

ESTUDIO DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN PECARÍES DE COLLAR USANDO INICIADORES PORCINOS.

Góngora JH*, Bernal JE*
Chen Y**, Moran C**, Nicholas F**

Centro de Biología Molecular, Gimnasio Campestre*.
Department of Animal Science, University of Sydney, Australia**

RESUMEN

Ochenta y nueve por ciento (89%) de dieciocho iniciadores porcinos para marcadores microsatélite amplificaron productos en DNA de pecaríes de collar: once loci fueron polimórficos. Los microsatélites porcinos son una herramienta útil para emprender estudios poblacionales del pecarí. La alta frecuencia de sucesos, sugiere una estrecha relación entre las familias Suidae y Tayassuidae, así mismo hace pensar que la hipótesis de divergencia más reciente, hace 16.8 millones de años puede ser posible sobre la de hace 33 millones de años. El presente estudio es un aporte en la caracterización y conocimiento de la relación filogenética del Pecarí de Collar colombiano.

Palabras clave: Pecarí de Collar, *Tayassu tajacu*, marcadores microsatélite.

SUMMARY

Eighty nine percent (89%) of eighteen porcine microsatellite primers amplified microsatellite products in collared peccaries. Eleven loci were polymorphic in peccaries. Porcine microsatellites will clearly be useful tools for population studies of peccaries. The high success rate suggests a closer relationship between Tayassuidae and Suidae families, more consistent with recent estimated divergence time between pig and peccary lineages of about 17 million years rather than with estimates of about 33 million years. This work is a contribution to the characterization and knowledge of the phylogenetic relation of colombian Collared Peccaries.

Key words: Collared Peccary, *Tayassu tajacu*, microsatellite markers.

INTRODUCCIÓN.

Los pecaríes, cerdos e hipopótamos son mamíferos del orden Suiforme. Se estima que las dos primeras familias se separaron hace menos de 43.2 millones de años¹ (Figura No 1). Estudios de fósiles, indican que los pecaríes se originaron en el Eoceno Tardío en el sur oriente de Asia y migraron posteriormente al viejo y nuevo mundo²⁻⁴. Registros fósiles adicionales, registran la presencia de los pecaríes en el Oligoceno y Mioceno de Europa y Plioceno del sur de África⁵. Las tres especies de pecaríes vivientes, *Catagonus wagneri*, *Tayassu pecarí* y *Tayassu tajacu* se localizan en el continente americano y provienen de ancestros de los géneros *Platygonus*, *Catagonus* y *Mylohyous*, que vivieron en el Pleistoceno en áreas de Norte y Sur América⁶⁻⁸. No obstante, registros de pecaríes "verdaderos" fueron localizados en Africa y asignados en el Mioceno⁹.

Estudios de DNA genómico y mitocondrial del Pecarí de Collar (*Tayassu tajacu*) y su comparación con otras especies animales, han permitido un mayor acercamiento al conocimiento filogenético de esta especie.

Algunos autores consideran que cerdos y pecaríes tienen un mismo origen filogenético; sin embargo, otros sugieren que los pecaríes no están tan relacionados como los hipopótamos con los cerdos¹⁰⁻¹¹.

Usando secuencias SINE PRE-1 porcino sobre DNA de Pecarí de Collar, para establecer la divergencia entre loci individuales y la rata de mutación de pseudogenes, se estimó que la especie *Tayassu tajacu* se separó de los cerdos (*Sus scrofa*) hace 16.8 millones de años¹². Un análisis comparativo del gen *citocromo b* en el DNA mitocondrial entre especies del suborden Suiforme, estimó una relación estrecha del 94% del Pecarí de Collar con el taxa hermano Suidae y una divergencia evolutiva hace 33 millones de años¹⁰⁻¹³. Estudios moleculares del gen mitocondrial para la subunidad pequeña de RNA ribosomal 12S en mamíferos del taxa Ungulata, permitieron establecer que las especies *Tayassu tajacu* y *Sus scrofa* exhiben una divergencia del 14.3%, indicando la estrecha relación con el suborden Suiforme¹⁴. Investigaciones de cuatro subfamilias de genes receptores olfatorios entre 24 especies de mamíferos, entre ellos el *Tayassu tajacu*, indicaron diferencias en el número de éstos entre las especies analizadas y estimaron que los cambios se presentaron antes de la divergencia evolutiva de estos animales, hace 60-100 millones años¹⁵.

Con base en un estudio comparativo del gen mitocondrial *citocromo b* en las tres especies de pecaríes existentes, se propone un árbol filogenético en donde se coloca al *Tayassu tajacu* conocido también como *Pecarí tajacu*, en un grupo separado de los linajes *Catagonus wagneri* y

Tayassu pecari; éstos últimos se separaron en el Pleioceno Tardío, posiblemente concomitante con la migración de pecaríes a Sur América¹⁶. Esta hipótesis tentativa, estima un tiempo de divergencia entre el Pecarí de Collar con relación al de Labios Blancos y del Chaco de hace 3.4 a 7.4 millones de años¹⁶. Se sugiere que los linajes *Pecari* y las otras dos especies divergieron en Norte América, antes que cualquiera de las dos ramas colonizaran Sur América, así mismo fundamentan la clasificación de los pecaríes en tres géneros¹⁶.

Un estudio comparativo de DNA mitocondrial entre pecaríes de collar de Arizona y Texas usando 12 enzimas de restricción, permitió establecer la frecuencia de haplotipos que presenta un patrón de variación genética según la distribución geográfica de los especímenes estudiados, sugiriendo que los pecaríes de Arizona tienen un origen en al menos tres linajes de DNA mitocondrial, probablemente originados en México¹⁷. Con base en estos resultados se propone que los eventos se establecieron en el borde del rango de la expansión del pecarí, cimentando la inicial división de los haplotipos observados en las muestras de Arizona¹⁷.

Este artículo presenta un estudio de marcadores microsatélites usando una estrategia interespecífica de iniciadores porcinos sobre DNA de Pecarí de Collar con el propósito de establecer el tamaño de los alelos para estas secuencias, compararlos con los datos obtenidos previamente en cerdos comerciales. Aportando así en la caracterización de una especie de la fauna colombiana, considerada promisoría para zootecnia de importancia económica y cultural para las comunidades indígenas y parte fundamental de los ecosistemas para el control de pequeños animales terrestres y en la dieta de los carnívoros.

La presente investigación se desarrolló conjuntamente con el Departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Sydney Australia, durante la pasantía de uno de los investigadores colombianos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Muestras de sangre periférica de seis pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) del Zoológico de Santa Cruz fueron utilizadas para extraer DNA por el método de extracción salina¹⁸.

Dieciocho pares de iniciadores para marcadores microsatélites porcinos (*Sus scrofa*) fueron usados para amplificar sitios correspondientes en el DNA de pecarí¹⁹⁻²². Volúmenes de 10 ml se usaron para desarrollar la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, conteniendo Buffer II 1X para PCR (Perkin Elmer), MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2mM, cada iniciador 0.1 mM, 0.6 unidades de Ampli Taq Gold (Perkin Elmer) and 100 ng de DNA molde.

Los volúmenes de reacción fueron colocados en el termociclador con el siguiente programa: Denaturación inicial a 95°C por 5 min, 10 ciclos a 94°C por 40 s, 60°C por 1 min y 70°C por 1 min, 15 ciclos a 94°C por 40 s, 58°C por 1 min y 70°C

por 1 min, 20 ciclos a 94°C por 40 s, 55°C por 1 min y 70°C por 1 min, seguido de una extensión final de 72°C por 30 min. Este protocolo de PCR es utilizado rutinariamente para amplificar microsatélites porcinos en la Universidad de Sydney. Parte de los productos PCR fueron corridos en geles de Agarosa al 2% para establecer la amplificación (Figura No. 1) y otra parte en geles de Poliacrilamida al 6% por 8 h en un secuenciador automático ABI 373 para determinar el tamaño. Los datos fueron analizados con el programa GeneScan (Perkin Elmer).

RESULTADOS.

Dieciséis de dieciocho pares de iniciadores porcinos para marcadores microsatélites amplificaron exitosamente en las muestras de DNA de pecaríes (Tabla No 1). Los iniciadores S0155, SW1301, S0002, S0005 y SW632 amplificaron productos de tipo monomórfico, mientras que los demás fueron de tipo polimórfico. En dos casos, los productos PCR estuvieron en el rango del tamaño observado previamente para porcinos comerciales australianos, mientras que los demás marcadores presentaron algunos o todos los alelos fuera de este rango, sin que fueran sustancialmente diferentes. El iniciador SW240 presentó más de una banda en el corrido electroforético, indicando que más de un marcador fue amplificado.

Marcador	PORCINOS		PECARIES DE COLLAR	
	Cromosoma	Rango de tamaño (bp) ^a	Rango del tamaño de los productos PCR (bp) ^b	Cantidad de alelos
S0155	1	150-166	121	1
SW1301	1	162-174	164	1
S0226	2	182-212	176-184	2
SW240	2	95-115	95-111	3
SW72	3	99-117	104-124	3
S0002	3	189-212	203	1
S0227	4	231-256	226-230	2
SW378	5	123-127	106-126	4
IGF1	5	194-210	204-216	3
S0005	5	204-248	202	1
SW632	6	157-174	134	1
S0228	6	222-244	146-306	4
SW122	6	111-125	114-126	2
SW951	10	124-133	124-152	3
SW857	14	144-162	138-158	4
S0355	15	246-274	np ^c	
S0026	16	97-106	95-97	2
SW249	17	136-153	np	

^a Rango del tamaño de los alelos encontrados en cerdos australianos.

^b Alelos obtenidos en las muestras de los seis pecaríes.

^c No se obtuvo producto PCR.

Tabla No 1. Uso de iniciadores microsatélites porcinos sobre DNA de Pecaríes.

DISCUSIÓN

Los microsatélites prometen ser útiles en estudios poblacionales y filogenéticos del pecarí. El uso interespecífico de iniciadores porcinos sobre el genoma del pecarí puede ayudar en este propósito.

Existen varias investigaciones del uso interespecífico de iniciadores microsatélites que involucran diversas especies. Se reporta que 58% y 61% de iniciadores bovinos ampli-

ficaron microsatélites en ovinos y caprinos respectivamente²³⁻²⁴. En otros estudios, se estableció que 69% de iniciadores microsatélites bovinos amplificaron productos de ovinos y que 87% iniciadores microsatélites caprinos amplificaron un locus ovino (Maadox J, comunicación personal).

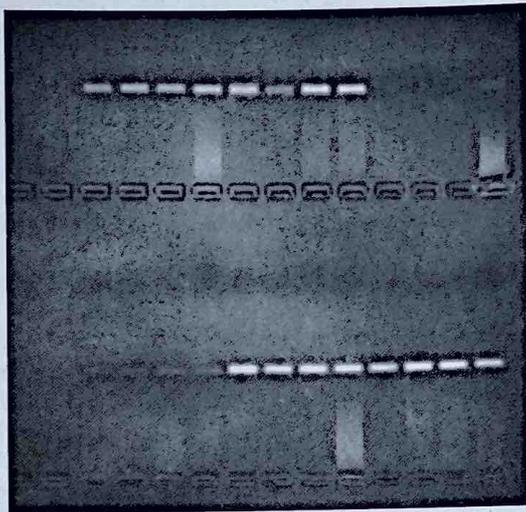


Figura No 1. Determinación de productos amplificados de marcadores microsatélites de seis pecaríes de collar usando tres pares de iniciadores porcino, en un gel de Agarosa al 2%.

El tiempo de divergencia o separación evolutiva estimada entre bovinos y ovinos, es de hace 18 millones de años, mientras que para ovejas y cabras es de hace 14 millones de años²⁵⁻²⁶. La frecuencia de éxito obtenida en el presente estudio del 89%, muestra un bajo nivel de divergencia de nucleótidos entre porcinos y pecaríes, sugiriendo una estrecha relación, que a la vez puede ser explicada por la estimación de divergencia reciente de hace 16.8 millones de años entre estas dos familias más que la de hace 33 millones de años^{10,12}. Aunque, no es propósito del presente trabajo sustentar divergencias evolutivas a través de microsatélites, si sugiere que es posible obtener mayor frecuencia de éxitos en la amplificación interespecífica por PCR, utilizando cebadores específicos de especies que presentan poca divergencia evolutiva con relación a aquellas que son objeto de estudio.

Mayores estudios, usando otros iniciadores microsatélites porcinos, permitirán conocer nuevos datos sobre la frecuencia alélica en las diferentes poblaciones de pecaríes. Los microsatélites serán de utilidad en estudios de subespecies y especies de pecaríes, al aportar información sobre la variabilidad genética y relaciones que presenta la familia Tayassuidae. Los microsatélites podrán ser usados para establecer el origen y relación parental de los especímenes nacidos en zoológicos y zoológicos, análisis que ayudará para propósitos de manejo dirigido y adecuado en la reproducción del *Tayassu tajacu*. Además junto a otras estrategias de citogenética molecular como Zoo-FISH, ayuda-

rán a esclarecer el origen de los cromosomas y posición filogenética del pecarí con relación a los cerdos y otros mamíferos.

GLOSARIO.

Alelos: Formas alternativas de una secuencia de DNA localizadas en lugares determinados del genoma.

Bandas de electroforesis: fragmentos de DNA separados de acuerdo con el tamaño en geles de poliacrilamida o agarosa.

DNA microsatélite: Secuencias de cinco bases o menos repetidas una detrás de otra en tándem, con un número de unidades repetitivas de 30 o menos, localizándose en cualquier parte del genoma.

Gen: Segmento de DNA que contiene información genética y puede expresar una característica particular.

Locus: (en plural, loci) Posición o lugar que ocupa una de secuencia de DNA en un cromosoma.

Marcador microsatélite: DNA repetitivo en tándem correspondiente a una posición específica de un cromosoma.

PCR: Método que sintetiza copias de DNA mediante reacciones sucesivas de la DNA polimerasa sobre secuencias molde en presencia de desoxinucleótidos dNTPs e iniciadores.

Polimorfismo: Existencia de dos o más alelos de un locus.

Secuencia SINE: Tipo de DNA repetitivo disperso en el genoma, conocido como elementos cortos intercalados, con un tamaño inferior a 500 bases.

Agradecimientos.

Agradecemos a Zung Doan por las enseñanzas durante la pasantía en la Universidad de Sydney y al Zoológico Santa Cruz por facilitar las muestras.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Yasue H, Wada Y. A swine SINE(PRE-1 sequence) distribution in swine-related animal species and its phylogenetic analysis in swine genome. *Anim Genet* 1996;27:95-8.
2. Ducrocq S. An Eocene peccary from Thailand and the biogeographical origins of the artiodactyl family Tayassuidae. *Paleontology* 1994;37:765-79.
3. Pickford M. Update on hippo origins. *C R Acad Sci Ser II*: 1989;163-8.
4. Pickford M. Old world suoid systematics, phylogeny, biogeography and biostratigraphy. *Paleontol Evolution* 1993;26-27:237-69.
5. Hendey QB. Fossil peccary from the pliocene of South Africa. *Science* 1976;192:787-9.
6. Groves CP and Grubb P. The Suborder Suiformes. In: *Pigs, Peccaries and Hippos*, (Oliver WLR, ed). Gland, Switzerland: IUCN, The World Conservation Union; 1993:1-4.
7. Wetzel RM, Dubos RE, Marti RL, Meyers P. *Catagonus*, an "extinct" peccary, alive in Paraguay. *Science* 1975;189:379-81.

8. Ruvinsky A, Rothschild MF. Systematics and Evolution of the Pig. In: *The Genetics of the Pigs*, (Rothschild MF & Ruvinsky A, eds). Oxon and New York: CAB International; 1998:1-16.
9. Pickford M. A revision of the Miocene Suidae and Tayassuidae (Artiodactyla, Mammalia) of Africa. *Tertiary Res* 1986;7:1-83.
10. Randi E, Lucchini V, Diong CH. Evolutionary genetics of the Suiformes as reconstructed using mtDNA sequencing. *J Mammal Evol* 1996;3:163-94.
11. Jerman TM, Opitz JG, Stackhouse J, Benner SA. Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature* 1995;374:57-9.
12. Sulandari S, Muladno, Harumi T, Yanai S, Wada Y, Yasue H. Localization of swine PRE-1 homologues in 13 loci of Phacochoerus aethiopicus and Tayassu tajacu genomes, and their sequence divergence. *Anim Genet* 1997;28:210-5.
13. Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 1991;32:128-44.
14. Douzery E, Catzeflis FM. Molecular evolution of the mitochondrial 12S rRNA in Ungulata (Mammalia). *J Mol Evol* 1995;41:622-36.
15. Issel-Tarver L, Jasper R. The evolution of mammalian olfactory receptor genes. *Genetics* 1997;145:185-95.
16. Theimer T, Keim P. A molecular phylogeny of peccaries: Comparative analysis of the cytochrome b gene. *J Mammal* 1998;79:566-72.
17. Theimer T, Keim P. Genetic subdivision of an expanding population of a large, social mammal: Mitochondrial DNA variation in Arizona Collared peccaries. *J Mammal* 1994;75:121-8.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
19. Archibald AL, Haley CS, Brown JF, Couperwhite S, McQueen H, Nicholson D, Coppeters W, Van de Weghe A, Stratil A, Wintero A-K, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen V.H, Milan D, Woloszyn N, Robic A, Dalens M, Riquet J, Gellin J, Caritez J.-C, Burgaud G, Ollivier L, Bidanel J-P, Vaiman M, Renard C, Geldermann H, Davoli R, Ruyter D, Verstege JM, Groenen MAM, Davies W, Hoyheim B, Keiserud A, Andersson L, Ellegren H, Johansson M, Marklund L, Miller J.R, Anderson Dear D.V, Signer E, Jeffreys AJ, Moran C, Le Tissier PR, Muladno, Rothschild MF, Tuggle CK, Vaske D, Helm J, Liu H-C, Rahman A, Yu T-P, Larson RG, Schmitz CB. The PiGMAP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). *Mammal Genome* 1995;6:157-75.
20. Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 1994;136:231-45.
21. Rohrer GA, Alexander LJ, Hu Z, Smith TP, Keele JW, Beattie CW. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res* 1996;6:371-91.
22. Moran C. Microsatellite repeats in pig (Sus domestica) and chicken (Gallus domestics) genomes. *J Hered* 1993;84:274-80.
23. de Gortari MJ, Freking BA, Kappes SM, Leymaster KA, Crawford AM, Stone RT, Beattie CW. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Anim Genet* 1997;28:274-90.
24. Pépin L, Amigues Y, Léplinge A, Berthier J-L, Bensaid A, Vaiman D. Sequence conservation of microsatellites between Bos taurus (cattle), Capra hircus (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 1995;74:53-61.
25. Miyamoto MM, Kraus F, Laipis PJ, Tanhauser SM, Webb SD. Mitochondrial DNA phylogenies within Artiodactyla. In: *Mammal Phylogeny*. (Szalay FS, Novacek MJ, and McKenna MC, eds). New York: Springer-Verlag; 1993;181-268.
26. Honeycutt RL, Nedbal MA, Adkins RM, Janeck LL. Mammalian mitochondrial DNA evolution: A comparison of the cytochrome b and c oxidase II genes. *J Mol Evol* 1995;40:260-72.