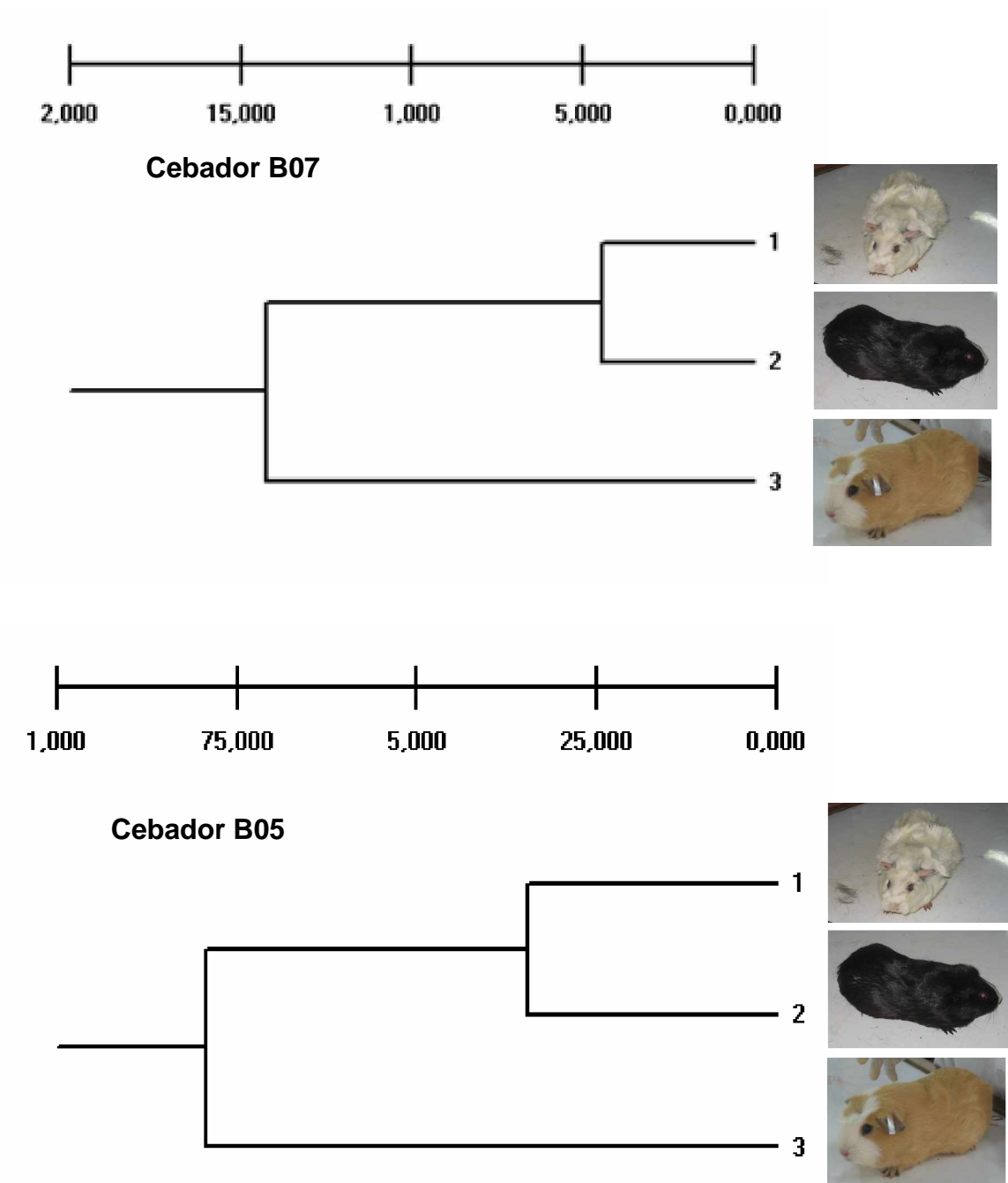
Con los valores de similitud de las poblaciones se construyeron los diferentes dendrogramas, con el fin de representar gráficamente la separación de las poblaciones estudiadas, figura 14.

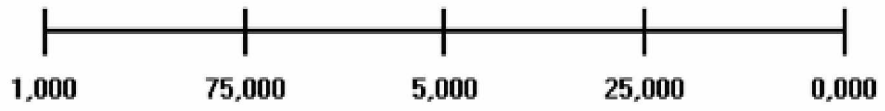
Como se aprecia en dichos dendrogramas, la población 3 está separada de la poblaciones 1 y 2, las cuales a su vez conforman un grupo monofilético. Los valores que confirman esta estructura, están descritos en la tabla 12.

Tabla 12. Análisis de agrupamiento UPGMA de las poblaciones de *Cavia porcellus* usando la distancia genética de Nei, con cada uno de los cebadores.

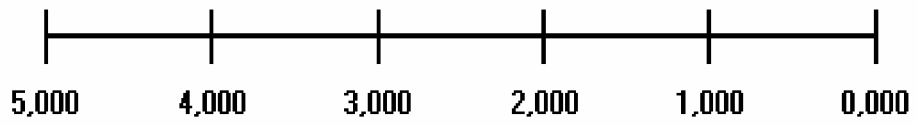
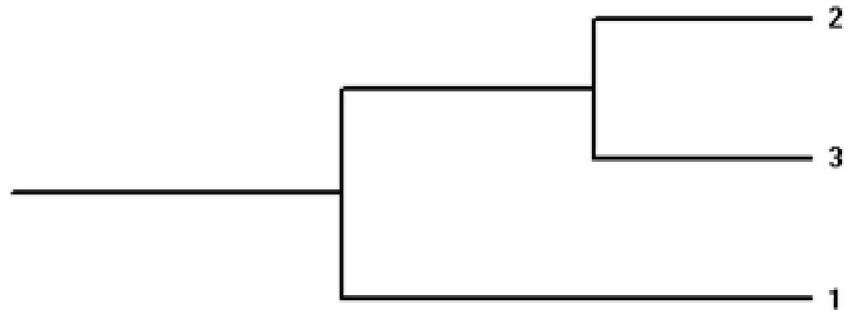
Cebador	Nodo	Distancia	Poblaciones incluidas	Proporción de repeticiones similares	Índice de consistencia de cada nodo		
					Numero de loci soportando el nodo	Porcentaje total de loci soportando el nodo	Porcentaje de loci soportando el nodo
B07	1	0,0449	1—2	1,0000	43	64,18%	64,18%
	2	0,1416	1--2—3	1,0000	67	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos.				7 loci produjeron resultados idénticos en los árboles		
B05	1	0,0345	1—2	0,9940	32	43,84%	43,84%
	2	0,0792	1--2—3	1,0000	73	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos				12 loci produjeron resultados idénticos en los árboles.		
B03	1	0,0272	2—3	0,9170	35	33.65%	33.65%
	2	0,0586	1--2—3	1,0000	104	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos				23 loci produjeron resultados idénticos en los árboles.		
B02	1	0,1571	1—2	0,8570	16	64%	64%
	2	0,436	1--2—3	1,0000	25	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos				6 loci produjeron resultados idénticos en los árboles.		
A09	1	0,067	1—2	0,7090	54	54,55%	54,55%
	2	0,0948	1--2—3	1,0000	99	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos				10 loci produjeron resultados idénticos en los árboles.		
A04	1	0,0567	1—2	0,7740	51	43,97%	43,97%
	2	0,0885	1--2—3	1,0000	116	100%	100%
	Ninguna replicación del Bootstrap produjo árboles idénticos				27 loci produjeron resultados idénticos en los árboles.		

Figura 14. Árboles construidos con cada uno de los cebadores usando el agrupamiento UPGMA con la distancia original de Nei.

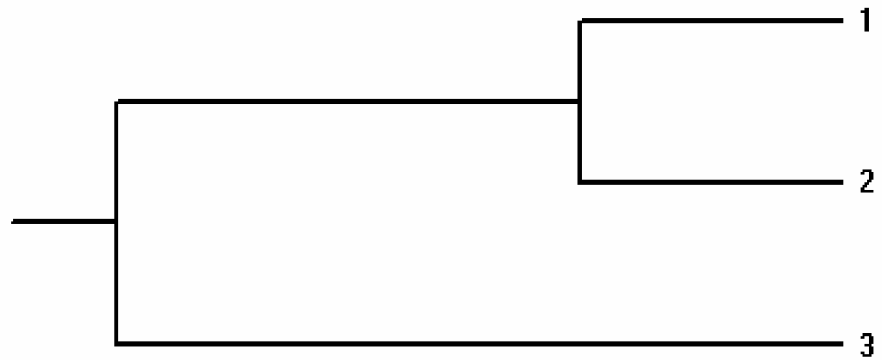


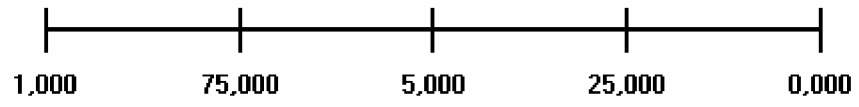


Cebador B03

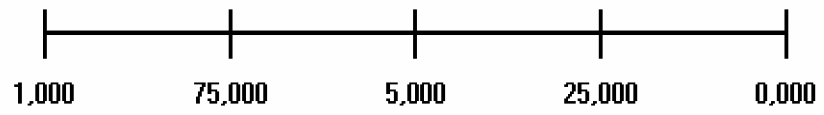


Cebador B02

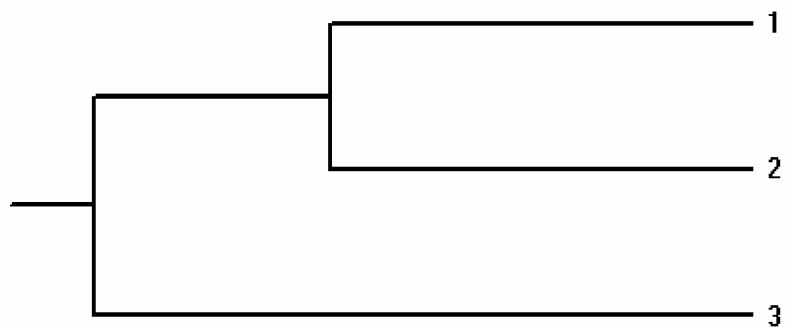




Cebador A09



Cebador A04



Los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento (UPGMA) muestran a la población 3 o animales mejorados, totalmente diferenciada de las demás poblaciones, esto sustentado en el 100% de las replicas Bootstrap⁹⁵.

Los nodos que agrupan las poblaciones criollas están soportados por bajos porcentajes de replicas bootstrap (33.65% a 64.18%), esto quiere decir que a pesar de tener claro que las poblaciones criollas se separan de la mejorada, estos resultados no logran explicar claramente la relación filogenética de las poblaciones criollas.

Los anteriores resultados coinciden con los reportados por Solarte *et al*⁹⁶ para el marcador molecular AFLP, Sin embargo los valores de similitud fueron mas altos 0,9609 para el nodo 2 y 0,9958 para las poblaciones 1 y 2 agrupadas en el nodo 1. en este estudio también se encontró que el nodo que agrupa las poblaciones criollas solo esta soportado por el 56.9% de las replicas Bootstrap. Es necesario tener en cuenta que solo una, de las cinco combinaciones utilizadas en este estudio, permitió encontrar diferencias entre las tres poblaciones de *Cavia porcellus*.

El único cebador que mostró una estructura poblacional diferente al utilizar el marcador RAPD, basado en distancias genéticas, fue el cebador B03, el cual agrupó las poblaciones 2 y 3 en un grupo filogenético, separándolas de la población 1. Esto significa que el cebador B03 mostró mayor proporción de alelos compartidos entre las mencionadas poblaciones.

Sin embargo el valor que soporta este nodo fue el mas bajo del estudio, 33.65%. Teniendo en cuenta lo anterior, el cebador B03 mostró que existen características sinapomórficas entre las poblaciones 2 y 3, las cuales pueden aclararse con el estudio de marcadores moleculares de tipo codominante, además de estudios a nivel de ADN mitocondrial (ADNmt), molécula que no presenta ningún tipo de recombinación y por ende mayor claridad para establecer las relaciones filogenéticas dentro de las poblaciones criollas.

⁹⁵ FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *En* : Evolution. . Vol. 39, No. 4 (1985); p. 784

⁹⁶ SOLARTE, Op. Cit., p.54

6.2.5 Prueba de diferenciación poblacional. En la tabla 13, se encuentran descritos los valores de diferenciación poblacional. Esta prueba permitió evaluar si el número de alelos está distribuido aleatoriamente y si esta distribución alélica es igual entre las poblaciones de *Cavia porcellus*.

Tabla 13. Prueba de diferenciación poblacional de Raymond and Rousset para cada uno de los cebadores utilizados.

Cebador	Numero de loci	Grados de libertad	Valor de χ^2	Probabilidad
B07	67	134	262,3369	0,00000
B05	73	146	357,3208	0,00000
B03	104	208	291,0225	0,0001
B02	25	50	272,1608	0,0000
A09	99	198	566,1223	0,0000
A04	116	232	460,6868	0,0000

Según esta prueba, todos los cebadores utilizados en este estudio, permiten detectar diferencias altamente significativas entre las poblaciones de *Cavia porcellus* en cuanto a la distribución alélica en cada una de ellas, es decir cualquiera de los seis cebadores puede detectar diferencias entre las poblaciones de cuyes.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

El método de almacenamiento de las muestras en tarjetas FTA, permitió obtener ADN en buena cantidad y calidad, sin la necesidad de utilizar métodos tradicionales de conservación de sangre como el EDTA, es el caso de la especie *Cavia porcellus*, donde la muestra de sangre que se puede extraer es muy pequeña y se coagula rápidamente.

La utilización del kit FTA, que por primera vez se empleo en cuyes, permitió obtener resultados 100% efectivos, puesto que de un total de las 60 amplificaciones por ensayo, se pudieron visualizar fragmentos en los geles de agarosa al 1.5% y posteriormente en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%.

Los ajustes realizados al protocolo de amplificación vía PCR, del ADN de *Cavia porcellus* fueron reproducibles en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, a partir del protocolo indicado por Chiappero & Gardenal (2001) para Rodentia- Muridae, lo que indica que la metodología reportada por las citadas autoras es altamente reproducible en otros laboratorios, independiente de la procedencia de las muestras y de las casas proveedoras de los reactivos de amplificación.

Seis de los veinte cebadores, sintetizados en IDT Technologies e importados a Colombia a través de la Universidad del Valle, arrojaron valores de PIC superiores a 0.20, sugiriendo que son eficaces para el análisis de la diversidad Genética de las poblaciones de *Cavia porcellus*.

Los valores de heterocigosidad esperada para *Cavia porcellus* de 0.20 ± 0.0445 , con valores entre 0.097 para la población mascota y 0.4569 para la población mejorada sugieren pérdida de variabilidad genética de las poblaciones criollas las cuales corresponden a núcleos cerrados, altamente endogámicos, erosionados y Genéticamente distantes de la línea mejorada.

Existe una alta identidad entre las poblaciones criollas evaluadas, las cuales son al mismo tiempo distantes genéticamente de la línea mejorada, causado

principalmente por los procesos de selección a los que ha sido sometido la línea mejorada y el bajo tamaño efectivo en las dos líneas criollas.

7.2 RECOMENDACIONES

Utilizar las tarjetas FTA, para recolectar y almacenar sangre de *Cavia porcellus* para realizar análisis moleculares, por su eficiencia y facilidad de manejo.

Utilizar el protocolo para amplificación de fragmentos de ADN descrito en este trabajo para futuros estudios en esta especie con el marcador molecular RAPD.

Utilizar nuevos cebadores para realizar estudios en la especie *Cavia porcellus* con el marcador molecular RAPD para ampliar la información molecular de la especie.

Llevar a cabo más estudios con marcadores codominantes para obtener mayor confiabilidad y precisión en los análisis genéticos de las poblaciones de *Cavia porcellus*.

Realizar estudios a nivel de ADNmt, para esclarecer las relaciones filogenéticas de las diferentes poblaciones de *Cavia porcellus*. Para esto es necesario incluir animales provenientes de diferentes regiones del país e inclusive de otros países.

Realizar estudios con el marcador molecular RAPD, con un número mayor de individuos, de distintas regiones del departamento de Nariño, con el fin de detectar una mayor cantidad de alelos únicos que permitan caracterizarlos como criollos y patentarla como una línea regional.

Utilizar la información molecular como herramienta de apoyo a los programas de conservación y Mejoramiento Genético de la especie, con el fin de preservar la variabilidad inter e intrapoblacional en todas las líneas utilizadas en la región.

BIBLIOGRAFIA

ALFONSO, L. y HALEY, C. S. Power of different F₂ schemes for QTL detection in livestock. En: Journal of Animal Science. No. 66 (1998):p. 1-12

ALMEIDA, Francisca; MOREIRA, Miguel; BONVICINO, Cibele y CERQUEIRA, Rui. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 23 No. 4 (2000); p. 793-797.

BARDAKCI, Fevzi. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. En: Turkish Journal of Biology. No. 25 (2001); p. 185-196

BECERRA, Viviana y PAREDES, Mario. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. En: Agricultura Técnica Chile. Vol. 60, No. 3 (jul.-sep. 2001); p.270-281.

BOTSTEIN, David; WHITE, Raymond L; SKOLNICK, Mark y DAVIS Ronald W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. En: American Journal of Human Genetic. No.32 (1980); p. 314-331.

BURGOS, William; ROSERO, Carol; CARDENAS, Heiber y SOLARTE, Carlos. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA[®] para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 20, No. 1 (2007); p. 67-72

CAICEDO Alberto. Experiencias investigativas en la producción de cuyes. Pasto : Universidad de Nariño, 1999. 506 p.

CARABAÑO, M. J. Estima de componentes de varianza. 5^{to} curso internacional sobre mejora genética animal. CIT-INIA. Madrid, España, 1995. 65 p.

CARRERA, Alicia; TRANQUILLI, Gabriela y HELGUERA Marcelo. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires : INTA, 2004. p. 149-160. ISBN 987-521-138-9.

CHASSIN NORIA, Omar; LÓPEZ ZAVALA, Rigoberto; CANO CAMACHO, Horacio; SUAREZ CORONA, Edgar; JUÁREZ CARATACHEA, Aureliano y ZAVALA PÁRAMO, Ma. Guadalupe. Diversidad y similitud genética entre poblaciones de guajolotes mexicanos utilizando un método de amplificación

aleatoria de ADN polimórfico. En: Técnica Pecuaria en México. Vol. 43, No. 3 (2005); p. 415-424

CHAUCA, Lilia. Producción de cuyes *Cavia porcellus*. FAO INIA [online], 1997 [cited 20 September 2005]: Available from internet: <www.fao.org>.

CHIAPPERO, M y GARDENAL, C. Restricted gene flow in *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae). The natural reservoir of junin virus. En: Journal of Heredity. Vol. 94 No. 6 (2003); p. 490-495.

DE VICENTE, M.C., LÓPEZ, C. Y FULTON, T. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. 2004. capítulo 3. 86 p.

DRAGOO, J; SALAZAR BRAVO, J; LAYNE, L y YATES, T. Relationships within the *Calomys callosus* species group based on amplified fragment length polymorphisms. En: Biochemical Systematics and Ecology. No. 31 (2003); p. 703–713.

EGITO, A.A.; FUCK, B.; SPRITZE, A.L.; OLIVEIRA, R.R.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S.; RIBEIRO, M.N.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PAIVA, S.R.; CASTRO, S.T.R. Y SANTOS, S.A. RAPD markers utilization on the formation or maintenance of conservation nuclei of livestock species. En: Archivos de Zootecnia. No. 54 (2005); p. 277-281

EXCOFFIER, L; SMOUSE, P E y QUATTRO, J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. En: Genetics. 131 (1992); p.479.491.

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. En: Evolution. . Vol. 39, No. 4 (1985); p. 783-791

FERNÁNDEZ, Hilda. Uso de marcadores moleculares RAPD en la caracterización de bancos de germoplasma en Venezuela. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela CENIAP HOY. [online], No. 5. may.-ago. 2004 [cited 25 septiembre 2005]: Available from internet:<www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n5/arti/hfernandez.htm>.

FERREIRA, Márcio y GRATTAPAGLIA, Darío. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia : EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GABRIELLE, L.; JOHANSSON, K. y LUNDEHEIM, N. Selection for Litter Size, Body Weight, and Pelt Quality in Mink (*Mustela vison*): Experimental Design and

Direct Response of Each Trait. En: Journal Animal Science. No. 71 (1993); p. 3261-3270

GARCIA, Antonio; BENCHIMOL, Luciana; BARBOSA, Antonia; GERALDI Isaías, SOUZA junior, Claudio y DE SOUZA, Anete. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 27, No. 4 (2004); p. 579-588.

GARFÍAS, V. Evaluación de la heterosis individual y los efectos aditivos maternos entre líneas de cuyes peruanos y bolivianos. Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia, 1993. 110 p.

GENGLER, N. y MISZTAL, I. Approximation of reliability for multiple trait animal models with missing data by canonical transformation. En: Journal of Dairy Science. No. 79 (1996); p. 317-326

GRASER, H. U.; SMITH, S. P. y TIER, B. A derivative - free approach for estimating variance components in animal models by restricted maximum likelihood. En: Journal of Animal Science. No. 64 (1987); p.1362-1371

HADRY S H, BALICK M, SCHIERWATER B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD). En: Molecular Ecology. Vol. 1, No. 1 (1992); p. 55-63.

HATANAKA, Terumi; GALETTI, Pedro. RAPD Markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 26, No. 1 (2003); p. 19-25

INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). 1999. reporte de climatología de la estación botana. Pasto, Colombia. 5 p.

LIU Z, y CORDES J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. En: Aquaculture. No. 238 (2004); p. 1 –37.

LYNCH, M y MILLIGAN, B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. En: Molecular ecology. No. 3 (1994); p. 91-99.

MILLER, M P. Tools for Populations Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3. A Windows Program for the Analysis of allozyme and Molecular Population Genetic Data. [online]. 1997 [cited 1 august 2006]: Available from internet:<<http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>>.

MORERA, L; BARBA, C Y GARRIDO J. Detección de variabilidad en razas caninas autóctonas españolas mediante marcadores RAPD. En: Archivos de Zootecnia. Vol. 50, No. 191 (2001); p. 379-382.

MULLIS, K B y FALOONA, F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. En: Methods Enzymol. No. 155 (1987); p. 335-350.

NEI, Masatoshi, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. En: genetics. 89 (1978); p.583-590.

NEI, Masatoshi. Genetic distance between populations. En: The American Naturalist. Vol. 106, No. 949 (may.-jun. 1972); p. 283-292.

PAREJO, J; SANSINFORIANO, A; RABASCO, M; MARTÍNEZ, Trancón; FERNÁNDEZ-GARCÍA, J.; y PADILLA, J. Utilización De La Técnica RAPD Para Estudios Poblacionales En La Raza Bovina Blanca Cacerña. En: Archivos de Zootecnia. No.47 (1998) p. : 279-286.

PARKER, Patricia G.; SNOW, Alison A.; SCHUG, Malcom D.; BOOTON, Gregory C. y FUERTS, Paul A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. En: Ecology. Vol. 79, No. 2 (1998);p. 361-382

PICCA, Aurora; HELGUERA, Marcelo; SALOMÓN, Nelly y CARRERA, Alicia. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires : INTA, 2004. p. 61-68. ISBN 987-521-138-9.

POSTIGLIONI, A. G.; RINCÓN, L.; KELLY, S.; LLAMBÍ, G.; FERNÁNDEZ, M.; ANGELO, G.; GAGLIARDI, J.; TRUJILLO, M.; DE BETHENCOURT, K.; GUEVARA, A. CASTELLANO, A. Y ARRUGA M. V. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. En: Archivos de Zootecnia. Vol. 51 (2002); p.195-202

RAYMOND, M L y ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. En: Evolution. 49 (1995); p. 1280-1283.

SALEM, H.H.; ALI, B.A.; HUANG, T.H. y QIN, D.N. Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in poultry research. En: Internacional journal of poultry science. Vol. 4, No. 10 (2005), p. 804-811

SAN PRIMITIVO, F. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo xx. En: Archivos de zootecnia. Vol. 50 No. 192 (2001); p. 517- 546.

SEGURA CORREA, José y MONTES PÉREZ, Rubén. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. En: Revista Biomed. Vol. 12, No. 3 (jul. – sep. 2001); p. 196-206.

SHARMA Rishi, SINGH Manjeet y SHARMA Ajay. Polymerase chain reaction: an emerging tool for research in pharmacology. En: Indian Journal of Pharmacology. No. 34 (2002); p. 229-236.

SLATKIN, Montgomery. Gene flow and population structure. En: Ecological Genetics, Princeton University Press, Princeton. (1994); p. 1-17.

SOLARTE, Carlos y VITERI, Luis. Índice de selección, prueba de progenie, y prueba de comportamiento en cuyes. En: Revista de Zootecnia. Vol. 4, No. 7 (2001); p. 35-44.

SOLARTE, Carlos, SOTO Fernando y PÉREZ T. Modelo Animal Multicarácter par la selección de reproductores *Cavia porcellus* en Colombia. En: Revista Cubana de Ciencias Agrícolas. Vol. 36, No. 1. (2002); p. 25-29.

SOLARTE, Carlos; CARDENAS, heiber; ROSERO, Carol y BURGOS, William. Caracterización molecular de tres líneas comerciales de *Cavia porcellus* en el Departamento de Nariño mediante marcadores moleculares AFLP. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 20, No. 1 (2007); p. 49-58

SPOTORNO, Ángel; VALLADARES, Jhon; MARÍN, Juan y ZEBALLOS Horacio. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationship with the Andean wild species *Cavia tschudii*. En: Revista Chilena de Historia Natural. Vol. 77 No. 2 (2004); p. 243-250.

TAYLOR, G. Polymerase chain reaction : basic principles and automation. PCR a practical approach. s. l. : M.J. McPherson, 1991. 253 p.

VOS, Pieter; HOGERS, Rene; BLEEKER, Marjo; REIJANS, Martin; VAN DE LEE, Theo; HORNES, Miranda; FRIJTERS, Adrie; POT, Jerina; PELEMAN, Johan; KUIPER, Martin y ZABEAU, Marc. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. En: Nucleic Acids Research. Vol. 23, No. 21 (1995); p.4407-4414.

WHATMAN. FTA[®] Protocols: Collect Transport, Archive and Access Nucleic Acids...All at Room Temperature. [online], 2002 [cited septiembre 2005]: Available from internet:< <http://www.cosmobio.com.ar/docs/FTA%20Protocols.pdf2002>>

WILLIAMS, Jhon; KUBELIK, Anne; LIVAK, Kenneth; RAFALSKI, J Antoni y TINGEY, Scott. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. En: Nucleic Acids Research. Vol. 18, No. 22 (1990); p. 6531-6535.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. En: Genetics No. 16 (1931); p. 97-159.