Con motivo de la CONVOCATORIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DE CREACIÓN ARTÍSTICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA 2010-2012 Modalidad 2: Fortalecimiento a grupos de investigación y creación artística con proyección nacional, ALIANZAS DE GRUPOS; los grupos Biodiversidad y Genética Molecular (BIOGEM) y Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, ganaron dicha convocatoria con el proyecto titulado "Técnicas moleculares utilizadas en el mejoramiento de la producción animal y la conservación de la biodiversidad".

Los participantes de dicha alianza fueron profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias pertenecientes al Departamento de Producción Animal y al Departamento de Ciencias Forestales.

Durante el tiempo de existencia de ambos grupos, cada uno de ellos ha dedicado sus actividades en pro del desarrollo de la producción agrícola y la conservación de la biodiversidad. La mayor parte de la investigación desarrollada por estos grupos se ha venido especializando en la utilización de técnicas moleculares, dando éstas una gran validez científica a los resultados obtenidos. La alianza de los grupos ha fortalecido el quehacer de los mismos, pues amplió la base de docentes con alto desempeño investigativo, facilitó el mejor aprovechamiento de los laboratorios y recursos con los que cada uno cuenta. Esta alianza en torno al tema de la utilización de técnicas moleculares para la producción animal y la conservación de la diversidad, ha sido abordada de una forma multidisciplinaria, pues entre el personal que conforma los grupos de investigación de la alianza hay Veterinarios, Zootecnistas y Biólogos, facilitando el entendimiento y aprovechamiento de las fortalezas de cada profesional. El programa de ALIANZAS DE GRUPOS consideró la escritura de este texto de carácter científico. El impacto de este proyecto a futuro cercano será el reconocimiento de los grupos y especialmente de la alianza, con el objetivo de fortalecer, mediante la utilización de las técnicas moleculares, el desarrollo de la producción pecuaria y la conservación de la biodiversidad.

9 789587 614978

Biología Molecular aplicada a la Producción Animal y Conservación de Especies Silvestres

BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA A LA PRODUCCIÓN ANIMAL Y LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES

Edición
Albeiro López H.

Edición
Albeiro López Herrera

Ángela M. Ortega-León.
Carlos E. Ortíz-Yusty
Edna Judith Márquez
Jaime Eduardo Parra Suescun
Joan Gastón Zamora-Abrego
Johana Andrea Ciro Galeano
José Julián Echeverri Zuluaga
Juan Carlos Rincón Flórez
Julio Cesar Hurtado-Alarcón
Néstor Javier Mancera-Rodríguez
Norma L. Manríquez-Morán
Samir Benicio Brú Cordero
Sandra Clemencia Pardo Carrasco
Ximena Cardona Lopera

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

636.0821
B46 Biología molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres / Albeiro López Herrera ... [et al.]. -- Medellín : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, 2013.
388 p. : il.

ISBN : 978-958-761-497-8

1. PRODUCCIÓN ANIMAL. 2. MEJORAMIENTO GENÉTICO. 3. BIOLOGÍA MOLECULAR. 4. MARCADORES GENÉTICOS. 5. DIVERSIDAD BIOLÓGICA 6. ACUICULTURA. 7. GANADERÍA. 8. ANIMALES DOMÉSTICOS. I. López Herrera, Albeiro. II. Tít.

Biologia molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres
© Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agrarias - Sede Medellín
© Albeiro López Herrera
© Ángela M. Ortega-León.
© Carlos E. Ortíz-Yusty
© Edna Judith Márquez
© Jaime Eduardo Parra Suescun
© Joan Gastón Zamora-Abrego
© Johana Andrea Ciro Galeano
© José Julián Echeverri Zuluaga
© Juan Carlos Rincón Flórez
© Julio Cesar Hurtado-Alarcón
© Néstor Javier Mancera-Rodríguez
© Norma L. Manríquez-Morán
© Samir Benicio Brú Cordero
© Sandra Clemencia Pardo Carrasco
© Ximena Cardona Lopera

ISBN: 978-958-761-497-8
Primera edición: febrero de 2013, 300 ejemplares

Diseño de carátula: Jhonatan Castro López

Impresión : Centro de Publicaciones
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Impreso y hecho en Medellín, Colombia

Prohibida la reproducción parcial o total de est-a obra por cualquier medio sin la autorización escrita de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Biología Molecular Aplicada a la Producción Animal y la Conservación de Especies Silvestres

Biología Molecular Aplicada a la Producción Animal y la Conservación de Especies Silvestres

Albeiro López Herrera
Ángela M. Ortega-León.
Carlos E. Ortíz-Yusty
Edna Judith Márquez
Jaime Eduardo Parra Suescun
Joan Gastón Zamora-Abrego
Johana Andrea Ciro Galeano
José Julián Echeverri Zuluaga
Juan Carlos Rincón Flórez
Julio Cesar Hurtado-Alarcón
Néstor Javier Mancera-Rodríguez
Norma L. Manríquez-Morán
Samir Benicio Brú Cordero
Sandra Clemencia Pardo Carrasco
Ximena Cardona Lopera

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Medellín
2013

636.0821
B46 Biología molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres / Albeiro López Herrera ... [et al.]. -- Medellín : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, 2013.
388 p. : il.

ISBN :

1. PRODUCCIÓN ANIMAL. 2. MEJORAMIENTO GENÉTICO. 3. BIOLOGÍA MOLECULAR. 4. MARCADORES GENÉTICOS. 5. DIVERSIDAD BIOLÓGICA 6. ACUICULTURA. 7. GANADERÍA. 8. ANIMALES DOMÉSTICOS. I. López Herrera, Albeiro. II. Tít.

Biologia molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres
© Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agrarias - Sede Medellín
© Albeiro López Herrera
© Ángela M. Ortega-León.
© Carlos E. Ortíz-Yusty
© Edna Judith Márquez
© Jaime Eduardo Parra Suescun
© Joan Gastón Zamora-Abrego
© Johana Andrea Ciro Galeano
© José Julián Echeverri Zuluaga
© Juan Carlos Rincón Flórez
© Julio Cesar Hurtado-Alarcón
© Néstor Javier Mancera-Rodríguez
© Norma L. Manríquez-Morán
© Samir Benicio Brú Cordero
© Sandra Clemencia Pardo Carrasco
© Ximena Cardona Lopera

ISBN:

Primera edición: abril de 2013

Diseño de carátula: Jhonatan Castro López

Impreso y hecho en Medellín, Colombia

Prohibida la reproducción parcial o total de est-a obra por cualquier medio sin la autorización escrita de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

PRESENTACION

Los grupos de investigación "Biodiversidad y Genética Molecular. BIOGEM" y "Ecología y Conservación de Fauna Silvestre", pertenecientes a los departamentos de Producción Animal y Ciencias Forestales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, han unido esfuerzos y en el ultimo año han ejecutado un programa de fortalecimiento de la investigación en el área de genética molecular, aplicada a los estudios zootécnicos y conservación de especies silvestres. En este sentido se han incrementado los proyectos de investigación en las áreas mencionadas, se han hecho esfuerzos por dar visibilidad a los productos de dichas investigaciones y se ha propendido por llegar a productores, estudiantes e investigadores interesados en profundizar en los tópicos de biología molecular y conservación de especies silvestres. Es así como con la participación de profesores, estudiantes y la colaboración de expertos externos a la Universidad se ha obtenido este texto de consulta que se espera que sea un aporte importante para toda la comunidad investigativa de las ciencias biológicas.

El libro esta conformado por 7 capítulos, en los cuales se abordan temas de genética molecular y su aplicación en diferentes ámbitos de la investigación zootécnica y la conservación de especies silvestres. Desde el punto de vista del análisis zootécnico, el libro involucra información teórica y tópicos investigativos relativos a la producción bovina, porcina y piscícola, además de incluir aspectos relacionados con las ventajas de la utilización de marcadores moleculares en áreas como la fisiología animal, el mejoramiento genético y la conservación de especies silvestres.

Julian Echeverri

CONTENIDO

PRESENTACION 7

CAPÍTULO 1. EL DESTETE Y LA FISIOLOGÍA DIGESTIVA EN CERDOS 13
Arquitectura intestinal y destete 18
Conformación de la barrera intestinal durante el destete..... 21
Expresión y síntesis molecular de enzimas intestinales en el periodo posdestete 25
El destete y la interrupción en los procesos de absorción 28
Mecanismos de defensa intestinales durante el destete..... 31
Activación del sistema inmunológico en el periodo posdestete 32
El destete y su relación con la microbiota intestinal 34
Salud del tracto gastrointestinal alrededor del destete..... 36
Expresión de TNF-α y su relación con la arquitectura intestinal ... 38
Mediadores inflamatorios (TNF-α) y los procesos de transporte de nutrientes 41
TNF-α y diferenciación celular intestinal..... 42

CAPÍTULO 2. USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ALGUNAS ENFERMEDADES EN ANIMALES DOMÉSTICOS 61
Algunas enfermedades producidas por virus que pueden ser detectadas por PCR..... 65
Algunas enfermedades producidas por protozoarios que pueden ser detectadas por PCR..... 70
Algunas enfermedades causadas por bacterias que pueden ser detectadas por PCR..... 72

Diagnostico por PCR de patógenos causantes de mastitis bovina .. 77
Diagnostico por PCR de enfermedades genéticas 80

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS MOLECULAR Y SU IMPACTO EN EL MEJORAMIENTO ZOOTÉCNICO 99
Introducción 101
Asociaciones entre los haplotipos de las proteínas de la leche y caracteres de producción 113
Avances en el mejoramiento genético por el uso de los marcadores moleculares 117

CAPÍTULO 4. EVOLUCIÓN Y DIVERSIDAD DE LOS BOVIDOS DOMÉSTICOS..... 133
Introducción 135
Constitución genética y fenotipo 138
Obtención del DNA 141
-Información del DNA mitocondrial..... 143
-Información del DNA nuclear 144
Marcadores Moleculares dominantes y co-dominantes 145
Diversidad 147
Subdivisión poblacional..... 149
Distancias genéticas 149
Estructura de poblaciones, estadísticos F de Wright..... 150
Árboles Filogenéticos (generalidades) 154
-Homología y relaciones genéticas..... 154
-Arboles filogenéticos (UPGMA, Neighbor joining, Máxima verosimilitud, Bayesianos)..... 157
Modelos de sustitución..... 161
Métodos de reconstrucción filogenética 163
Filogenia de los Bovinos 165
Diversidad en poblaciones bovinas 175
Filogenética de los caprinos y ovinos 176
Diversidad en poblaciones caprinas..... 180

CAPÍTULO 5. LAS TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTAS EN LA ACUICULTURA 191
Acuicultura: sistema productor de alimentos en el mundo ... 193
Acuicultura en colombia 198
Factores limitantes de la acuicultura 200

Uso de las técnicas moleculares en acuicultura 203
Herramientas para la identificación de especies acuícolas y otros organismos usados en los sistemas de producción . 204
Potencial de la nutrigenómica en la alimentación acuícola y la disminución de los impactos ambientales de la acuicultura..... 205
Marcadores moleculares en reproducción acuícola 212
Uso de marcadores moleculares en el control de las enfermedades de los organismos acuáticos 217

CAPÍTULO 6. USO DE CITOGENÉTICA Y TÉCNICAS MOLECULARES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PECES COLOMBIANOS..... 237
Resumen 239
Introducción 240
Citogenética y técnicas moleculares para la evaluación de variabilidad genética en peces..... 243
Estudios citogenéticos en peces..... 244
Estudios de variabilidad genética usando marcadores bioquímicos y moleculares en peces 250
Estudios con Electroforesis de Aloenzimas e Isoenzimas en peces 250
Estudios con marcadores moleculares de ADN..... 252
Estudios con RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente) 252
Estudios con AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados) 255
Estudios con secuenciación de regiones del ADN mitocondrial en peces..... 257
Estudios con regiones de ADN Microsatélites..... 262
Estudios de Genómica en peces..... 273
Perturbaciones en poblaciones de peces por origen antropogénico 276
Conclusiones 279

CAPÍTULO 7. USO DE TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA CONSERVAR LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA 313
Introducción 316

Una breve introducción a la biología molecular y su utilidad en la conservación biológica 318
Uso de técnicas moleculares como herramienta para conservación de la diversidad biológica 320
Filogeografía 320
La Teoría de Coalescencia 322
Marcadores Utilizados en Análisis Filogeográfico 326
La Filogeografía en la Conservación..... 328
Método Comparativo Filogenético 332
Contrastes Filogenéticamente Independientes 335
Autocorrelación Filogenética 340
Diversidad Filogenética y Selección de Áreas Prioritarias para la Conservación 349
Índices de Diversidad Filogenética 353
Conclusiones 361

CAPÍTULO 1

El destete y la fisiología digestiva en cerdos

Jaime Eduardo Parra Suescún[1]
Johana Andrea Ciro Galeano[2];
Albeiro López Herrera[3]

[1] Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
[2] Zoot, MSc. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Facultad de ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
[3] Zoot, MV, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Los sistemas modernos de producción porcina, no sólo han avanzado en la obtención de líneas genéticas precoces, con mejores índices de conversión de alimento, sino también hacia el destete de animales a edades muy tempranas (Gómez, 2006). Como resultado, al momento del destete los cerdos son ahora más jóvenes –pequeños y fisiológicamente inmaduros- y su sistema digestivo está menos desarrollado, lo que los hace más susceptibles a problemas digestivos en el periodo posdestete (Parra *et al.,* 2011). El destete a nivel comercial se cataloga como un acontecimiento forzado, siendo un proceso fisiológico en ambiente natural (Gómez *et al.,* 2008).

En el destete bajo sistemas comerciales se producen diferentes tipos de estrés que disminuyen la productividad del cerdo de manera simultánea, dentro de los cuales se pueden encontrar, estrés de tipo nutricional, medioambiental y etológico (Vente-Spreeuwemberg *et al.,* 2003). Por lo anterior, el destete provoca un estrés de tipo nutricional, ya que el animal pasa de consumir una dieta altamente digestible (leche) y muy bien adaptada a las enzimas presentes en el tubo digestivo, a una dieta sólida a base de alimentos de origen vegetal, no siempre adecuada a las necesidades de un aparato digestivo todavía inmaduro y con baja capacidad digestiva (Aguilera *et al.,* 2003; Gómez *et al.,* 2008). Como

posibles consecuencias de este cambio nutricional, se encuentran la disminución en la tasa de crecimiento y la atrofia de las vellosidades en el intestino delgado.

Al inicio de la vida del cerdo las vellosidades intestinales tienen forma de digitaciones alargadas (Xu *et al.,* 2001; 2002). Sin embargo, al momento del destete, la longitud de las vellosidades se reduce casi a la mitad y aumenta la profundidad de las criptas, provocando la aparición de una mayor proporción de enterocitos inmaduros en los extremos de las vellosidades (Reis de Souza *et al.,* 2007; Zhenfeng *et al.,* 2008).

El epitelio intestinal sirve como una barrera física que previene la entrada de compuestos patógenos a la circulación sistémica a través de la secreción de mucinas, péptidos de defensa (principalmente beta-defensinas), y de la formación de las uniones apretadas (Piè *et al.,* 2004). Bajo ciertas circunstancias fisiopatológicas o de estrés esta barrera puede ser afectada permitiendo el acceso de organismos patógenos y endotoxinas del tracto gastrointestinal a la circulación sistémica (Pitman y Blumberg, 2000; García-Herrera *et al.,* 2003).

El lechón recién nacido depende de la inmunidad pasiva suministrada por la madre, ya que apartir de los 28-30 días de edad el lechón no es capaz de tener su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas (Piè *et al.,* 2004), y solo completa el desarrollo de su sistema inmunitario hasta las 8 semanas de vida. Debido a lo anterior, la exposición

a nuevos patógenos y antígenos inocuos durante este período de tiempo, podría dar lugar a respuestas ineficaces a patógenos, o a innecesarias respuestas inmunitarias al alimento y a la flora comensal inocua (Pluske *et al.,* 2003). Por tanto, cualquier tipo de estrés que se presente durante este período va a afectar al lechón desde el punto de vista inmunológico (Vente-Spreeuwemberg *et al.,* 2001).

El medio ambiente adverso y el estrés generado por enfermedades infecciosas usualmente limitan la capacidad productiva del lechón. En la lactancia, las bacterias dominantes en estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos, estando ambas especies bien adaptadas a utilizar el sustrato lácteo disponible. Tras el destete, y en particular si este se realiza bruscamente, se produce un periodo breve de ayuno, favoreciendo la disminución y disponibilidad del sustrato específico (lactosa) para dichos microorganismos. Debido a lo anterior, comienza a proliferar la población de *E. coli* (Riestschel y Christian, 2001). Estas bacterias liberan sustancias proinflamatorias desde su pared, que interactúan con el hospedero y su sistema de defensa (Dauphinee y Karsan, 2006).

Estas sustancias son reconocidas por receptores específicos en la membrana celular del enterocito activando a su vez varias rutas de señalización celular, cuyas cascadas de traducción favorecen la producción de citoquinas proinflamatorias (Johnson *et al.,* 2005; García-Herrera *et al.,* 2008), las cuales provocan cambios importantes en la estructura y capacidad funcional del intestino. Una gran cantidad de citoquinas han

sido implicadas en tales efectos adversos (Asaduzzaman *et al.,* 2008), las cuales pueden contribuir al daño tisular bajo ciertas condiciones (Hataya *et al.,* 2003; Waseem *et al.,* 2008).

Debido a lo anterior, los mediadores liberados durante los procesos inflamatorios activan una serie de cascadas de señalización intracelular, donde la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) es de gran importancia (Korcheva *et al.,* 2007; Oner *et al.,* 2008). Las MAPK son un grupo de serina/treonina quinasas presentes en todas las células eucariotas y participan en múltiples procesos celulares, entre ellos la absorción (Waetzig *et al.,* 2002). Por lo anterior, la expresión de citoquinas proinflamatorias durante el destete, actúan como reguladoras directas o indirectas del desarrollo celular, trasporte de nutrientes y de la permeabilidad epitelial intestinal en lechones (Pié *et al.,* 2004; Albin *et al.,* 2007).

ARQUITECTURA INTESTINAL Y DESTETE

El desarrollo del intestino delgado de lechones recién nacidos pasa por un proceso de desarrollo acelerado durante los primeros 10 días de vida, ocurriendo incrementos significativos en su peso, longitud y diámetro, que están asociados al aumento de peso de la mucosa intestinal, a la altura y diámetro de sus vellosidades, y a la población de enterocitos (Reis de Souza *et al.,* 2005).

Al inicio de la vida del cerdo las vellosidades tienen forma de dedos alargados y conforme avanza la edad éstas se van engrosando, presentando al final del día 49 de edad una

apariencia en forma de lengua (Erridgea *et al.,* 2002; Müller *et al.,* 2011). Previo al destete, las vellosidades intestinales son largas, bien estructuradas, y muy eficientes en la absorción de nutrientes. Sin embargo, los procesos fisiológicos desencadenados por el destete afectan el intestino delgado a nivel funcional y estructural. Generalmente, estas afecciones están caracterizadas por la disminución en la altura de las vellosidades, el incremento en la profundidad de las criptas de Lieberkühn, la reducción en la actividad específica de las enzimas digestivas (disacaridasas y aminopepetidasas), y la disminución en la capacidad de absorción (Zhenfeng *et al.,* 2008). Todo lo anterior conlleva a la reducción del 20-30% del peso de este órgano y al síndrome de diarrea posdestete (Parra *et al.,* 2011).

Por lo anterior, para que los procesos de digestión y absorción de nutrientes se den de una manera satisfactoria, es necesario que se mantenga la integridad de las células funcionales de las vellosidades, los enterocitos (Fan, 2002). Los enterocitos están conformados por diferentes estructuras, dentro de las cuales, la vilina es de gran importancia. La vilina es una proteína cuya función es dar soporte, elasticidad y motilidad a los enterocitos de las vellosidades. Debido a esto, la expresión molecular y síntesis de esta proteína es de gran importancia para el desarrollo de las vellosidades, y por ende, para los procesos fisiológicos de éstas. Sin embargo, la expresión de esta proteína puede ser alterada drásticamente por diferentes factores durante la vida de los lechones, entre ellos, los procesos fisiológicos desencadenados por el destete y la presencia de infecciones microbianas (Fan, 2002).

Revenu *et al.,*(2007) introduciendo mutaciones en ratones para reprimir la actividad de la vilina, reportaron que durante el destete se presentan cambios en la estructura de las microvellosidades y a su vez en expresión molecular de las proteínas de unión a actina, específicamente de vilina, la cual es responsable de la organización y el mantenimiento del citoesqueleto de las vellosidades. Además, Athman *et al.,* (2005) utilizando ratones recién nacidos como modelo animal, encontraron mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR), que la disminución en la expresión molecular de la vilina provoca lesiones en las vellosidades, caracterizadas principalmente por descamación, edema e inflamación en enterocitos, provocando la ruptura de los filamentos de actina y la consecuente aparición de enterocitos débiles e inmaduros en las vellosidades.

Por lo anterior, después del destete en cerdos la disminución en la expresión molecular de vilina favorece la aparición de cambios a nivel funcional y estructural que suceden dentro de las primeras 24 horas posdestete, los cuales están caracterizados por la disminución en la altura de las vellosidades (atrofia), y el incremento en la profundidad de las glándulas (Vente-Spreeuwemberg *et al.,* 2001, Hedemann *et al.,* 2006). Además, esta atrofia conlleva a la reducción en la actividad específica de las enzimas digestivas, debido a la reducción en la superficie para los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Rodrigues *et al.,* 2007; Zhenfeng *et al.,* 2008).

En las investigaciones realizadas por Vente-Spreeuwenberg *et al.,*(2001) y Yen (2002) utilizando la técnica de PCR, encontraron que la disminución en la expresión molecular de vilina es consecuente con el incremento en el ancho de las vellosidades observado en los días siguientes al destete, y que a su vez está probablemente ligado a los cambios que se producen en la mucosa intestinal como respuesta compensatoria a la disminución en la altura de éstas (atrofia de vellosidades). Además, Boudry *et al.,* (2004); Vente-Spreeuwemberg *et al.,* (2001); Hedemann *et al.,* (2006), encontraron que la expresión y actividad de la vilina es afectada por diversas señales moleculares producidas por eventos característicos del destete, dentro de los cuales se encuentra el ayuno.

CONFORMACIÓN DE LA BARRERA INTESTINAL DURANTE EL DESTETE

Además de sus propiedades digestivas, el intestino forma una barrera física dinámica, la cual bajo condiciones normales regula la absorción de nutrientes, iones y agua; y a su vez previene la entrada de compuestos tóxicos y patógenos a la mucosa intestinal y a la circulación sistémica (Pié *et al.,* 2004). Esta barrera está formada principalmente por las uniones apretadas, las cuales son complejos multiproteicos que unen y sellan los espacios entre enterocitos adyacentes cerca de su borde apical, limitan el movimiento de moléculas vía paracelular (McLaughlin, 2004; Lamb-Rosteki *et al.,* 2008), y participan en la preservación de la polaridad celular y en los mecanismosde difusión intestinal (Shen y Turner, 2005).

Las uniones apretadas están conformadas por diferentes tipos de proteínas, dentro de las cuales se encuentran la Zonula Ocludens (ZO), y las Claudinas C3 y C4. Estas proteínas se encuentran conectadas con el citoesqueleto (principalmente al anillo de actomiosina) de los enterocitos, actuando como bases estructurales y reguladoras de la permeabilidad de las uniones apretadas (Tlaskalová-Hogenová, 2004). McLaughlin (2004), mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real qPCR (quantitative real time polymerase chain reaction) en líneas celulares intestinales Caco-2, encontró que la disminución en las propiedades de la barrera intestinal está relacionada con la disminución en la expresión molecular de C3 y C4, y su consecuente desaparición en las membranas. Estos resultados sugieren que la remoción de las isoformas específicas de claudinas disminuyen la función de la barrera intestinal. No obstante, las propiedades de la barrera intestinal pueden ser afectadas bajo situaciones fisiopatológicas (infecciones bacterianas o virales principalmente) o de estrés (de tipo nutricional principalmente) desencadenas por el proceso del destete (Pitman y Blumberg, 2000).

El destete brusco induce la mortalidad de lactobacilos y estreptococos, debido a que tras el destete se produce un periodo breve de ayuno y el consumo posterior de una nueva ración sólida, alterando la disponibilidad del sustrato específico para estos microorganismos en todos los segmentos del tracto digestivo (Reis *et al.,* 2005). Esta ausencia de sustrato favorece el aumento de la población de bacterias gran negativas, en especial de *E. coli*, la cual libera

desde su pared celular productos proinflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS) (Amador *et al.,* 2007).

Los LPS son endotoxinas reconocidas por cualquier hospedero, a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática, como una entidad patogénica importante que tiene la capacidad de activar una gran variedad de rutas de señalización (Amador *et al.,* 2007). Estas cascadas de traducción producen citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, TNF-α), que a su vez activan cascadas de señalización secundarias en células blanco (Johnson *et al.,* 2005). Estas cascadas incluyen la activación de fosfolipasas y la liberación de mediadores lipídicos que pueden activar otro tipo proteínas-kinasas que afectan el normal desarrollo celular (Amador *et al.,* 2007), e inducen cambios importantes en la estructura intestinal (Yoo *et al.,* 2000; Clayburgh *et al.,* 2004).

Los LPS de *E. coli* activan directamente la vía MLCK (myosin regulatory light chain) para causar el acortamiento de los filamentos de actina en el enterocito y la interrupción de la estructura de las uniones apretadas, lo cual está representado por el rompimiento pericelular y acumulación granular de las claudinas, y el incremento en el transporte de bacterias y compuestos tóxicos hacia los tejidos (Berkes *et al.,* 2003). Lo anterior favorece la infiltración leucocitaria, la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias, la sobreexpresión de proteínas de choque térmico, la modificación tisular causada por proteasas, y finalmente, la presentación desordenes funcionales epiteliales relacionados con la absorción, secreción mineral y permeabilidad intestinal (Lallès *et al.,* 2004).

Trabajos reportados por Lamb-Rosteki *et al.,* (2008), utilizando células SCBN (células epiteliales intestinales caninas no tumorogénicas) demostraron que la integridad y la función de la barrera epitelial es interrumpida después de la primera hora de exposición con *Campylobacter jejuni*, debido principalmente a la expresión, activación y fosforilación de los componentes de la vía MLCK. La activación de ésta vía ejerce tensión sobre la membrana celular en la región de la ZO, donde el anillo de actimiosina se inserta, estimulando la contracción del citoesqueleto celular, y por ende, incrementando la permeabilidad paracelular a nivel de enterocito (Berkes *et al.,* 2003; Shifflett *et al.,* 2005).

Por tanto, la modulación de la actividad de la MLCK representa un punto de convergencia de múltiples vías de señalización que regulan la función de las uniones apretadas, provocando cambios en la estructura de éstas, y a su vez, en las proteínas que la componen. Debido a lo anterior, los eventos durante el destete que implican la activación de la vía MLCK, son asociados con una disminución en la resistencia transepitelial, un incremento en el transporte paracelular indiscriminado de moléculas, y la invasión bacteriana en los tejidos (Yu, 2010).

Estudios reportados por Tsukita *et al.,* (2002) y Bruewer *et al.,* (2003) utilizando células epiteliales T84, encontraron que la activación de MLCK altera profundamente la fisiología normal del enterocito, debido a la reducción en la expresión de los genes de las proteínas ZO, C3 y C4 de la uniones apretadas, y al acortamiento de los filamentos de actina en

el enterocito. Lo anterior conlleva al acceso de patógenos gastrointestinales (principalmente bacterias gram-negativas) a la circulación sistémica (Pitman y Blumberg, 2000; García-Herrera *et al.,* 2003).

Además, la disminución en la expresión de las proteínas C3, C4 y ZO podrían provocar la disminución en la polaridad celular, favoreciendo la aparición de diarreas (Mark *et al.,* 2006). No obstante, las investigaciones realizadas por McLaughlin (2004) demostraron que la exposición a algunos metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos (deoxinivalenol) reducen la expresión de C3 en células caco-2, y de C3 y C4 en células IPEC-1, permitiendo la alteración de la estructura de las uniones apretadas, responsables del paso de moléculas vía paracelular.

EXPRESIÓN Y SÍNTESIS MOLECULAR DE ENZIMAS INTESTINALES EN EL PERIODO POSDESTETE

El intestino desempeña un papel activo en los procesos de digestión y absorción de nutrientes, los cuales son realizados eficientemente por lo enterocitos de la parte superior (duodeno) y media (yeyuno) del intestino delgado. Estos procesos digestivos son dependientes del recambio, renovación y maduración de los enterocitos, pues solo así se mantiene la integridad de la mucosa intestinal (Fan, 2002). Según Reis *et al.,* (2005), la función digestiva (secreción de disacaridasas y aminopeptidasas) de los enterocitos comienza solamente cuando se completa la diferenciación

estructural de la mucosa, que generalmente ocurre durante el periodo de migración de las células sobre el primer tercio de las vellosidades.

Como se mencionó anteriormente, después del destete se presentan diferentes tipos de estrés, los cuales provocan la activación de la vía MCLK y a su vez, la reducción en el tamaño de las vellosidades (atrofia) (Vente-Spreeuwemberg *et al.,* 2001). Esta atrofia disminuye la capacidad para digerir y absorber nutrientes, y causa, en muchas ocasiones, diarreas (Parra *et al.,* 2011). Por lo anterior, el proceso del destete se asocia con la reducción en el tamaño de las vellosidades, y a su vez, con la reducción temporal en la expresión y actividad de las disacaridasas y peptidasas (Hedemann *et al.,* 2006), debido a que las células desprendidas de las puntas de las vellosidades durante este proceso son enterocitos maduros, principal reservorio de disacaridasas y peptidasas (Hedemann *et al.,* 2003).

La determinación de los niveles de mRNA de las diferentes enzimas ofrece información en diversos sentidos: síntesis y función. Ambos parámetros son cruciales desde el punto de vista de desarrollo y reflejan necesariamente que existen varios mecanismos entre los procesos de transcripción y traducción que pueden afectar la síntesis y la función de las nuevas proteínas (enzimas), y que a su vez pueden ser dependientes de otros factores tales como especie, edad, nivel de estrés y nutrición (Bontempo *et al.,* 2006). Debido a lo anterior, cualquier anormalidad ocurrida durante estos procesos, podría afectar el desarrollo de glucolización y

clivaje de las nuevas proteínas antes de su inserción en la membrana de borde en cepillo (Bikker *et al.,* 2006).

A través de estudios moleculares se observó que inmediatamente después del destete, los niveles de ARN mensajero (ARNm) en el intestino son bajos, por lo que hay una disminución en la síntesis de las enzimas intestinales en este periodo (Lallés *et al.,* 2004). Bikker*et al.,* (2006), encontraron que el destete precoz parece afectar las peptidasas a nivel postraduccional (maduración y estabilidad de la enzima), mientras que regula la actividad de la maltasa a nivel transcripcional. Sin embargo, de acuerdo con las observaciones publicadas previamente por Egorova *et al.,* (2001), durante la lactancia y el destete la mayor expresión de los mRNAs de las disacaridasas y peptidasas se observó principalmente en el segmento proximal. No obstante, pocos días después del destete, los niveles intestinales de ARNm y la actividad enzimática son restaurados.

Durante este periodo de baja expresión, síntesis, secreción y actividad de las enzimas digestivas, el proceso digestivo está altamente comprometido, y los nutrientes no digeridos presentes en la luz intestinal sirven de sustrato para las bacterias enteropatógenas (*E. coli* principalmente), haciendo que éstas proliferen y causen enfermedades intestinales (colibacilosis) que pueden aumentar la morbilidad y la mortalidad en la etapa posdestete en cerdos (Reis *et al.,* 2010).

EL DESTETE Y LA INTERRUPCIÓN EN LOS PROCESOS DE ABSORCIÓN

Según Schaeffer *et al.,* (2000), además de los problemas mencionados anteriormente, existen otros factores que pueden provocar grandes daños en el tejido intestinal, entre estos factores se encuentran el desarrollo intestinal, el estrés y la respuesta inmunológica. Estos factores provocan alteraciones importantes en la estructura intestinal que conllevan a la interrupción de su capacidad funcional, principalmente de los procesos de digestión y absorción de nutrientes, principalmente de lisina (Blecha, 2000; Moberg, 2000; Amador *et al.,* 2007), limitando a su vez, el crecimiento y la capacidad productiva del cerdo (Lallès *et al.,*2007; Di Giancamillo *et al.,* 2008).

Además, hay que considerar que el posterior consumo de una nueva ración sólida durante la etapa posdestete resulta en la reducción drástica y posterior mortalidad de la población de lactobacilos y estreptococos, mientras que el número de bacterias coliformes (en especial *E. coli*) aumentan durante la primera semana posdestete. Esta población al ir aumentando, favorece la liberación desde su pared celular de productos proinflamatorios como el lipopolisacárido (LPS). El LPS es un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que es reconocido por cualquier hospedero mamífero como una entidad patogénica importante. Este LPS provoca alteraciones importantes en la estructura intestinal, que conllevan a la interrupción de su capacidad funcional, principalmente de los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Amador *et al.,* 2007).

El daño físico a nivel intestinal durante la etapa del destete inicia la activación de una serie coordinada de señales moleculares que involucran varias proteínas quinasas, donde la familia de las proteín kinasas activadas por mitógenos (MAPK) es de gran importancia(Korcheva *et al.,* 2007; Oner *et al.,* 2008). Las MAPK son un grupo de serina/treonina quinasas presentes en todas las células eucariotas y participan en múltiples procesos celulares, y son activadas en respuesta a una gran variedad de estímulos (Waetzig *et al.,* 2002). Las MAPK en combinación con algunas otras vías de transducción de señales, pueden incrementar o disminuir la expresión de ciertos genes que desencadenan una respuesta biológica (Huang *et al.,* 2004). Además, las MAPK desempeñan un papel central en la regulación de una variedad de respuestas inflamatorias, entre las que se encuentran la expresión de mediadores proinflamatorios como citoquinas e interleuquinas (Ono y Han, 2000; Roy *et al.,* 2010; Yuang *et al.,* 2010).

Algunos autores (García-Herrera *et al.,* 2003; García-Herrera *et al.,* 2008; Hansen y Witte, 2008) han reportado que las alteraciones intestinales pueden provocar anormalidades en el transporte intestinal de agua y electrolitos. Sin embargo, el efecto de estas alteraciones sobre la absorción intestinal de nutrientes es menos conocido que su acción sobre los procesos de transporte de agua y electrolitos (Albin *et al.,* 2007). En cuanto a los mecanismos de transporte de aminoácidos a través del epitelio intestinal, recientes trabajos realizados por Abad *et al., (*2001; 2002a); Rebollar *et al.,* (2003); Amador *et al.,* (2007) utilizando la técnica de

PCR, han evidenciado que la absorción intestinal de algunos aminoácidos (leucina) es inhibida por la adición al tejido de diferentes toxinas, específicamente LPS de *E. coli*. Además, el estrés causado por dichos compuestos durante el destete provoca la reducción del flujo sanguíneo y de la absorción de nutrientes a nivel intestinal (Koopmans *et al.,* 2006; Shen *et al.,* 2009) y favorece la presentación de diarreas (Vente-Spreeuwenberg *et al.,* 2003).

La vía de señalización MAPK es una de las más estudiadas, ya que están involucradas en numerosos procesos celulares incluyendo funciones básicas como la proliferación, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular (Kolch, 2000). En la actualidad se dispone comercialmente de diversos inhibidores de MAPK, los cuales son altamente específicos según el tipo de quinasa a inhibir. El inhibidor SB-203580, es altamente selectivo para la p38 MAPK quinasa (Bain *et al.,* 2004, 2007) y el inhibidor U-0126 es selectivo para MAPKK, MEK-1 y MEK-2. Además, es un inhibidor débil de PKC, Raf, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, Abl, Cdk2 e inhibe la transactivación de AP-1 (Hawkins *et al.,* 2008). Sin embargo, Liu *et al.,* (2008) reportaron que la adición de altas concentraciones de inhibidores de MAPK podría causar un antagonismo o desequilibrio en los procesos de absorción intestinal de aminoácidos.

MECANISMOS DE DEFENSA INTESTINALES DURANTE EL DESTETE

Los mecanismos de defensa innata se componen de dos elementos principales: el reclutamiento y la activación de los componentes celulares como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales y células dendríticas; y la liberación de un amplio espectro de mediadores extracelulares, tales como los péptidos antimicrobianos. Estos péptidos, también llamados péptidos de defensa del hospedero, incluyen una amplia gama de proteínas que se pueden clasificar en defensinas y catelicidinas (Elahi, 2006).

Las defensinas están ampliamente distribuidas por todo el reino animal y vegetal, y constituyen un grupo de péptidos antimicrobiales, con actividad de amplio espectro contra diversas bacterias, hongos y virus (Zhang, 1998; 1999). Según Tlaskalová-Hogenová *et al.,*(2004; 2011), utilizando PCR en animales SPF y gnotobióticos, encontraron que múltiples tipos de estas defensinas son producidas por las células Paneth, células especializadas presentes principalmente en las criptas de la mucosa intestinal y en células epiteliales que recubren el aparato respiratorio, digestivo y urogenital**.** Dentro de este grupo de defensinas, la beta defensina porcina-2 (PβD-2) tiene actividad antimicrobiana directa contra gran variedad de patógenos porcinos como *Listeria monocytogenes, Candida albicans, Escherichia coli, Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Elahi, 2006).

PβD-2 es producida no sólo por el revestimiento de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, sino también

por las células fagocíticas y linfocitos (Oppenheim, 2003). PβD-2 posee al menos dos funciones basadas en ensayos *in vitro*: función antibiótica directa y actividad quimiotáctica, lo que contribuye a la inflamación inicial y a la activación del sistema inmune. PβD-2 se produce constitutivamente bajo condiciones fisiológicas normales; sin embargo, su expresión puede ser inducida por productos microbianos exógenos (LPS) y por citoquinas proinflamatorias (específicamente TNF-α) durante el destete (Moser, 2002).

Además, PβD-2 tiene la capacidad de servir como señal para iniciar, movilizar y amplificar la respuesta inmune adaptativa del huésped bajo situaciones de estrés (Oppenheim; 2003). Elahi (2006), reportó un estudio con *Bordetella pertusis* en lechones recién nacidos y encontró que la sobrexpresión molecular de PβD-2 se debe a la respuesta de la inmunidad innata, la cual es fundamental para la protección de las células y la mucosa.

ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN EL PERIODO POSDESTETE

El destete, y en particular si este se realiza bruscamente, provoca un periodo breve de ayuno, la desaparición de la población microbiana predominante en estómago e intestino, (los lactobacilos), y favorece el aumento de la población de microorganismos patógenos (*E. coli*) los cuales liberan productos proinflamatorios (Amador *et al.,* 2007). Después de una infección bacteriana en cerdos, las diferentes toxinas producidas tienen la capacidad de activar una gran variedad

de rutas de señalización, mediadas principalmente por una amplia gama de citoquinas (Pié *et al.,* 2004; Amador *et al.,* 2007).

Las citoquinas son péptidos importantes en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Aunque son principalmente producidas por linfocitos y macrófagos, está claro ahora, que las citoquinas también son producidas por células que tradicionalmente no eran consideradas como parte del sistema inmune; éstas incluyen las células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Colditz, 2002). Las citoquinas son cruciales en el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B (Pié *et al.,* 2004).

Algunas citoquinas y ciertas Interleuquinas, son expresadas constitutivamente por células epiteliales intestinales bajo condiciones fisiológicas normales, pero son abundantemente sobreexpresadas en respuesta a infecciones microbianas, tal y como lo demostraron Stadnyk, (2002) y Gopal *et al.,* (2008) mediante qPCR utilizando líneas celulares epiteliales de ratón. Además, Oswald *et al.,* (2001) han reportado cambios en la expresión de citoquinas inflamatorias a través de qPCR en el intestino de cerdos durante procesos infecciosos e inflamaciones a nivel intestinal. Sin embargo, en algunas especies animales, específicamente en cerdos, la presentación de procesos inflamatorios a nivel intestinal está asociada a los procesos fisiológicos que produce el destete, lo cual favorece el cambio en los niveles intestinales de mRNA de algunas citoquinas proinflamatorias, específicamente de TNF-α.

Trabajos reportados por Manzano *et al.,* (2002); Pié *et al.,* 2004; Garriga *et al.,* (2005); Amador *et al.,* (2007); y García-Herrera *et al.,* (2008), hallaron mediante pruebas de PCR utilizando conejos como modelo animal, que el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, activa varias cascadas de señalización que afectan el normal desarrollo celular, e induce cambios importantes en la estructura intestinal, cuya recuperación total y eficiente puede llevar varias semanas.

EL DESTETE Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL

Generalmente, los cerdos poseen un número relativamente elevado de bacterias tanto en estómago como en la parte distal del intestino delgado en comparación con otras especies (Hedemann y Jensen, 2004). Tradicionalmente, los estudios que analizaban la microbiota intestinal recurrían a la microbiología clásica para hacer recuentos de algunos microorganismos en el interior del tubo digestivo (Pérez *et al.,* 2003). Sin embargo, sólo entre 0.1% y 10% de las bacterias en el ambiente es cultivable (Escalante-Lozada *et al.,* 2004) ya que muchos de los microorganismos estrictamente anaeróbicos son indetectables con las técnicas microbiológicas de cultivo convencionales (Williams *et al.,* 2005; Konstantinov *et al.,* 2003; 2004).

Estas limitantes en las técnicas de cultivo fueron superadas con el desarrollo de herramientas y técnicas moleculares, que permiten detectar e identificar bacterias basándose en

la secuenciación de la diversidad del gen ARNr 16S. Gracias a estas técnicas, los conocimientos sobre el desarrollo y las modificaciones de la composición de la flora microbiana intestinal han tenido avances importantes en los últimos años (Reis *et al.,* 2010). Recientemente, análisis filogenéticos de la subunidad 16S del gen ARN proveniente del TGI de cerdos, revelaron una población microbiana muy compleja, cuyas especies bacterianas no han sido caracterizadas en su mayoría (Leserted *et al.,* 2002).

Al momento del nacimiento el TGI del lechón es estéril; sin embargo, los lechones quedan expuestos a los microorganismos del ambiente que les rodea, y el contacto con la flora microbiana materna y sus heces introduce bacterias que colonizan su tracto digestivo. Durante la lactancia, las bacterias dominantes en el estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos, ambos grupos están bien adaptados a utilizar el sustrato lácteo (Pluske *et al.,* 2004). La flora microbiana normal establecida en el cerdo adulto está constituida por una extensa y variada selección de bacterias mayoritariamente anaerobias estrictas, predominando las especies *Bacteroides, Eubacterium, Bifidobacterium, Fusobacterium, Firmicutes, Peptostreptococcus*, y *Lactobacillus*, y en menor proporción *Escherichia coli* y *Enterobacter* (Eckburg *et al.,* 2005; De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Cuando la microbiota intestinal presenta un balance óptimo, impide la adhesión y la multiplicación de microorganismos patógenos o virulentos y la invasión

de éstos a las células epiteliales y a la circulación, lo que favorece la integridad de la pared intestinal (Tlaskalova-Hogenova *et al.,* 2011). Además, la microbiota establecida en el intestino de cerdos interactúa con los sistemas digestivo e inmunológico del cuerpo y sus actividades pueden afectar el normal desarrollo del animal (Lallés *et al.,* 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, durante el período del destete se desencadena un periodo breve de ayuno, provocando la disminución y baja disponibilidad del sustrato específico (lactosa), y a su vez, la desaparición de la población de lactobacilos y estreptococos predominante en estómago e intestino. Además, el posterior consumo de una nueva ración sólida resulta en una insuficiente producción de ácido gástrico, provocando una digestión ineficiente y una llegada masiva de patógenos al intestino delgado, principalmente *E. coli* debido a que el animal carece de una barrera ácida protectora (Luyer *et al.,* 2004). Por lo anterior, el balance entre las diferentes especies bacterianas juegan un papel importante en el bienestar global del animal (Pluske *et al.,* 2003), específicamente sobre la salud intestinal (Takahasi *et al.,* 2008).

SALUD DEL TRACTO GASTROINTESTINAL ALREDEDOR DEL DESTETE

La salud intestinal puede ser definida como la capacidad del tracto gastrointestinal (TGI) de mantenerse en equilibrio, ya que es un ecosistema en constante cambio (Melin 1997; Reis *et al.,* 2010). El ecosistema del TGI es un complejo que

contiene varios miles de especies de bacterias, las cuales tienen un papel importante en la salud intestinal (Takahashi *et al.,* 2008). Durante una infección bacteriana en cerdos, las diferentes toxinas bacterianas tienen la capacidad de activar una gran variedad de rutas de señalización a través de la producción de diferentes mediadores inmunológicos, como citoquinas (TNF-α, IF-γ, e IL) y algunos mediadores endógenos generados por el hospedero en respuesta a las endotoxinas, tales como metabolitos de oxígeno reactivo, particularmente superóxido, óxido nítrico y sus derivados; y factores derivados de los sistemas de coagulación y del complemento, que afectan el normal desarrollo celular e inducen cambios importantes en la estructura y en la capacidad funcional del intestino (Hataya *et al.,* 2003; Waseem *et al.,* 2008).

La respuesta inmune en el TGI es un constante equilibrio entre la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, TNF-α) y citoquinas antiinflamatorias (IL-1RA, IL-4, IL-10). Algunas citoquinas como TNF-α, IL-8, e IL-18, son expresadas constitutivamente por células epiteliales intestinales bajo condiciones fisiológicas normales; sin embargo, durante el destete o bajo condiciones crónicas de inflamación en respuesta a infecciones microbianas, se induce la liberación de niveles significantes de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-18 y TNF-α por parte de linfocitos T ayudadores tipo 1 (LTh1) (Cavani *et al.,* 2000; Reuter y Pizarro, 2004), y a su vez se suprime la producción de IL-10 por los linfocitos T ayudadores tipo 2 (LTh2) (Stadnyk, 2002; Gopal *et al.,* 2008; Oswald *et al.,* 2001).

A nivel intestinal, IL-10 es una molécula clave para la inducción de células T y para la prevención de la inflamación intestinal (León *et al.,* 2006). Sin embargo, en algunas especies animales, incluidos los cerdos, la presentación de procesos inflamatorios a nivel intestinal está asociada a los procesos fisiológicos desencadenados por el destete (Manzano *et al.,* 2002), lo cual incrementa los niveles intestinales de mRNA de algunas citoquinas proinflamatorias, específicamente TNF-α (Pié *et al.,* 2004; Garriga *et al.,* 2005), aumenta la activación de células presentadoras de antígenos, la maduración de células dendríticas, la intolerancia a antígenos específicos y limita la proliferación de células T (Rotta *et al.,* 2003). Estos factores pueden contribuir a la presentación de altas tasas de desnutrición, diarrea y mortalidad de cerdos en esta etapa (Muller *et al.,* 2008).

Expresión de TNF-α y su relación con la arquitectura intestinal

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el TNF-α es producido principalmente por los monocitos y los macrófagos estimulados, y se ha propuesto como mediador inflamatorio primario (Abad *et al.,* 2002b). Colditz (2002), encontraron mediante PCR, que los niveles intestinales de mRNA de TNF-α aumentaron durante los dos primeros días posdestete, simultáneamente al período en que la altura y actividad enzimática de las vellosidades es drásticamente reducida (Pié *et al.,*2003).

Yoo *et al.,* (2000) y García- Herrera *et al.,*(2008), mediante pruebas de western y northern blot, determinaron

que durante el proceso de inflamación intestinal hay un incremento en la expresión molecular de TNF-α, provocando cambios en las proteínas de unión a actina, específicamente vilina, y en las funciones normales de los enterocitos de murinos y conejos, afectando profundamente los parámetros fisiológicos de las vellosidades (Johnson *et al.,* 2005). Estos parámetros están representados por la disminución en la altura de las vellosidades, el incremento en la profundidad de las criptas, y la reducción en la actividad enzimática y absortiva de nutrientes (Castillo y Alves, 2007). Por lo anterior, la expresión de TNF-α durante el destete favorece la aparición de diarreas y altas tasas de mortalidad de cerdos en esta etapa (Muller *et al.,* 2008).

Amador *et al.,* (2007), utilizando las pruebas anteriormente mencionadas, detectaron luego de la endotoxemia causada por la presencia de diferentes bacterias gram-negativas que los cambios en la expresión de TNF-α afectan la morfología intestinal en conejos, referida como la atrofia de las vellosidades y el aumento en la profundidad de las glándulas. Además, durante los procesos infecciosos la dinámica del citoesqueleto de actina mediada por la vilina, puede ser alterada por la presencia de algunos compuestos en altas concentraciones como sodio o sulfato de dextrano (Hataya *et al.,* 2003).

TNF-α y su efecto sobre las uniones apretadas

Además de su importancia en el desarrollo de procesos inflamatorios, las citoquinas proinflamatorias también participan en la integridad de los tejidos intestinales

(Williams, 2001). Estudios *in vivo* e *in vitro* realizados por Bauer *et al.,* (2006); García-Herrera *et al.,* (2008); Liu *et al.,* (2008), han demostrado que la expresión molecular incontrolada de citoquinas proinflamatorias durante el destete puede tener una gran influencia sobre la estructura y capacidad funcional de las células intestinales, a través de su efecto sobre la estructura de las uniones apretadas entre células epiteliales, principalmente a nivel del yeyuno (Spreeuwenberg *et al.,* 2001; Pié *et al.,* 2004).

La presencia de bacterias patógenas, estimulan la producción de una variedad de citoquinas como TNF-α, IFN-γ y ciertas IL, las cuales pueden influenciar la permeabilidad a macromoléculas y el transporte de iones y nutrientes (Bauer *et al.,* 2006; Davis *et al.,* 2006; Liu *et al.,* 2008). En los trabajos realizados por Zachrisson*et al.,* (2001) y Schaeffer *et al.,* (2006), utilizando qPCR hallaron que TNF-α e IL-8 poseen efecto mitótico sobre la mucosa intestinal. Aunado a esto, algunas toxinas bacterianas, principalmente LPS, causan el acortamiento de los filamentos de actina en el enterocito, interrumpiendo la estructura de las uniones apretadas. Debido a lo anterior, durante el período del destete la barrera intestinal puede ser afectada, induciendo la disminución en la resistencia transepitelial, el incremento en el transporte de moléculas y bacterias (específicamente gram-negativas) a la circulación sistémica (García-Herrera *et al.,* 2003), y la activación del mecanismo de apoptosis (Berkes *et al.,* 2003).

Mediadores inflamatorios (TNF-α) y los procesos de transporte de nutrientes

La inflamación intestinal asociada al destete ocurre en varias especies animales de tipo productivo, principalmente en cerdos. Esta inflamación favorece la liberación de mediadores inflamatorios como TNF-α, el cual altera los procesos de transporte de nutrientes (Manzano *et al.,* 2002). Dentro de estos mediadores TNF-α e IL-1, activan los tres principales miembros de la familia de las MAPK (p38 MAPK, JNK y p42/44 MAPK) (Van den Blink *et al.,* 2001), los cuales controlan y activan la respuesta celular de la inflamación *in vitro*. Lo anterior fue corroborado en el trabajo de Amador *et al.,* (2007) mediante la técnica de western blot.

Debido a lo anterior, la expresión molecular de TNF-α luego del destete conlleva a la disminución de la regulación transcripcional de los transportadores para los diferentes monosacáridos (SGLT1 y GLUT2), y aminoácidos (Amador *et al.,* 2007), disminuyendo los procesos de absorción de nutrientes, específicamente de lisina a nivel de enterocito (Gutiérrez *et al.,* 2012). Algunos trabajos publicados por García-Herrera *et al.,* (2003, 2008); Amador *et al.,* (2007); Hansen y Witte (2008) han concluido que bajo diferentes situaciones de estrés, TNF-α desempeña un papel importante en la fisiología intestinal y puede actuar incrementando la secreción epitelial de iones, específicamente Cloro (Cl^-) en íleon (Musch *et al.,* 2002, Bertelsen *et al.,* 2004) y colon (Resta-Lenert y Barrett, 2006).

El incremento en la secreción de Cl^- a nivel de criptas y la disminución en la absorción de Sodio (Na^+) por las vellosidades intestinales favorecen la pérdida de fluidos en

intestino delgado (DeMeo *et al.,* 2004; Pié *et al.,* 2004). Ambos procesos son dependientes de la bomba Na^+/K^+-ATPasa, localizada en la membrana basolateral y cuya actividad funcional es afectada por TNF-α (DeMeo *et al.,* 2002; Pié *et al.,* 2004). Además, la expresión génica del TNF-α inhibe las células T provocando el aumento en la secreción de cloro (Xu y Verstraete, 2001), y a su vez disminuye la actividad de la Na^+/K^+-ATPasa (Yu y Perdue, 2000), favoreciendo la acumulación de fluidos en intestino delgado. Todos estos factores en asocio, parecen ser los causantes de las diarreas producidas por endotoxinas bacterianas en conejos, y en cerdos durante la etapa del destete (Yu y Perdue, 2000; García-Herrera *et al.,* 2003; 2008).

TNF-α y diferenciación celular intestinal

Los enterocitos juegan un papel importante en la regulación de la permeabilidad y producción de citoquinas, y de otras moléculas que atraen y activan las células inmunes (Abad *et al.,* 2002b). El estrés del destete, caracterizado por la presencia de agentes patógenos a nivel intestinal favorece la activación del sistema inmune y alta expresión de TNF-α, provocando el desequilibrio en la diferenciación celular debido a la inactivación de la vía de señalización Notch (Koch *et al.,* 2003).

Una vez la vía Notch es activada a nivel intestinal, induce la expresión del represor de transcripción Hes1, provocando la disminución de la proliferación de células guante, Paneth y enteroendocrinas (línea secretora). La inhibición de la señalización Notch provoca la disminución

de células absortivas y la conversión de todas las células madre hacia células de línea secretora (van ES *et al.,* 2005). El desarrollo de células secretoras en intestino es mutuamente excluyente, debido a que la represión de Hes1 activa directamente el factor de transcripción Math1, el cual es fundamental en la diferenciación de células secretoras (Yang *et al.,* 2001). A nivel intestinal, la vía de señalización Notch es de suma importancia, ya que es la encargada de mantener el equilibrio y la homeostasis entre el número células absortivas y secretoras generadas a partir de células madres(Fre *et al.,* 2005; Suzuki *et al.,* 2005).

Tanabe *et al.,* (2005) mediante PCR en células epiteliales intestinales de ratones, encontraron que en presencia de agentes patógenos, en especial LPS, se puede presentar un desequilibrio en la diferenciación celular, debido a que a la sobreexpresión de TNF-α inactiva la vía Notch, provocando la disminución en la diferenciación de las células madre en enterocitos. Lo anterior conlleva al mal funcionamiento del intestino dentro de las primeras 24 horas, caracterizado por la reducción en la actividad enzimática y absortiva de nutrientes y el aumento en la desnutrición y en la presentación de episodios diarreicos. Estos factores pueden contribuir a la presentación de altas tasas de mortalidad de cerdos durante la etapa del destete (Muller *et al.,* 2008). Aunado a lo anterior, la expresión deTNF-α durante los procesos de infección e inflamación intestinal en esta etapa, incrementa la síntesis y producción de muchas defensinas por las células epiteliales. Lo anterior se debe a que TNF-α participa en la integridad y defensa de los tejidos intestinales, a través del

aumento en la población de células de línea secretora, entre ellas, las células Paneth, la cuales producen principalmente PβD-2 (van ES *et al.,* 2005).

CONSIDERACIONES GENERALES

La información presentada en este capítulo sugiere que el destete está asociado a múltiples factores que generan la presentación de estrés en cerdos, los cuales favorecen la respuesta inflamatoria temprana. Esto provoca la involución de los parámetros productivos, y contribuye a desordenes anatómicos y funcionales a nivel intestinal representados por la disminución en los parámetros morfológicos, en la absorción de nutrientes (lisina principalmente), en la actividad enzimática, y en la expresión molecular de enzimas. Debido a lo anterior, estos factores podrían estar asociados con la alta incidencia de diarreas durante la etapa posdestete, representada por una lenta adaptación del lechón al destete precoz y al nuevo ambiente nutricional.

El cambio en la población bacteriana y la liberación de sus toxinas durante el período posdestete, favorece la respuesta inflamatoria temprana a nivel intestinal, y está mediada principalmente por citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas, pricipalmente TNF-α, tienen un efecto sobre los parámetros morfológicos de los órganos evaluados, y sobre cada uno de los segmentos intestinales, disminuyendo la altura y el área de las vellosidades, e incrementando el ancho de las vellosidades, y la profundidad y ancho de las criptas intestinales. Además, la reacción inmediata frente

a agentes patógenos disminuye la expresión molecular de las enzimas de las vellosidades intestinales y su actividad. Dado que la excesiva respuesta inflamatoria puede provocar grandes daños en los tejidos, la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias puede llevar a una lenta adaptación del lechón al proceso de destete precoz. Este efecto probablemente contribuye a la disminución en el peso y funcionamiento adecuado del intestino, la absorción intestinal de nutrientes, y a la presentación del síndrome de diarrea postdestete, debido al transporte paracelular indiscriminado de moléculas, microorganismos y toxinas.

Debido a lo anterior, es necesario realizar futuras investigaciones sobre la fisiología digestiva, asociadas a la patología, microbiología y inmunología para mejorar la comprensión de los mecanismos causantes de problemas digestivos en el periodo crítico posdestete. Además, el conocimiento de cómo las diferentes toxinas bacterianas provocan diarreas y disminuyen la absorción de nutrientes a nivel intestinal podría tener importantes implicaciones tanto para la nutrición animal como para la medicina humana.

BIBLIOGRAFIA

Abad. B., Mesonero, J.E., Salvador, M.T., García-Herrera, J., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2001. Effect of lipopolysaccharide on small intestinal L-leucine transport in rabbit. Digestive Diseaseand Sciences 46: 1113-1119.

Abad, B., Mesoreno, J.E., Salvador, M.T., García-Herrera, J., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2002(a). Cellular mechanism underlying LPS-induced inhibition of in vitro L-leucine transport across rabbit jejunum. Journal of Endotoxin Research 8: 127-133.

Abad, B., Mesoreno, J.E., Salvador, M.T., García-Herrera, J., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2002(b). Tumor necrosis factor-a mediates inhibitory effect of lipopolysaccharide on L-leucine intestinal uptake. Digestive Disease and Sciences47: 1316-1322.

Aguilera, B.A., Souza, R.T.C., Mariscal, L.G., Juárez, G.Y. 2003. Desarrollo de los órganos digestivos hasta la cuarta semana posdestete en lechones alimentados con subproductos lácteos. Memorias del XI Congreso de la AMENA y I del CLANA. Cancún, México.

Albin, D.M., Wubben, J.E., Rowlett, J.M., Tappenden, K.A., Nowak, R.A. 2007.Changes in small intestinal nutrient transport and barrier function after lipopolysaccharide exposure in two pig breeds. Journal of Animal Science 85:2517-2523.

Amador, P., García-Herrera,J., Marca, M.C., de la Osada, J., Acín, S., Navarro, M.A., Salvador, M.T., Lostao, M.P., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2007. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. Journal of Membrane Biology 215: 125-133.

Athman, R., Fernandez, M.I., Gounon, P., Sansonetti, P., Louvard, D., Philpott, D., Robine, S. 2005. Shigellaflexneri infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. Cellular Microbiology 7(8):1109-16.

Asaduzzaman, M., Zhang, S., Lavasani, S., Wang, Y., Thorlacius, H. 2008. Lfa-1 and Mac-1 Mediate Pulmonary Recruitment of Neutrophils and Tissue Damage in Abdominal Sepsis. Shock 30: 254-259.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliot,t M., Cohen, P. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. Biochemical Journal 371(Pt 1):199-204.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., Cohen, P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochemical Journal 408(3):297-315.

Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Verstegen, W.A.M., Mosenthin, R. 2006. Influence of the Gastrointestinal Microbiota on Development of the Immune System in Young Animals.Currentes Issues in Intestinal Microbiology 7: 35–52.

Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., Hecht, G. 2003.Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Gut 52: 439–451.

Bertelsen, L.S., Eckmann, L., Barrett, K.E.2004. Prolonged interferon-γ exposure decreases ion transport, NKCC1, and Na+-K+-ATPase expression in human intestinal xenografts in vivo. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 286: G157-G165.

Bikker, P., Dirkzwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J.P., Awati, A. 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. Jounal of Animal Science 84(12):3337-45.

Blecha F. Immune system response to stress. In: Moberg GP, Mench JA editors. The biology of animal stress.Basic principles and implications for animal welfare.1st ed. CAB International. London, UK; 2000:111-121

Bontempo, V.,DiGiancamillo, A., Savoini, G,Dell'Orto, V., Domeneghini, C. 2006.Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. Animal Feed Science and Technology 129: 224–236.

Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I.,Lallès, J.P., Sève, B. 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications

of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. Journal of Nutrition 134(9):2256-62.

Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C.A, Madara, J.L., Hopkins, A.M., Nusrat, A. 2003.Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. Journal of Immunology 171: 6164–6172.

Castillo, S.W., Alves, T.N.M. 2007.Feed piglets early weaned and effects on subsequent performance to finished. ArchivosLatinoamericanos enProducciónAnimal 15: 145-154.

Colditz, I.G. 2002.Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. Livestock Production Science 75:257–268.

Dauphinee, M.S., Karsan, A. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial.Cells Laboratory Investigation86: 9–2.

Davis, M.E., Sears, S.C., Apple, J.K., Maxwell, C.V., Johnson, Z.B. 2006. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being. Journal of Animal Science 84: 743–756.

DeVrese M.,Schrezenmeir, J. 2008.Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 111: 1-66.

DeMeo, M.T., Mutlu, E.A., Keshavarzian, A., Tobin, M.C. 2002. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. Journal of Clinical Gastroenterology 34(4):385-96.

Di Giancamillo, A., Vitari, F., Savoini, G., Bontempo, V., Bersani, C., Dell'Orto, V., Domeneghini, C. 2008.Effects of orally administered probiotic Pediococcusacidilactici on the small and large intestine of weaning piglets.A qualitative and quantitative micro-anatomical study. Histology and Histopathology 23(6):651-64.

Eckburg, P.B.,Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science 308: 1635-1638.

Egorova, V.V., Egorova, G.G., Lasarenko LV, et *al.,*2001.Topography of digestive enzymes in the pig small intestine at the early stages of ontogeny in the norm and pathology. In: Lindberg JE, Ogle B, eds. Digestive Physiology of Pigs Uppsala:CABI Publishing, 49-51.

Erridgea, C., Bennett-Guerrerob, E., Poxton, R.I. 2002.Structure and function of lipopolysaccharides.Microbes and Infection4:837–851.

Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda G, Martinez-Jiménez,A.,Bolívar-Zapata,F. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: método de estudio no dependiente del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Agrociencias 38:583-592.

Fan, M.Z. 2002.Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: Xu. RJ, Cranwell P editors.The neonatal pig.Gastrointestinal physiology.and nutrition. NottinghamUniversity Press. 31-60.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., Artavanis-Tsakonas, S. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. Nature 435:964–968.

García-Herrera, J., Abad, B., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2003. Effect of lipopolysaccharide on D-fructose transport across rabbit jejunum. Inflammation Research 52: 177–184.

García-Herrera, J., Marca, M.C., Brot-Laroche, E., Guillen, N., Acin, S., Navarro, M.A.,de la Osada, J., Rodriguez-Yoldi, M.J. 2008. Protein kinases, TNF-α and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis in vivo. American Journal ofPhysiologyGastrointestinal and. Liver Physiology 294:G155–G164.

Garriga, C., Pérez-Bosque, A., Concepción, A., Campbell, J.M., Russell, L., Polo, J. 2005. Spray-Dried Porcine Plasma Reduces the Effects of Staphylococcal Enterotoxin B on Glucose Transport in Rat Intestine. Journal of Nutrition 135: 1653-1658.

Gómez A. El destete y la fisiología del lechón. 2006. En: I seminario internacional sobre sistemas sostenibles de producción en especies menores. Popayán, 34p.

Gopal, R., Birdsell, D., Monroy, F.P. 2008. Regulation of toll-like receptors in intestinal epithelial cells by stress and Toxoplasma gondii infection. Parasite Immunology 11-12: 563-576.

Gutiérrez, VC, Román, O.Y., Peláez, J.C., Ciro, G.J., López, H.A., Parra, S.J.E. 2012.Efecto de la adición ex vivo del lipopolisacárido de E. coli sobre la absorción de lisina. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 65(1): 6447-6457.

Hansen, H.M., Witte, A.B. 2008. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion.ActaPhysiologica 193: 311–323.

Hataya, Y., Akamizu, T., Hosoda, H., Kanamoto, N., Moriyama, K., Kangawa, K., Takaya, K., Nakao, K.2003. Alterations of Plasma Ghrelin Levels in Rats with Lipopolysaccharide-Induced Wasting Syndrome and Effects of Ghrelin Treatment on the Syndrome. Endocrinology 144:5365-5371.

Hedemann, M.S., Hojsgaard, S., Jensen, B.B. 2003. Small intestine morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 87: 32-41.

Hedemann, M.S., Jensen, B.B. 2004.Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. Archives of Animal Nutrition58: 47-59

Hedemann, M.S, Eskildsen, M., Lærke, H.N., Pedersen, C., Lindberg, J.E., Laurinen, P., Knudsen, K.E. 2006.Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. Journal of Animal Science 84: 1375-1386.

Huang, C., Jacobson, K., Schaller, D.M. 2004.MAP kinases and cell migration. Journal of Cell Science 117: 4619-4628.

Johnson, G.B., Brunn, G.J., Samstein, B. 2005. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome.Surgery137: 393–395.

Kolch, W., Calderc, M., Gilbert, D. 2005.When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. FEBS Letters 579: 1891-1895.

Konstantinov, S.R., Zhu, W.Y., Williams, B.A, Tamminga, S., Vos, W.M., Akkermans, A.D. 2003. Effect of fermentable carbohydrates

on piglets faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16s ribosomal DNA. FEMS Microbiology Ecology 43:225-235.

Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W,Y,, Williams, B,A,, Klüb, J,, Soufrant, W.B., de Vos, W.M., Anton D.L., Smidt, H. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. Animal Research 53:317-324.

Koopmans, S.J., Guzik, A.C., van der Meulen, J., Dekker, R., Kogut, J., Kerr, B.J. 2006. Behavior in weanling piglets Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity. Journal of Animal Science 84: 963-971.

Korcheva, V., Wong, J., Lindauer, M., Jacoby., D.B., Iordanov, M.S., Magun, B. 2007. Role of apoptotic signaling pathways in regulation of inflammatory responses to ricin in primary murine macrophages. Molecular Immunology 44: 2761-71.

Lallès, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R. 2007. Weaning,a challenge to gut physiologists. Livestock Science 108:82-93.

Lallès, J.P., Boudry, G., Favier, C., LeFloc'h N, Luron, I., Montagne L., Oswald I.P., Pié, S., Piel, C., Sève, B. 2004.Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. Animal Research 2004; 53:301-316.

Lamb-Rosteki, J., Kalischuk, L., Inglis, G., Buret, A. 2008.Epidermal Growth Factor Inhibits Campylobacter jejuni-Induced Claudin-4 Disruption, Loss of Epithelial Barrier Funtion, and Escherichia coli translocation. Infection and Immunity 76(8): 3390-3398.

León, A.J., Garrote, J.A., Arranza, E. 2006. Citocinas en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Medicina Clínica 127: 145-152.

Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen T.K., Lindercrona, R.H., Boye, M., Moller, K. 2002. Cuture-Independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. Applied Environment Microbiology 68:673-690.

Liu, Y., Huang, J., Hou, Y., Zhu, H., Zhao, S., Ding, B.,eYin, Y., Yi G., Shi, J., Fan, W. 2008. Dietary arginine supplementation

alleviates intestinal mucosal disruption induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in weaned pigs. British Journal of Nutrition 100: 552–560

Luyer, M.D.P., Buurman, W.A., Hadfoune, M., Jacobs, J.A., Konstantinov, S.R., Dejong, C.H.C., Greve, J.W.2004. Pretreatment with high-fat enteral nutrition reduces endotoxin and tumor necrosis factor-α and preserves gut barrier function early after hemorrhagic shock. Shock 21: 65-71.

Manzano, M., Abadia-Molina, A.C.,Garcia-Olivares, E., Gil, A., Rueda, R. 2002. Absolute counts and distribution of lymphocyte subsets in small intestine of BALB/c mice change during weaning. Journal of Nutrition 132: 2757–2762.

Musch,M.W., Walsh-Reitz, M.M, Chang, E.B. 2006.Roles of ZO-1, occluding, and actin in oxidant-induced barrier disruption.American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology 290: G222-G231.

McLaughlin, J., Padfield, P., Burt, J., O´Neil, C.2004. Ochratoxin A increases permeability through tight juntions by removal of specific claudin isoforms. American Journal of Physiology.Cell Physiology 287: C1412-C1417.

Melin, L., Jensen-Waern, M., Johannisson, A., Ederoth, M., Katouli, M., Wallgren, P. 1997. Developement of selected faecalmicrofloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs. Veterinary Microbiology 54:287-300.

Moberg, G.P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA editors. The biology of animal stress.Basic principles and implications for anim al welfare.1st ed. CAB International. London, UK:1-21.

Moser C, Weiner D, Lysenko E, Bals R, Weiser J, Wilson J. ß-Defesin 1 Contributes to Pulmonary Innate Immunity in Mice. Infection and Immunity, p. 3068-3072. 2002.

Müller, A., Oertli, M., Arnold, I.C. 2001.H. pylori exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. Cell Communicationand Signaling 9(1):25.

Muller, T., Hess, M.W., Schiefermeier, N., Pfaller, K., Ebner, H.L., Heinz-Erian, P., Ponstingl H., Partsch, J., Rollinghoff, B., Kohler, H., Berger, T., Lenhartz, H., Schlenck, B., Houwen, R.J., Taylor, C.J., Zoller, H., Lechner, S., Goulet, O., Utermann, G., Ruemmele, F.M., Huber, L.A., Janecke, A.R. 2008.MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. Nature Genetics 40:1163–1165.

Musch, M.W., Clarke, L.L., Mamah, D., Gawenis, L.R., Zhang, Z., Ellsworth, W., Shalowitz, D., Mittal, N., Efthimiou, P., Alnadjim, Z., Hurst, S.D., Chang, E.B., Barrett, T.A. 2002. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na+ /K+ -ATPase. Journal of Clinical Investigation 110: 1739-1747.

Oner, C., Schatz, F., Kizilay, G., Murk, W., Buchwalder, L.F., Kayisli, U.A., Arici, A., Lockwood, C.J. 2008.Progestin-inflammatory cytokine interactions affect matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in term decidual cells: implications for treatment of chorioamnionitis-induced preterm delivery. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 93:252-259.

Ono, K., Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway activation and function. Cellular andSignalling 12: 1-13.

Oppenheim, J.J., Biragyn, A., Kwak, L.W., Yang, D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Annals of the rheumatic diseases62(Suppl II): ii 17-ii21

Oswald, I.P., Dozois, C.M., Barlagne, R., Fournout, S., Johansen, M.V.,Bogh, H.O.2001. Cytokine mRNA expression in pigs infected with Schistosomajaponicum. Parasitology 122:299–307.

Parra, S.J.E., Agudelo, J., Ortiz, L., Ramírez, M., Rodríguez, B., López, H.A. 2011. Escherichia coli LPSlipopolysaccharide has detrimental effects on the intestinalmorphology of weaned pigs. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 24(4): 598-608.

Pérez de Rozas, A.M., Roca, M., Carabaño, R., De Blas, C., Francesch J.B., Martin-Orue, S. 2003. El estudio de la Diversidad Intestinal por RFLP. Memorias del XIX Curso de Especialización FEDNA;

2003 Octubre 23 - 24; Madrid, España. Madrid, España: Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, 31-45.

Pié, S., Lallès, J.P., Oswald, I. 2003. Influence of weaning on intestinal pro-inflammatory cytokine patterns in piglets, in: Ball R.O. (Ed.), Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, AB, Canada, pp. 99–101.

Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I.P. 2004. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. Journal of Nutrition 134: 641–647.

Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I.P. 2004. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. Journal of Nutrition 134: 641–647.

Pitman, R.S., Blumberg, R.S. 2000. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. Journal ofGastroenterology35: 805–814.

Pluske, J.R., Hopwood, D.E., Hampson, D.J. 2003.Relación entre la microbiótica intestinal, el pienso y la incidencia de diarreas, y su influencia sobre la salud del lechón tras el destete. Memorias del XIX Curso de Especialización FEDNA; 2003 octubre 23-24; Madrid, España. Madrid, España: Fundación para el desarrollo de la nutrición animal, 93-108.

Pluske, J.R., Pethick, W.D., Hopwood,E.D., Hampson, J.D. 2004. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. NutritionResearchReviews 15:333–371.

Rebollar, E., Guerrero-Lindner, E., Arruebo, M.P., Plaza, M.A., Murillo, M.D. 2003. Role of prostaglandins in lipopolysaccharide effects on K+-induced contractions in rabbit small intestine. Acta PhysiologicaScandinavica179 : 299–307.

Reis, S.T.C, Guerrero, C.M.J., Aguilera, B.A., Mariscal, L.G. 2005. Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados. Técnica Pecuaria México 43(3): 309-321.

Reis, S.T.C., Mariscal, L.G., Aguilera, B.A., Cervantes, J.G.H. 2007. Digestibilidad de la proteína y energía en dietas para lechones complementadas con tres diferentes tipos de suero de leche deshidratado. Veterinaria México 38: 141-151.

Reis, S.T.C., Mariscal, L.G., Escobar, G.K.2010. Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. Veterinaria México 41: 275-288.

Resta-Lenert S., Barrett, K.E. 2006. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 130(3):731-46.

Revenu, C., Courtois, M., Michelot, A., Sykes, C., Louvard, D., Robine, S. 2007.Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo. Molecular Biology of the Cell 18(3):827-38.

Rodrigues, M.M.A., Silva, O.D.A., Taketomi, A.E., Hernandez-Blazquez, F.J. 2007. Pesquisa Veterinária Brasileira27: 241-245.

Rotta, G., Edwards, E.W., Sangaletti, S., Bennett, C., Ronzoni, S., Colombo, M.P., Steinman, R.M., Randolph, G.J., Rescigno, M. 2003. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. Journal of ExperimentalMedecine 198(8):1253-63.

Roy, S.K., Srivastava, R.K., Shankar, S. 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. Journal of MolecularSignaling19: 5-10.

Schaeffer, C., Diab-Assef, M., Plateroti, M., Laurent-Huck, F., Reimund, J.M., Kedinger, M., Foltzer-Jourdainne C. 2000.Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development: regulation by glucocorticoids. Gut47: 192–198.

Schaeffer, C., Habold, C., Martin, E., Lignot, J.H., Kedinger, M.,Foltzer-Jourdainne, C. 2006.Cytokine Expression in Rat Colon During Postnatal Development: Regulation by Glucocorticoids.Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 43(4): 439-450.

Shen, L., Turner, J.R. 2005. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. Molecular Biology of the Cell 16:3919–3936.

Shen, Y.B., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., Zhen, Y.G. 2009.Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. Journal of Animal Science 87(8):2614-2624.

Shifflett, D.E., Clayburgh, D.R., Koutsouris, A., Turner, J.R., Hecht, G.A. 2005. Enteropathogenic*E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. Laboratory Investigation 85(10):1308-24.

Spreeuwenberg, M.A.A., Verdonk, J.M.A.J., Gaskins, H.R., Verstegen, M.W.A. 2001.Small intestinal epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. Journal of Nutrition 131: 1520–1527.

Stadnyk, A,W. 2002. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. Canadian Journal of Gastroenterology 16: 241–246.

Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., Chiba, T. 2005.Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. Biochemichal and Biophysical ResearchCommunications328:348–352.

Takashi, S., Yoshida, Y., Nakanishi, N., Tsukahara, T., Ushida, K. 2008.Quantitative real-time PCR monitoring of Escherichia coli and Clostridium perfringes with oral administration of Lactobacillus plantarumstrinLq 80 to weaning piglets. Journal of AnimalScice 79:737-744.

Tanabe, H., Ayabe, T., Bainbridge, B., Guina, T., Ernst, R.K., Darveau, R.P., Miller, S.I., Ouellette, A.J. 2005.Mouse paneth cell secretory responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria. Infection and Immunity 73:2312–2320.

Tlaskalová-Hogenová, H. 2004.Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases.Immunology Letters 93: 97–108.

Tlaskalová-Hogenová, H., Stěpánková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tučková, L., Rossmann, P., Hrnčíř, T., Kverka, M., Zákostelská, Z., Klimešová, K., Přibylová, J., Bártová, J., Sanchez, D., Fundová, P., Borovská, D., Srůtková, D., Zídek, Z., Schwarzer, M., Drastich, P., Funda, D.P. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. Cellular & Molecular Immunology 8: 110–120

Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. CurrOpin Cell Biol. 2002 ;14(5):531-6

Van den Blink, B., Branger, J., Weijer, S., Van Deventer, S.J.H, Van der Poll, T., Peppelenbosch, M.P. 2011. Human endotoxemia activates p38 MAP kinase and p42/44 MAP kinase, but not c-Jun N-terminal kinase. MolecularMedicine11: 755-760.

van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M.M., Clevers, H. 2005.Wntsignalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. Nature Cell Biology 7: 381–386.

Vente-Spreeuwenberg MAM, Verdonk AC, Gaskins HR, Verstegen MWA. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. J Nutr 2001, 131: 1520-1527.

Vente-Spreeuwenberg, M.A.M., Verdonk, J.M.A.J., Verstegen, M.W.A., Beynen, A.C. 2003.Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. British Journal of Nutrition 90: 907–913.

Waetzig, G.H., Segert, D., Rosentiel, P., Nikolaus, S., Schreiber, S. 2002. p38 mitogen activated protein kinase is activated a linked to TNF-a signaling in inflammatory bowel disease. Journal of Immunology 168: 5342-5351.

Waseem, T., Duxbury, M., Ito, H., Robinson, M.2008. Exogenous ghrelin modulates release of pro- and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. Surgery. 143: 334–342.

Williams, D.A. 2001. Inflammatory cytokines and mucosal injury. Journal of National Cancer Institute.Monographs.29: 26–30.

Williams, B.A., Bosch, M.W., Awati, A., Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D.L., Verstegen M.W.A., Tamminga, S. 2005. In vitro assement of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: fermentable substrates and microbial activity. Animal Research 54:191-201.

Xu, J.,Verstraete, W. 2001. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 504–507.

Xu, R.J., Sangild, P.T., Zhangc, Y.Q., Zhangd, S.H. 2002.Bioactive compounds in porcine colostrum and milk and their effects on intestinal development in neonatal pigs. Biology of Growing Animals 1:169-192.

Yang, E.V Glaser, R. 2000.Stress-induced immunomodulation: Impact on immune defenses against infectious disease. Biomedicine & pharmacotherapy54: 245–250.

Yen, J.T. 2002.Anatomy of the Digestive System and Nutritional Physiology. In: Lewis A.J. and L.L. Southern (Ed.). Swine Nutrition 2nd ed. Washington, DC. USA. CRC Press; p 31.

Yoo, D., Lo, W., Goodman, S., Ali, W., Semrad, C,. Field, M. 2000. Interferon-gamma downregulates ion transport in murine small intestine cultured in vitro. American Journal of Physiology 279: G1323–G1332.

Yu, D., Marchiando, A.M., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Wang, Y., Shen, L., Turner, J.R. 2010.MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(18):8237-8241.

Yu, L.C., Perdue, M.H. 2000. Immunologically mediated transport of ions and macromolecules.Annals of the New York Academy of Sciences 915: 247–259.

Yuang, J., Xu, B.Z., Qi, S.T., Tong, J.S., Wei, L., Li, M., Ouyang, Y.C., Hou, Y., Schatten, H., Sun, Q.Y. 2010. MAPK-activated protein kinase 2 is required for mouse meiotic spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment. PLoS One 2010, 28: 11247.

Zachrisson, K., Neopikhanov, V., Wretlind, B., Uribe, A. 2001. Mitogenic action of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 on explants of human duodenal mucosa.Cytokine15: 148–155.

Zhan Z, Ou D, Piao X, Kim SW, Liu Y, Wang J.2008. Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned. Pigs Journal of Nutrition 138: 1304-1309.

Zhang, G., Wu, H., Shi, J., Ganz, T., Ross, C., Blecha, F. 1998. Molecular cloning and tissue expression of porcine ß-defensin-1. FEBS Letter 424(1-2): 37-40.

Zhang, G., Hiraiwa, H., Yasue, H., Wu, H., Ross, C.R., Troyer, D., Blecha, F. 1999. Cloning and characterization of the gene for a new epithelial beta-defensin.Genomic structure, chromosomal localization, and evidence.Journal of Biological and Chemistry 274 (34): 24031-7.

CAPÍTULO 2

Uso de marcadores moleculares para la detección de algunas enfermedades en animales domésticos

Biol. Ximena Cardona L.[1]

[1] Biol, MSc (C). Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Dpto. Asistencia técnica. Cooperativa COLANTA Ltda.

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realiza mediante la detección directa e indirecta de los agentes infecciosos. Mediante los métodos directos se detectan las partículas de los agentes infecciosos y/o sus componentes, tales como los ácidos nucleicos, las proteínas estructurales y no estructurales, las enzimas, etc. Los métodos indirectos ponen de manifiesto los anticuerpos inducidos por las infecciones.

Los métodos más comunes de detección directa son: el aislamiento o el cultivo *in vitro*, la microscopía electrónica, la inmunofluorescencia, la inmunohistoquímica, el enzimo-inmunoensayo (ELISA para antígenos), la hibridación de ácidos nucleicos (NAH) y las diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o los métodos de amplificación isotérmica, como por ejemplo la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NSABA), la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP). Los métodos indirectos más comunes de detección del agente infeccioso son las pruebas serológicas tales como: la neutralización vírica, la detección de anticuerpos mediante el ELISA y las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, a las que se han incorporado otras más novedosas, tales como el método de los biosensores, la bioluminometría, el método de la fluorescencia polarizada, los ensayos de quimioluminiscencia, etc.

La primera aplicación de las técnicas de detección de acidos nucleicos (ADN y ARN) en las enfermedades infecciosas fue la detección de *Escherichia coli* en cultivos de heces, por Monley en 1980. Más tarde aumentó en forma considerable la disponibilidad de sondas de ADN capaces de identificar agentes bacterianos, virales, micóticos y parasitarios. En la actualidad es posible detectar cualquier patógeno, a pesar de la información limitada de su secuencia; además se puede obtener información de su virulencia y sensibilidad a fármacos.

Las experiencias de las dos últimas décadas indican que las técnicas de la PCR finalmente sustituirán a muchos de los métodos directos clásicos de detección de agentes infecciosos. Está claro que la PCR está reemplazando el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar. Hay varias razones para esta tendencia, teniendo en cuenta que para el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias se requiere: i) la presencia y la viabilidad de los microorganismos que se replican (virus o bacterias); ii) cultivos celulares costosos y mantenimiento de las instalaciones; iii) varias semanas para completar el diagnóstico en algunas ocasiones. Aunque los ensayos de la PCR inicialmente eran costosos y engorrosos, hoy en día son herramientas relativamente baratas, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico. Generalmente, la sensibilidad y la especificidad de la PCR son mayores que los procedimientos ELISA de captura del antígeno. La introducción de varios sistemas de PCR y de extracción de ácidos nucleicos ha dado como resultado metodologías fiables,

rápidas y sólidas para el diagnóstico molecular. La sensibilidad de la PCR es muy alta, porque se producen varios millones de copias de una región puntual de un genoma seleccionado. La especificidad de la reacción puede ser también muy alta, ya que está determinada por las secuencias específicas de nucleótidos de la diana seleccionada, así como por el diseño del cebador. Los cebadores pueden diseñarse para detectar secuencias específicas en los genomas de los agentes infecciosos o pueden diseñarse para ser complementarios de regiones más conservadas, permitiendo de este modo la detección de miembros dentro de una familia o género del agente infeccioso.

Algunas enfermedades producidas por virus que pueden ser detectadas por PCR

Estomatitis vesicular. La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad de los equinos, del ganado bovino y porcino. Las vesículas son causadas por el virus de la EV en la lengua, labios, mucosa bucal y pezones, y en el epitelio de la banda coronaria del ganado vacuno, caballos, cerdos, y de muchas otras especies de animales domésticos y salvajes. El virus pertenece a la familia *Rhabdoviridae* y posee un genoma de ARN monocatenario (Federer *et al.*, 1967). Se puede utilizar la PCR de trascripción inversa para amplificar pequeñas áreas genómicas del virus de la EV (Hofner *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1993).

Peste porcina clásica. El virus que causa la peste porcina clásica (PPC) es miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. El VPPC afecta cerdos de cualquier

edad, comprometiendo al sistema inmune y los síntomas más destacados de la enfermedad son pirexia, inapetencia, torpeza, debilidad, conjuntivitis, estreñimiento seguido de diarrea y ataxia. Varios días después de la aparición de los síntomas clínicos, las orejas, el abdomen y la parte interna de los muslos pueden mostrar una decoloración morada. Los animales con la enfermedad en forma aguda mueren en 1–3 semanas. La inmunosupresión puede acarrear infecciones concurrentes (Terpstra y Wensvoort, 1988). Se han descrito muchos métodos de PCR de trascripción inversa y otros se están aún desarrollando (Mcgoldrick *et al.,* 1998). El método de amplificación del ARN del virus de la PPC es aceptado internacionalmente, es rápido y más sensible que los ELISA de captura de antígeno. Se han descrito varios protocolos de PCR convencionales y en tiempo real (Hoffmann *et al.,* 2005; Paton *et al*., 2000; Risatti *et al*., 2003). Debido a su rapidez y sensibilidad, la PCR posee un enfoque adecuado para analizar casos sospechosos de enfermedad y está aceptada por varios países y por la Unión Europea (Anon, 2000). La prueba puede aplicarse a muestras de sangre individual o colectiva así como a órganos sólidos, y se ha utilizado con éxito para controlar brotes. Se pueden analizar varias regiones diferentes del genoma del VPPC para estudios epidemiológicos moleculares (Paton *et al*., 2000). Se han estudiado en particular dos regiones que permiten suministrar muchos datos de la secuencia para comparar nuevos aislamientos. Una de estas zonas se encuentra en la región 5' no codificante (5'NCR) del genoma (150 nucleótidos) y la otra en el gen de la glicoproteína mayor E2 (190 nucleótidos).

Diarrea viral bovina. El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es un pestivirus de la familia de *Flaviviridae* y posee un genoma de ARN (Donis, 1995). El método PCR trascripción inversa se puede adaptar a la detección de ARN vírico de DVB para fines de diagnóstico (Brock, 1995; Kim, Duboni, 2003; Letellier, Kerkhofs, 2003). Se puede utilizar la PCR múltiple para amplificar y tipificar los dos genotipos existentes del virus de BVDV, tipo 1 y 2, a partir de cultivo celular o de muestras de sangre, originando productos de PCR de diferente tamaño (Gilbert *et al*., 1999). Se deben seleccionar cebadores para regiones conservadas del genoma, como la región 5' -no codificante, o la NS3 (gen que codifica para la p80) (Hamel *et al*., 1995).

Leucosis bovina enzoótica. La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino adulto causada por el retrovirus de la leucemia bovina (BLV), causando linfosarcomas (Gillet *et al*., 2007). Varios autores han descrito la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el ARN monocatenerio del BLV (Beier *et al.,* 1998; Rola, Kuzmak, 2002). Es posible detectar el virus con la amplificación de las regiones gag, pol y env del genoma. Hasta ahora, el método más sensible y rápido es la PCR doble (anidada) seguida por la electroforesis, del gen env que codifica para la gp51.

Fiebre aftosa. La fiebre aftosa o glosopeda (FA) está causada por un virus del género Aftovirus, de la familia *Picornaviridae*. Se trata de un virus ARN monocatenario cuyo genoma se encuentra incluido en una cápside proteica.

Existen siete serotipos de virus FA, que son el O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1, que infectan a los animales de pezuña hendida. La infección con un serotipo determinado no confiere inmunidad contra otros. De las especies domesticas, el ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y los búfalos resultan susceptibles a la FA (FAO, 1984). La infección de los animales susceptibles con el virus de la FA provoca la aparición de vesículas en las patas, dentro y alrededor de la cavidad oral, y en las glándulas mamarias de las hembras. Las pezuñas pueden desprenderse como consecuencia de las infecciones graves de las patas (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.1986). Se puede utilizar la PCR trascripción inversa para amplificar los fragmentos del genoma del virus de la FA para el diagnóstico, a partir de epitelio, leche, sangre y muestras faringoesofágicas (Amarel-Doel *et al*., 1993; Bastos, 1998). La PCR transcripción inversa combinada con la PCR de tiempo real tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento de virus (Alexandersen *et al*., 2002, Reid *et al*., 2001), y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra (Reid *et al.,* 2003). Se han diseñado cebadores específicos para distinguir cada uno de los siete serotipos. Para investigar la presencia del ARN del virus de la FA en muestras de tejidos, se han desarrollado técnicas de hibridación *in situ* (Woodbury *et al.,* 1995). La prueba PCR trascripción inversa consta de los tres procedimientos sucesivos (i) extracción de ARN molde de la muestra de prueba o control seguida de (ii) trascripción inversa del ARN extraído a ADN, (iii) amplificación de ADN mediante la PCR y (iv) detección de los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa (Reid *et al*., 2000). La

epidemiología molecular de la FA se basa en la comparación de las diferencias genéticas entre los virus. Se han publicado dendrogramas en los que se muestran las relaciones genómicas existentes entre las cepas vacunales y las cepas naturales para los siete serotipos basadas en las secuencias derivadas del gen 1D (que codifica la proteína vírica VP1).

Anemia infecciosa equina. La anemia infecciosa equina (AIE) se limita a los équidos y es producida por el virus de la AIE, un lentivirus de la familia *Retroviridae* y su genoma se basa en ARN. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo; si no se produce la muerte en el curso de los ataques clínicos agudos, se produce una fase crónica y la enfermedad tiende a convertirse en latente. Lo anterior significa que el caballo es un portador virémico y puede transmitir la enfermedad a otros caballos (Cheevers y Mcguire,1985). Se ha descrito la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) para detectar el genoma vírico de la AIE en muestras de sangre de los caballos (Nagarajan y Simard, 2001). El método de la PCR anidada está basado en las secuencias de cebadores en la región correspondiente al gen gag del genoma provírico. Ha resultado ser una técnica sensible para detectar cepas naturales del VAIE en las células blancas de la sangre de caballos infectados; lo normal es que el límite inferior de detección se sitúe en torno a 10 copias genómicas del ADN diana (Nagarajan y Simard, 2007). También se ha descrito el ensayo PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (Cook *et al*., 2002).

Algunas enfermedades producidas por protozoarios que pueden ser detectadas por PCR

Babesiosis bovina. La babesiosis bovina está causada por parásitos protozoarios del género *Babesia*. Las especies que afectan al ganado bovino son dos – *Babesia bovis y Babesia bigemina* – y la garrapata *Boophilus microplus* es el vector principal (Friedhoff, 1988).

Los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han demostrado ser muy sensibles, particularmente en la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* en animales portadores infectados (Calder *et al.,* 1996; Dalgliesh, 1993; Thammasirirak *et al.,* 2003). Para el diagnostico de *Babesia bovis* se han diseñado secuencias de nucleótidos para amplificar fragmentos del gen SSrRNA (Calder *et al.,* 1996).

Toxoplasmosis. El *Toxoplasma gondii* es un protozoo parásito intracelular obligado, de tipo zoonótico. Se han desarrollado varias técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el ADN del *T. gondii*. Las regiones diana principales son la secuencia repetitiva B1 (Burg *et al*., 1989), el gen P30 (SAG1) (Savva *et al.,* 1990) o el ARN ribosómico (ARNr) 18S (Ellis, 1998). La sensibilidad de la PCR depende del número de copias de la secuencia diana (P30: 1 copia; B1: 35 copias; ARNr: 110 unidades repetidas). El ADN del parásito puede extraerse y purificarse a partir de varios tejidos, incluyendo la placenta, el sistema nervioso central, el corazón y el músculo esquelético (Wastling *et al.,* 1993). La amplificación del gen B1 se lleva a cabo según el procedimiento descrito por Bowie *et al.,* 1997. La

amplificación primaria se realiza con los cebadores 1 y 4, generando un producto de 193 pb después de 25 ciclos a 93 ° C durante 1 minuto, 50 ° C durante 1,5 minutos y 72 ° C durante 3 minutos. El producto amplificado se diluye al 1/20 en agua destilada para reducir la amplificación de los productos no específicos. En la amplificación secundaria se utilizan los cebadores internos 2 y 3 y las mismas condiciones de reacción, se lleva a cabo en 15 ciclos dando un producto de 94 pb. Se visualiza el producto final en geles de agarosa a 1%. Se puede emplear un ensayo tipo Southern utilizando una sonda marcada para confirmar la identidad de los productos B1 de la PCR y distinguirlos de los productos no específicos. Recientemente se ha elaborado una PCR en tiempo real para la cuantificación y amplificación de ADN. Es muy parecida a otros métodos de PCR en uso actualmente y puede realizarse en placas de microtitulación de 96 pocillos. Tras cada ronda de amplificación, los tintes fluorogénicos se intercalan con el ADN bicatenario y los resultados, mostrados en una representación gráfica de la amplificación, permiten la cuantificación del ADN del parásito de la muestra. Se ha utilizado la PCR en tiempo real para amplificar y cuantificar el ADN del gen B1 de *T. gondii* (Costa *et al.,* 2000; Lin *et al.*, 2000). Esta cuantificación del ADN del parásito puede utilizarse para establecer el número de parásitos en los tejidos y los líquidos, tales como el líquido amniótico de pacientes sospechosos de infección congénita por *T. gondii.* (Nagy *et al.,* 2007).

Algunas enfermedades causadas por bacterias que pueden ser detectadas por PCR

Anaplasmosis. La anaplasmosis es producida por el microorganismo *Anaplasma* perteneciente a la familia *Anaplasmataceae* del orden *Rickettsiales*. Las especies de *Anaplasma* se trasmiten mecánica o biológicamente por insectos y/o artrópodos vectores. Varias revisiones basadas en un estudio cuidadoso de experimentos de transmisión presentan una lista de hasta 19 garrapatas diferentes capaces de transmitir *A. marginale* (Kocan *et al.,* 2004). Otros artrópodos picadores muy diversos se han considerado como vectores mecánicos, particularmente en EE.UU. Se ha demostrado la transmisión experimental con ciertas especies de tábanos (mosca del caballo) y con mosquitos del género *Psorophora* (Kocan *et al.,* 2004; Ristic, 1968). Se han desarrollado pruebas basadas en los ácidos nucléicos para detectar *A. marginale* (Figueroa *et al.,* 1993; Ge *et al*., 1997; Torioni *et al.,* 1998). Ensayos de PCR de amplificación del gen msp5 (Corona y Martínez, 2011) han demostrado ser sensibles y capaces de identificar niveles de menos de 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo que equivale a una parasitemia de aproximadamente 0,000001%.

Leptospirosis. La leptospirosis es una enfermedad producida por la espiroqueta *Leptospira*, la cual posee un genoma de dos cromosomas circulares de ADN. Los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplean en la actualidad para la detección de *leptospira* en tejidos y fluidos corporales. Se han descrito diferentes

juegos de cebadores para la realización de ensayos de la PCR (Alt *et al.,* 2001; Barocchi *et al*., 2001; Branger *et al.,* 2005), con algunos cebadores específicos para el género *Leptospira* y otros diseñados para identificar solamente las especies patógenas. Estos ensayos no sirven para identificar el serotipo infectante, aunque algunos juegos de cebadores pueden permitir la identificación de especie o de serotipo si se secuencian los amplicones de la PCR. Este análisis adicional, no es un método de diagnóstico rutinario. La preparación de las muestras de orina para PCR en el que se emplean perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos antileptospira aumenta la detección de leptospiras patógenas en la orina (Taylor *et al*., 1997). La identificación de las especies de leptospiras puede hacerse mediante el análisis de secuencias de los genes de ARN ribosómico de 16S o 23S (Morey et al., 2006; Woo *et al.,* 1997), por secuenciación de varios loci génicos (Salaun *et al.,* 2006), mediante la secuenciación del gen que codifica la subunidad B de la ADN girasa (Slack *et al.,* 2006), o por PCR usando cebadores ompL1 que son específicos de especie (Reitstetter, 2006). Se han identificado nuevas especies de leptospiras basándose en el análisis de hibridación de ADN – ADN (Brenner *et al*., 1999; Ramadass *et al.,* 1992).

Tuberculosis bovina. La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por el microorganismo *Mycobacterium bovis* y se caracteriza normalmente por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos. Cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia

en los ganglios linfáticos (sobre todo de la cabeza y tórax), pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo. En la mayor parte de los países donde se ha aislado micobacterias a partir de muestras humanas, se ha identificado a *Mycobacterium bovis*. La transmisión de *M. bovis* al hombre por la leche o sus productos se elimina mediante la pasteurización. Aunque se considera que el ganado vacuno es el verdadero hospedador de *M. bovis*, se ha descrito la enfermedad en muchos animales domésticos y no domésticos (O'reilly y Daborn,1995). La identificación específica de *M. bovis* puede llevarse a cabo utilizando una PCR orientada a la mutación en la posición 285 del nucleótido en el gen oxyR (Huard *et al*., 2003; Niemann *et al*., 2000; Parsons *et al.,* 2005). La identificación rápida de *M. tuberculosis* puede llevarse a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) orientada al ARNr 16S-23S; se han usado las secuencias de inserción IS*6110* e IS*1081*, y de los genes que codifican las proteínas específicas del complejo de *M. tuberculosis*, como la MPB 70 y el antígeno b de 38 kDa. Se ha evaluado ampliamente la utilización de la PCR para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas (sobre todo en el esputo) en pacientes humanos y se ha usado para el diagnóstico de la tuberculosis en los animales (Wilesmith, 1991). El rastreo genético permite diferenciar distintas cepas de *M. bovis* y determinar los patrones del foco, la transmisión y la propagación del *M. bovis* objeto de descripción. El método más utilizado es la espoligotipificación (de "espaciador" y "oligotipificación"), que permite la diferenciación entre las cepas de cada especie perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, incluida *M. bovis*,

y la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Heifets y Jenkins, 1998). Otras pruebas que pueden resultar más concluyentes son el análisis de la endonucleasa de restricción (REA), el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) usando la sonda IS*6110* (especialmente donde haya más de 3–4 copias de IS*6110* en el aislamiento), la sonda de la región de repetición directa (DR) y la sonda PGRS (secuencia polimórfica de repetición del GC) (Skuce *et al.*, 1996)). Se ha secuenciado el genoma de *M. bovis,* y esta información ha contribuido a la mejora de los métodos de rastreo genético.

Brucelosis bovina. En el ganado vacuno la brucelosis suele estar causada por biovariedades de *Brucella abortus*. Cuando el ganado se cría junto a ovejas o cabras, la infección también puede ser debida a *B. melitensis* (Jiménez *et al.,* 1991). Después de la infección por *B. abortus* o por *B. melitensis*, las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. La brucelosis se ha descrito también en el búfalo doméstico (*Bubalus bubalus*). La brucelosis se transmite fácilmente al hombre y causa una enfermedad febril aguda – la fiebre ondulante – que puede convertirse en crónica y producir complicaciones graves que afectan a los músculos esqueléticos, sistema cardiovascular y sistema nervioso central y se adquiere por vía oral, respiratoria o conjuntival, pero el riesgo mayor para la población general es la ingestión de productos lácteos contaminados en las zonas en las que la enfermedad es endémica. Los veterinarios y los granjeros que manejan animales infectados, fetos

abortados o placentas, están expuestos a ese riesgo laboral. La PCR ofrece un método de detección e identificación de especies de *Brucella* (Bricker, 2002; Ocampo *et al*., 2005). Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella,* se han desarrollado varios métodos que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies y algunas de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación tipo Southern (Bricker, 2002; Moreno *et al*., 2002). Se ha desarrollado también electroforesis en campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella* (Jensen *et al*., 1999; Michaux-Charachon *et al*., 1997). Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales. La primera prueba PCR múltiple específica de especie para la diferenciación de *Brucella* fue descrita por Bricker y Halling, 1994. La prueba, denominada PCR AMOS, se basaba en el polimorfismo resultante de la localización, específica de especie, de la secuencia de inserción IS711 en el cromosoma de *Brucella* e incluía cinco cebadores oligonucleótidos que podían identificar y diferenciar las biovariedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, pero no podían diferencias las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de ese microorganismo. Además, permite la diferenciación de las especies *B. abortus, B. melitensis, B. ovis*, y *B. suis*. Con el tiempo, se han introducido modificaciones en la prueba denominadas PCR BaSS para mejorar su rendimiento, y se incorporaron más cebadores específicos de cepa para la identificación de las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus* (Bricker *et al*., 2003; Ewalt y Bricker, 2000). Los procedimientos de las dos pruebas son idénticos, la única

diferencia es la relativa a los cebadores. Sin embargo, otras especies y biovariedades (tales como las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus*, las biovariedades 2, 3, 4, y 5 de *B. suis, B. canis, B. neotomae, B. ceti* y *B. pinnipedialis*) no pueden detectarse mediante las pruebas PCR AMOS o PCR BaSS. Se ha publicado que estos procedimientos de la PCR se han sometido a modificaciones adicionales para poder identificar también las serovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus* (Ocampo *et al*., 2005).

Diagnostico por PCR de patógenos causantes de mastitis bovina

La mastitis bovina (MB) es la inflamación de la glándula mamaria, por lo general debido a una infección microbiana (Watts, 1988), representando para los productores de leche de todo el mundo pérdidas de miles de dólares cada año. Estas pérdidas se deben principalmente a la disminución en la producción de leche, detrimento de la calidad y mayores costos de producción. La MB a menudo se convierte en crónica, y es importante identificar rápidamente los nuevos casos clínicos con el fin de controlar la infección en el hato. Las bacterias responsables de la MB se pueden clasificar como Ambientales (*Escherichia coli, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*) o Contagiosas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) (Bramley, 1996; Smith, 1996). La idoneidad de un método de detección para el diagnóstico de rutina depende de varios factores, como la especificidad, la sensibilidad, el costo, la cantidad de tiempo para obtener resultados y la

aplicabilidad a un gran número de muestras de leche. El método más común para detectar infecciones crónicas de MB es el California Mastitis Test, que en condiciones de campo puede medir el potencial de la infección con base a la cantidad de células somáticas que existan en la leche (Andrews *et al*., 1992). Sin embargo, esta metodología no esta diseñada para la identificación de ningún tipo de patógeno. El método de identificación de los patógenos de la glándula mamaria se realiza en cultivos *in vitro*, metodología considerada la prueba "estándar de oro" para diagnostico, sin embargo, esta técnica es muy laboriosa y requiere mucho tiempo para obtener resultados (3 a 4 días son necesarios para el crecimiento, aislamiento e identificación del patógeno). Adicional, a ello algunas bacterias como *Streptococcus uberis* y *Streptococcus parauberis*, no se pueden distinguir por ensayos bioquímicos (Jayarao *et al.,* 1991). Se ha demostrado que la detección temprana junto con el tratamiento antimicrobiano apropiado, restablecen la sanidad de la glándula mamaria y reducen el tiempo necesario para recuperar la calidad y la cantidad de la leche (Milner *et al*., 1997). Es importante la identificación del patógeno para la selección del antimicrobiano con propósitos de la terapia y también para supervisar y controlar la tasa de infección en las explotaciones. Durante los últimos 7 años, muchas pruebas se han desarrollado para el diagnóstico de la MB. Ensayos inmunoenzimáticos existen para *Staphylococcus aureus* (Bourry y Poutrel, 1996), pero el título de anticuerpos no se correlaciona con la cantidad de bacterias infectantes (Bourry y Poutrel, 1996; Heisick *et al*., 1989). Las pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos son métodos de identificación

rápida (1 o 2 días), y en particular tienen el potencial de ser muy específicas, no necesitan etapa de cultivo (Riffon *et al.,* 2001) y pueden discriminar entre organismos estrechamente relacionados, tales como *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*. Se ha demostrado previamente que las muestras de leche sirven como sustrato para la obtención de ADN bacteriano y para la posterior amplificación de secuencias diana específicas de ADN mediante PCR (Lipkin *et al*., 1993). Por todas estas razones, la técnica de PCR ha sido descrita como un método para identificar agentes patógenos de MB debido a su precisión, alto límite de detección y la rapidez. En varios estudios se ha desarrollado herramientas moleculares para identificar con rapidez, sensibilidad y especificidad los principales patógenos implicados en las infecciones intramamarias en hembras bovinas (Riffon *et al.,* 2001); utilizando juegos de cebadores específicos para cada especies de bacteria ha identificar: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis* en muestras de leche. Una vacuna eficaz contra la MB todavía no está disponible; la prevención y el diagnostico especifico de las principales bacterias, son medidas de control que deben ser sensibles y rápidas que permitan disminuir las pérdidas en la industria láctea. La principal ventaja de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) radica en la posibilidad de obtener resultados utilizando solo nanogramos de ADN obtenido de las muestras de leche, lo que permite la eliminación de los cultivos y facilita el análisis. En diferentes investigaciones se ha seleccionado la PCR para la amplificación de

regiones de ADN que codifican para el ARNr debido a la presencia de las regiones hipervariables, lo que facilita el diseño de sondas de oligonucleótidos muy específicos para cada bacteria (Giovannoni *et al.,* 1988) y regiones comunes para el diseño de sondas universales (Gray *et al*., 1984). Los cebadores para el diagnostico de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis* han sido diseñados sobre la base de secuencias de ADN que codifica para el ARNr 23S. Para *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* los cebadores se basan en secuencias de ADN que codifica para el ARNr 16S, secuencias disponibles en el Genbank (Jayarao *et al*., 1991; Mendoza *et al*., 1998; Riffon *et al*., 2001; Sabat *et al.,* 2000). Se ha evaluado el nivel de sensibilidad de la prueba de PCR para la detección de las células bacterianas. Los límites de detección de la prueba de PCR realizadas en muestras de leche cruda inoculadas ha sido hasta de 10 UFC / ml. (Cremonesi *et al*., 2006).

Diagnostico por PCR de enfermedades genéticas

Síndrome Freemartin. El síndrome Freemartin es el fenómeno de intersexualidad que se presenta con mas frecuencia en bovinos (Padula, 2005). Un Freemartin se define como un animal estéril proveniente de un parto múltiple heterosexual, es decir un macho y una hembra. En las gestaciones múltiples bovinas, el desarrollo simultáneo de dos o más embriones posibilita la fusión de las membranas fetales con formación de anastomosis vasculares a nivel del alanto - corion (Ayala *et al*., 2007),

permitiendo el intercambio en forma bidireccional de células madre hematopoyéticas dando como resultado hembras con quimerismo sexual permanente 60XX,XY y machos con quimerismo sexual permanente 60XY,XX (Pessa-Morikawa *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 1964). Varias investigaciones han medido la frecuencia del síndrome en diferentes partes del mundo, reportando una incidencia entre el 85 % y el 95% en las hembras provenientes de parto múltiple heterosexual (Romagnano *et al.*,1988; Ayala *et al.*, 2007). Los genitales externos de una Freemartin indican sexo femenino; en algunos casos puede presentarse hipertricosis en el vértice de la comisura vulvar como signo masculinizante; (Grunert, 1988) a nivel de los órganos reproductores internos se observan diferentes grados de subdesarrollo (vaginas ciegas, ovarios hipoplásicos, agenesia total o parcial de cuernos uterinos, etc.) o bien puede observarse desarrollo de órganos reproductores masculinos incipientes (epidídimos, vesículas seminales, tejido testicular, etc.) (Wilkes *et al.*, 1980), o tejido mixto, llamado ovotestis (Valencia *et al.*, 2005). A medida que la edad de estas hembras aumenta, se puede observar cambio conformacional del cuerpo presentando aspecto de macho (tabla del cuello ancha, cuernos gruesos, frente ancha, musculatura desarrollada, predominancia del diámetro torácico sobre el abdominal, escaso desarrollo mamario, etc.). El clítoris puede hipertrofiarse llegando a adquirir el tamaño y la forma de un pequeño pene. (Bonnevaux J, Baptista J. 1982). El cariotipo de linfocitos cultivados ha sido una técnica citogenética de amplia utilización para detectar el quimerismo XX/XY (Padula, 2005). Durante los últimos años, las técnicas de biología molecular han permitido profundizar

en el estudio del síndrome Freemartin. La amplificación de secuencias nucleotídicas especificas del cromosoma "Y" mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han comprobado la presencia de quimerismo en muestras de sangre de mellizas dicigóticas. La sensibilidad de la prueba permite la detección de células quiméricas en niveles inferiores al 0.05%. Esto se suma a otras ventajas de la prueba, como son su alta especificidad, rapidez y bajo costo. La literatura reporta la utilización de algunos de los genes asociados al cromosoma "Y" para el diagnóstico, tales como ZFY/ZFX (Ayala *et al.,* 2007), AMX/Y, BOB97M, BRY.1, BRY-4a, btDYZ-1 y SRY (Ennis *et al*., 1999. Padula, 2005).

Síndrome del Estrés Porcino. El Síndrome de Estrés Porcino (SSP) o Hipertermia Maligna (HM) es una de las anomalías genéticas que más impacto económico negativo ocasiona en la industria porcícola producida por una mutación en el gen que codifica para el Receptor de la Ryanidina (RYR-1) localizado en el cromosoma 6 (Davies *et al.,* 1988) en la región p11-q21. Los receptores de ryanidina son proteínas que funcionan como canales liberadores de calcio y desempeñan un papel muy importante en la iniciación de la contracción muscular (O´Brien, 1995). Los animales que sufren la mutación presentan transporte deficiente de calcio en las membranas celulares principalmente del músculo esquelético induciendo una actividad incontrolada del músculo, traduciéndose en rigidez muscular, disnea, aumento notable de la temperatura corporal, taquicardia, arritmia cardiaca, hipertrofia muscular y finalmente muerte por paro cardiaco sistólico (O´Brien, 1995). El SSP se caracteriza por

producir muerte súbita en los cerdos cuando son expuestos a diferentes actividades y/o condiciones tales como la monta, el transporte, contacto con otros animales, temperaturas elevadas, hacinamiento, ejercicio físico, privación de comida y agua, ambientes nuevos, entre otros (Shen *et al.,* 1992); así, como la aparición de canales con carne pálida, blanda y exudativa (PSE) o carne oscura, dura y seca (DFD) (Webb, 1996). Este gen mutado también produce sensibilidad a la inhalación de anestésicos como el halotano, por lo cual la exposición a este se ha utilizado como un método de diagnostico, sin embargo esta tecnica no detecta animales heterocigotos (Deufeel y Olla, 1992). Los análisis basados en ADN nuclear permiten mediante el método molecular PCR – RFLP (Trujillo *et al.,* 2001) diagnosticar la mutación en los animales SSP homocigotos y heterocigotos, detectando la sustitución de una timina por una citosina en el nucleotido 1843, que genera el cambio de una cisteina por una arginina (Fuji *et al.,* 1991).

Granulocitopatía bovina – BLAD. La granulocitopatía bovina, conocida actualmente como BLAD (Bovine Leuckocyte Adhesion Deficiency o Deficiencia de Adhesión Leucocitaria Bovina), es una enfermedad de carácter hereditario de tipo recesivo autosomal (Takahashi *et al*., 1987), que resulta letal para el ganado de la raza Holstein (Kehrli *et al.,* 1992). Se caracteriza por una susceptibilidad aumentada a la acción de los agentes infecciosos durante los dos años de vida del animal, presentando una función alterada de los neutrófilos. Pese a una alta neutrofilia los animales afectados son incapaces de iniciar una respuesta inmunológica, muriendo

antes de alcanzar la madurez sexual. En 1990 Kehrli *et al.* definieron la base molecular de la granulocitopatía bovina como una deficiencia del complejo glicoproteína Mac-1 (CD11b/CD18). Shuster *et al.,* en 1992 secuenciaron el gen normal para la proteína bovina CD18, que codifica para la subunidad ß de las integrinas, e identificaron el alelo bovino CD18 defectuoso. Se trata de 2 mutaciones puntuales dentro del alelo que codifica CD18 en el bovino. Una es silenciosa y la segunda mutación consiste en el cambio de ácido aspártico por glicina en el aminoácido 128. La mutación genética afecta la función de un receptor de proteínas en los leucocitos.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) del gen CD18 bovino (M81233, número de acceso de la base de datos GenBank) acoplada a la digestión con enzimas de restricción (RFLP) ha demostrado que identifica rápida e inequívocamente aquellos animales enfermos y/o portadores del genotipo mutado (Kehrli *et al.*, 1990; Shuster *et al.*, 1992; Tammen *et al.,* 1996).

REFERENCIAS

Alexandersen, S., Z. Zhang, SM. Reid, GH. Hutchings y AI. Donaldson. 2002. Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. J. Gen. Virol 83 (8): 1915–1923.

Alt, DP., RL. Zuerner, CA. Bolin. 2001. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with Leptospira borgpetersenii serovar hardjo. J. Am. Vet. Med. Assoc 219: 636–639.

Amarel-Doel, CMF., NE. Owen, NP. Ferris, RP. Kitching y TR. Doel. 1993. Detection of foot-and mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine -inactivated preparations by the polymerase chain reaction. Vaccine 11: 415–421.

Andrews, AH., RW. Blowey, H. Boyd y RG. Eddy. 1992. Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle. Blackwell Publishing Co., London, United Kingdom. p. 289–300

ANON. Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever (2002/106/EC). *Official Journal of the European Union*. L39/71.

Ayala, M., D. Villagómez, J. Galindo, D. Sánchez, D. Avila, J. Taylor, M. Merlos y L. Guerrero. 2007. Estudio anatomopatológico, citogenético y molecular del síndrome freemartin en el bovino doméstico (Bos taurus). REDVET, Revista electrónica de Veterinaria 8 (9): 1 – 15.

Bastos, ADS. 1998. Detection and characterization of foot-and-mouth disease virus in sub-Saharan Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 65: 37–47.

Barocchi, MA., Ko AI, SR. Ferrer, MT. Faria, MG. Reis, LW. Riley. 2001. Identification of new repetitive element in Leptospira interrogans serovar copenhageni and its application of PCR-based differentiation of Leptospira serogroups. J. Clin. Microbiol., 39: 191–195.

Beier, D., P. Blankenstein, H. Fechner. 1998. Chances and limitations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. dtsch tierartzl. wochenschr. 105 : 408–412.

Bonnevaux, J., J. Baptista. 1982. Anomalías congénitas en el bovino, descripción de tres tipos de Freemartin. Veterinaria (Uruguay). 18: 51-54.

Bourry, A. y Poutrel, B. 1996. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. J. Dairy Sci. 79:2189–2195.

Bowie, WR., AS. King, DH. Werker, JL. Isaac-Renton, A. Bell, SBV. Eng, SA. Marion. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet 350 : 173–177.

Bramley AJ. 1996. Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wis.

Branger, C., B. Blanchard, C. Fillonneau, I. Suard, F. Aviat, B. Chevallier, G. Andre-Fontaine. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiol. Lett.243, 437–445.

Brenner, J., AF. Kaufmann, KR. Sulzer, AG. Steigerwalt, FC. Rogers, RS. Weyant. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 839–858.

Bricker, BJ. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol. 90: 435–446.

Bricker, BJ., DR. Ewalt, SC. Olsen y AE Jensen. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* speciesspecific polymerase chain reaction assay, an improved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 15: 374–378.

Bricker, BJ. y SM. Halling. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 2660–2666.

Brock, KY. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. vet. clin. north. Am 11: 549–561.

Burg, JL., CM. Grover, P. Pouletty, JC. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, Toxoplasma gondii, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol, 27: 1787–1792.

Calder, JAM., GR. Reddy, L. Chieves, CH. Courtney, R. Littell, JR. Livengood, RAI. Norval, C. Smith, JB. Dame. 1996. Monitoring Babesia bovis infections in cattle by using PCR-based tests. J. Clin. Microbiol. 34: 2748–2755.

Cheevers, WM. y TC. Mcguire. 1985. Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence. Rev. Infect. Dis.7: 83–88.

Chu, E., H. Thuline y D. Norby. 1964. Triploid-diploid chimerism in a male tortoiseshell cat. Cytogenetics. 3: 1 - 18.

Cook, RF., SJ. Cook, Li FL, RC. Montelaro, CJ. Issel. 2002. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). Virol Methods 105: 171–179.

Costa, JM., C. Pautas, P. Ernault, F. Foulet, C. Cordonnier, S. Bretagne. 2000. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. J. Clin. Microbiol. 38: 2929–2932.

Corona, B. y Martínez, S. 2011. Detección de *Anaplasma marginale* en bovinos, mediante la amplificación por PCR del gen msp5. rev. salud anim. 33 (1): 24-31

Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Morandi y M. Luzzana. 2006. Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. Dairy Sci. 89:163–169

Dalgliesh, RJ. 1993. Babesiosis. Immunology and Molecular Biology molecular biology of Parasitic Infections. K.S parasite infections, ed. Blackwell, Oxford, UK, p. 352–383.

Davies, W., J. Harbitz, R. Fries. 1988. Porcine malignant hiperthermia carriers detection and chromosomal assingmant using a linked probe. Anim Genet. 19: 203 -212

Deufeel, T., A. Olla. 1992. Evidence for genetics heterogeneity of malignant hyperthermia susceptibility. Am J Hum Genet. 50:1. 151 – 161.

Donis, RO. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. vet. clin. north. Am 11 : 393–423

Ellis, JT. 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of Neospora caninum and Toxoplasma gondii. J. Parasitol 28 : 1053–1060.

Ennis, S., L. Vaughan, y TF. Gallagher. 1999. The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. Research in Veterinary Science. 67: 111 – 112.

Ewalt, DR. y BJ. Bricker. 2000. Validation of the abbreviated AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. J. Clin. Microbiol. 38: 3085–3086.

Federer KE., R. Burrows ,JB. Brooksby . 1967. Vesicular stomatitis virus – the relation between some strains of the Indiana serotype. Res. Vet. Sci. 8 : 103–117.

Friedhoff, KT. 1988. Babesiosis of Domestic Animals and Man, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 23–52.

Figueroa JV; LP. Chieves, GS. Johnson , GM. Buening.1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood. Vet. Parasitol., 50: 69–81.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). 1984. Emerging Diseases of Livestock. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A., ed. FAO, Rome, Italy, 43–51.

Fuji J, K. Outsu , F, de Leon. Zorsato , VK. Khanna, JE. Weiler, PJ. O'Brien, DH. MacLennan.1991. Identification of a mutation in

porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science. 253: 448-451.

Ge NL, KM .Kocan, SA. Ewing, EF .Blouin, WW. Edwards, GL. Murphy, LJ .Dawson. 1997. Use of a non-radioactive DNA probe for detection of Anaplasma marginale infection in field cattle: comparison with complement fixation serology and microscopic examination. J. Vet. Diagn. Invest, 9 : 39–43.

Gilbert SA, KM .Burton, SE .Prins, D. Deregt. 1999. Typing of bovine viral diarrhea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. j. clin. microbiol; 37: 2020–2023.

Gillet N, A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, AB. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, l. Willems. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. retrovirology, 4, 18.

Giovannoni SJ, EF. DeLong, GJ. Olsen y NR. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol; 170:720–726.

Gray MW, RJ. Sankoff Dy Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in a small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res; 12:5837–5852.

Grunert, G. y M. Berchtold. 1988. Infertilidad de la vaca. Argentina. Editorial Hemisferio Sur. p 84.

Hamel AL, MD. Wasylyshen, GPS Nayar. 1995. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. j. clin. Microbial; 33 : 287–291.

Heifets LB y PA. Jenkins. 1998, Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol*; 34, 2522–2525.

Heisick JE, FM. Harrell, EH. Peterson, S. McLaughlin, DE. Wagner, IV. Wesley y J. Bryner. 1989. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. J. Food Prot; 52:154–157.

Hoffmann B, M. Beer, C. Schelp, H. Schirrmeier, K. Depner. 2005. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. J. Virol. Methods; 130: 36–44.

Hofner MC, WC. Carpenter, NP. Ferris, RP. Kitching, FA. Botero. 1994. A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. j. virol. Methods ; 50 : 11–20.

Huard RC, Butler WR. De Oliveira, D y Ho JL. Van Soolingen. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J. Clin. Microbiol; 41 (4): 1637–1650.

Jayarao BM, JJ. Dore, GA. Baumbach, KR. Matthews y SP. Oliver. 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol; 29: 2774– 2778.

Jensen AE, Cheville NF, Thoen CO, Macmillan AP y Miller WG. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella spp*. isolated from seals, porpoises, and dolphins. J. Vet. Diagn. Invest., 1999; 11: 152–157.

Jiménez de Bagues MP, C. Marin y JM. Blasco. 1991. Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. Prev. Vet. Med; 11: 17–24.

Kehrli ME, C. Schmalstieg, DC. Anderson, MJ. Van Der Maaten, BJ. Hughes, MR. Akermann, CL. Wilhemsen, GB. Brown, MG. Stevens y CA. 1990. Whetstone. Molecular definition of the bovine granulocytopathy syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. Am. J. Vet. Res; 51:1826-1836.

Kim SG, EJ Dubovi. 2003. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. Biologicals; 31 : 103–106.

Kocan KM, J. De La Fuente, EF. Blouin, JC. Garcia-Garcia. 2004. *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*): recent

advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitology; 129: S285–S300.

Letellier C, P. Kerkhofs. 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. j. virol. methods; 114 : 21–27.

Lin MH, TC. Chen, T. Kuo, CC. Tseng, CP. Tseng. 2000. Real-Time PCR for quantitative detection of Toxoplasma gondii. J. Clin. Microbiol.; 38: 4121–4125.

Lipkin E, A. Shalom, H. Khatib, M. Soller y A. Friedmann. 1993. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerasechain reaction. J. Dairy Sci; 76:2025–2032.

Mcgoldrick A, JP. Lowings, G. Ibata, JJ. Sands, S. Belak, DJ. Paton. 1998. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). J. Virol. Methods; 72: 125–135.

Mendoza M, H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne y J. Freney. 1998. Identification

of *Staphylococcus* species by 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR

analysis. Int. J. Syst. Bacteriol.; 48:1049–1055.

Michaux-Charachon S, G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, A. Allardet-Servent, D. O'callahan y M. Ramuz. 1997. Genome structure and phylogeny in genus Brucella. J. Bacteriol; 179: 3244–3249.

Milner P, KL. Page y JE. Hillerton. 1997. The effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk. J. Dairy Sci; 80:859–863.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986. Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.

Moreno E, A. Cloeckaert y I. Moriyon. 2002. Brucella evolution and taxonomy. Vet. Microbiol; 90: 209– 227.

Morey RE, RL. Galloway, SL. Bragg, AG. Steigerwalt, LW. Mayer, PN. 2006. Levett. Speciesspecific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol.; 44: 3510–3516.

Nagarajan MM y C. Simard. 2001. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. J. Virol. Methods; 94: 97–109.

Nagarajan MM y C. Simard. 2007. Gag genomic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada: implication on EIA diagnosis and peptide-based vaccine development. Virus Res; 129, 228–235.

Nagy B, L. Lázár, G. Nagy, Z. Bán, Z. Papp. 2007. Detection of Toxoplasma gondii in amniotic fluid using quantitative real-time PCR method. Orv. Hetil; 148: 935–938.

Niemann S, D. Harmsen, S. Rusch-Gerdes y E. Richter. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol; 38 (9): 3231–3234.

Padula AM. 2005. The freemartin syndrome: an update. Animal Reproduction Science ; 87: 93 – 109

Parsons LM, R. Brosch, ST. Cole, A. Somoskovi, A. Loder, G. Bretzel, D. Van Soolingen, YM. Hale y M. Salfinger. 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J. Clin. Microbiol; 40 (7): 2339–2345.

Paton DJ, A. Mcgoldrick, I. Greiser-Wilke, S. Parchariyanon, JY. Song, PP. Liou, T. Stadejek, JP. Lowings, H. Bjorklund, S. Belak. 2000. Genetic typing of classical swine

fever. Vet. Microbiol; 73: 137–157.

Paton DJ, A. Mcgoldrick, E. Bensaude, S. Belak, C. Mittelholzer, F. Koenen, H. Vanderhallen, I. Greiserwilke, H. Scheibner, T. Stadejek, M. Hofmann, B. Thuer. 2000. Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. Vet. Microbiol; 77: 71–81.

Pessa-Morikawa T, M. Niku, A. Livanainen. 2004. Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. Developmental and Comparative Immunology.; 28: 77 – 87

O´brien PJ. 1995. The causative mutation for porcine stress syndrome. Food Animal; 257 – 269.

Ocampo-Sosa AA, J. Agüero-Balbín y JM. García-Lobo. 2005. Development of a new PCR assay to identify Brucella abortus biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. Vet. Microbiol; 110: 41– 51.

O'reilly L.M. y C.J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* (Supple. 1); 76: 1–46.

Reid S., NP. Ferris, GH. Hutchings, AR. Samuel y NJ. Knowles. 2000. Primary diagnosis of foot-andmouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Methods; 89: 167–176.

Reid, S., NP. Ferris, GH Hutchings, Z Zhang, GJ Belsham, S. Alexandersen. 2001. Diagnosis of footand- Mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. Vet. Rec. 149: 621–623.

Reid, SM., SS. Grierson, NP. Ferris, GH. Hutchings y S. Alexandersen. 2003. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. Methods, 107 (2): 129–139.

Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet y J. Lagace. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. Journal of clinical microbiology; 2584–2589

Ristic, M. 1968. Chapter 23: Anaplasmosis. pp. 473–542. In: Infectious Blood Diseases of Man and Animals eds. Academic Press, New York, USA,

Rodriquez, LL., GJ. Letchworth, CF. Spiropoulou, ST. Nichol. 1993. Rapid detection of vesicular stomatitis virus new jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. j. clin. microbiol. 31 : 2016–2020.

Romagnano A y col. 1988. Freemartinism in domestic animals. Medicin veterinaire du Quebec. 18: 79 - 84.

Sabat, G., P. Rose, WJ. Hickey y JM. Harkin. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. Appl. Environ. Microbiol. 66:844–849.

Saiki, RK., DH. Gelfand, S. Stoffel, SJ. Sharf, R. Higuchi, GT. Horn, KB. Mullis y HA. Herlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239:487-491.

Salaun, L., F. Merien, S. Gurianova, G. Baranton, M. Picardeau. 2006. Application of multilocus variable number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 44: 3954–3962.

Salem, GH., XJ. Liu, JD. Johnsrude, JB. Dame, G. Roman Reddy. 1993. Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. Mol. Cell. Probes 13: 107–113.

Savva, D., JC. Morris, JD. Johnson, RE. Holliman. 1990. Polymerase chain reaction for detection of Toxoplasma gondii. J. Med. Microbiol. 32: 25–31.

Shen, H., R. Lahucky, L. Kovac, PJ. O´brien. 1992. Comparison of Hal gene status with ^{31}P NMR-determined muscle metabolites and with Ca sequestration activity of anoxia – challenged muscle from pigs homozygous and heterozygous for porcine stress syndrome. Pig News and Information. 13: 105 – 109.

Shuster, DE., ME. Kehrli, MR. Ackermann y RO. Gilbert. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte

adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:9225-9229.

Skuce, RA., D. Brittain, MS. Hughes y SD. Neill. 1996. Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J. Clin. Microbiol. 38: 2469–2474.

Smith, BP. 1996. Large animal internal medicine, 2nd ed., Mosby, Boston, Mass p. 1181–1193.

Slack, AT., ML. Symonds, MF. Dohnt, LD. Smythe. 2006. Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiol.; 27: 95.

Ramadass, P., BDW, Jarvis, RJ. Corner, D. Penny, Marshall RB. 1992. Genetic characterization of pathogenic Leptospira spp. by DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 215–219.

Reitstetter, RE. 2006. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of Leptospira. FEMS Microbiol. Lett., 264: 31–39.

Risatti, GR., JD. Callahan, WM. Nelson, MV. Borca. 2003. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41 (1) : 500–505.

Rola, M., J. Kuzmak. 2002. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. j. virol. methods, 99 : 33–40.

Takahashi, K., K. Miyagawa, S. Abe, T. Kurosawa, M. Sonoda, T. Nakade, H. Nagahata, H. Noda, Y. Chihaya y E. Isogai. 1987. Bovine granulocytopathy syndrome of Holstein Friesian calves and heifers. Jpn. J. Vet. Sci. 49:733-736.

Tammen, I., H. Klippert, A. Kuczka, A. Treviranus, J. Pohlenz, M. Stober, D. Simon y B. Harlizius. 1996. An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. Res. Vet. Sci. 1996; 60:218-221.

Taylor, MJ., WA. Ellis, JJ. Montgomery, KT Yan, SW Mcdowell, D. Mackie. 1997. Magnetic immunocapture PCR (MIPA): detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo. Vet. Microbiol.;1997: 56, 135–145.

Terpstra, C. y Wensvoort, G. 1988. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.* 45: 137–142.

Thammasirirak, S., J. Siriteptawee, N. Sattayasai, P. Indrakamhang, T. TAraki. 2003. Detection of Babesia bovis in cattle by PCR-ELISA. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 34: 751–757.

Torioni De Echaide, S., DP. Knowles, TC. Mcguire, GH. Palmer, CE. Suarez, TF. Mcelwain. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. J. Clin. Microbiol., 36: 777–782.

Trujillo, E., M. Camargo, D. Noriega. 2001. Busqueda molecular de mutantes del gen RYR-1 que predisponen al síndrome del estrés porcino, en Antioquia (Colombia). Actual Biol. 23 (75) : 47 -52

Valencia, F., F. Johnson y A. Duque. 2005. Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin. Revista lasallista de investigación. 2 (2): 45 - 49.

Wastling, JM., S. Nicoll, D. Buxton. 1993. Comparison of two gene amplification methods for the detection of Toxoplasma gondii in experimentally infected sheep. J. Med. Microbiol. 38: 360–365.

Watts, JL. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 6: 41–66.

Webb, AJ. 1996. Future challenges in pig genetics. Pig News and Information. 17: 11 – 16.

Wilesmith, JW. 1991. Epidemiological methods for investigating wild

animal reservoirs of animal disease. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 10: 205–214.

Wilkes, P., W. Wijeratne y I. Munro. 1980. A study of the cytogenetics and reproductive anatomy of freemartin heifers. 4 th europeam colloquium of cytogenetics of domestic animals, Uppsala, Sweden. Departament of animal breeding and genetics faculty of veterinary medicine, Swedish University of Agricultural Sciences: 104 – 117.

Woo, TH., BK. Patel, LD. Smythe, ML. Symonds, MA. Norris, MF. Dohnt. 1997. Identification of pathogenic Leptospira genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 3140–3146.

Woodbury. EL., MC. Ilota, CC. Brown y JS. Salt. 1995. Optimization of an in situ hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. J. Virol. Methods 51: 89–94.

CAPÍTULO 3

Análisis molecular y su impacto en el mejoramiento zootécnico

Julián Echeverri[1],
Albeiro López Herrera[2],
Jaime Parra Suescun[3]

[1] Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

[2] Zoot, MV, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

[3] Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Introducción

Los métodos de genética cuantitativa han permitido lograr espectaculares incrementos en la productividad de todas las especies en las que se han aplicado durante los últimos 40 años. Así, por ejemplo, se ha duplicado la cantidad de leche que produce una vaca, una cerda produce un 50% más de lechones y éstos comen un 30% menos para producir un 30% más de carne magra, mientras que un pollo ha multiplicado por tres su peso a la misma edad. Estos éxitos, logrados con la exclusiva aplicación de genética cuantitativa, es una de las causas que ha contribuido a descuidar –a diferencia de lo que ocurrió con la genética vegetal o con la genética humana-, la inversión y el desarrollo de otras áreas de la genética; así, hasta años muy recientes prevalecía una posición escéptica sobre la eficiencia de la biotecnología en la producción ganadera (Cañón, 2006).

Los grandes logros de la genética cuantitativa tradicional han sido valorados por años en todas la especies domesticas, teniendo un mayor impacto en aquellas en las que el intervalo generacional y la tasa de reproducción de la especie facilitan el éxito del mejoramiento genético animal mediante el uso de estas metodologías. Estas metodologías tradicionales se fundamentan en la utilización de información fenotípica y genealógica para buscar mediante análisis estadísticos

la predicción de los valores genéticos de los animales y utilizarlos posteriormente en programas de selección asistida, logrando que los animales superiores afecten en mayor proporción los cambios en las frecuencias genéticas en la población, favoreciendo posteriormente el desempeño fenotípico de los individuos.

Sin embargo, las iniciativas llevadas a cabo a propósito de los proyectos para secuenciar el genoma humano, actuaron como catalizador para concitar el interés de los genéticos hacia la genómica animal en los últimos 15 años. La genómica es una subdisciplina de la genética que tiene por objeto la caracterización molecular de genomas completos; surgió de la integración de las cinco áreas tradicionales de genética: genética mendeliana, citogenética, genética molecular, genética de poblaciones y genética cuantitativa, además de un uso intensivo de nuevas tecnologías de informática y robótica. Con ello se ha logrado publicar en años recientes los borradores del genoma completo de la mayoría de las especies domésticas. La secuenciación del genoma bovino comenzó en diciembre de 2003 con muestras proporcionadas por ejemplares de la raza Hereford; posteriormente se llevaron a cabo secuenciaciones con menor grado de precisión en otras razas bovinas como Holstein, Angus, Jersey, Limousin, Norwegian Red y Brahman. En octubre de 2004, se anunció la disponibilidad en bases de datos públicas del primer borrador del genoma bovino. Este esfuerzo internacional fue realizado por organismos como el Instituto Nacional para la Investigación del Genoma Humano (NHGRI), el Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos, el Estado

de Texas, el consorcio Genome Canadá a través de Genome Bristish Columbia, diversas organizaciones de investigación y desarrollo de Australia y Nueva Zelanda, así como fundaciones ubicadas principalmente en EU (Cañón, 2006).

Otra observación es la ganancia genética o progreso que se logra con el uso de los marcadores genéticos o QTLs, este progreso se logra si se escoge el mejor camino en menos tiempo que la utilización de la selección genética tradicional, además con la ayuda de técnicas biotecnológicas como la IA, los sistemas MOET, la fertilización *in vitro* etc, el uso de los marcadores genéticos puede incrementar la eficiencia y el progreso genético dentro de una población.

La genética molecular es una rama de la genética que estudia la herencia con un carácter multidisciplinario; áreas como la bioquímica, física, estadística y biología se unen para analizar con profundidad los fenómenos biológicos asociados a la herencia desde una perspectiva de moléculas.

Anteriormente la genética molecular ocupaba un lugar secundario debido a la dificultad práctica de su estudio; los mecanismos, análisis de laboratorio y equipos disponibles hace 20 años no permitían el avance de esta ciencia a la velocidad que se hubiera deseado en el siglo pasado. Con el desarrollo de las nuevas técnicas en electrónica y física, se han desarrollado equipos y metodologías que han permitido surgir con fuerza a la genética molecular, es así como en la actualidad es una ciencia aplicada a todas las especies domesticas, a un gran numero de especies silvestres de

importancia en temas de conservación y biodiversidad y a múltiples especies vegetales.

La evolución de la genética molecular es asombrosa; en los últimos años se han descrito genomas completos para diversas especies y se han perfeccionado técnicas de análisis molecular que aseguran resultados de alta confiabilidad precisión y bajo costo. Las perspectivas son muy buenas debido a que es una ciencia aplicada a los animales de interés zootécnico y que también es de suma importancia para el estudio de la medicina en humanos, asegurando que la importancia que hoy se le da a nivel mundial, puede llegar a ser duradera y puede inclusive verse aumentada en un futuro cercano.

Desde el punto de vista de la mejora animal, la importancia de la genética molecular radica en que ahora se puede determinar con exactitud lo que antes solo podía inferirse. Cuando anteriormente se estimaba el valor genético de un animal, se decía que este correspondía al efecto de todos los genes que estaban involucrados en la expresión de determinada característica, esto es llamado el efecto poligénico, pero de ninguna manera se podía asegurar cual era el efecto especifico de algún gen o de varios de ellos. Ahora se puede determinar mediante análisis moleculares la presencia o ausencia de algún alelo especifico en un individuo o en una familia. Además de ello, se puede determinar la asociación o el efecto de cualquiera de estos alelos sobre algunas características de importancia para la industria zootécnica.

Es importante anotar que con la llegada de la genética molecular no disminuye la importancia de la genética cuantitativa como base para el mejoramiento animal de las especies domesticas. La genética cuantitativa sigue siendo la base fundamental del análisis genético y la información fenotípica el soporte para ese análisis.

En el bovino de leche se han determinado muchos marcadores moleculares asociados a caracteres de interés para esta industria, algunos de ellos corresponden a marcadores moleculares de un solo nucleótido y son los mas utilizados en el campo del mejoramiento animal.

La mayoría de los caracteres de interés económico en ganado lechero son cuantitativos, es decir, que éstas características están influenciadas por múltiples genes (características poligénicas), y son denominados QTLs (Quantitative Trait Loci). Además, la expresión de una característica también está influenciada por el ambiente; es por esto que los QTLs solo pueden explicar una fracción pequeña de la varianza total. Por esta razón la selección genética tradicional es difícil y el análisis de QTLs de caracteres cuantitativos puede mejorar la precisión y por tanto el progreso genético.

Numerosos estudios realizados durante las últimas cuatro décadas han puesto de manifiesto una relación estadísticamente significativa entre marcadores moleculares (QTLs) y caracteres de producción lechera (Zwiauer, 1980; Haley, 1995 y Andersson, 1996).

Brum et al. (1967) hallaron en la raza Holstein, asociaciones entre las variantes alélicas de las transferrinas (Tf) con diferencias en el rendimiento de leche y grasa. Gelderman *et al.* (1985), al estudiar tres familias de medias hermanas de la raza Friesian, observaron asociaciones entre las variantes de postalbúmina (Pa) con rendimiento en litros de leche, y entre amilasa-1 (Am-1) con porcentaje de grasa. Resultados similares fueron reportados para el ganado sueco por Andersson-Eklund y Rendel (1993), quienes estudiaron la asociación entre las variantes del locus Am-1 con el valor reproductivo del contenido de grasa en leche.

A pesar del esfuerzo realizado, los estudios de correlación entre los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos con los caracteres de producción lechera no lograron grandes avances. Por otra parte, diferentes autores llegaron a resultados contradictorios. Mientras que algunos reportaban una alta asociación para un locus determinado, otros grupos no hallaban asociación alguna. Estas contradicciones podrían haber sido consecuencia de los diferentes métodos estadísticos y diseños experimentales utilizados en cada caso.

En los últimos años, el enfoque fue trasladado hacia la búsqueda de loci candidatos y hacia el rastreo del genoma mediante el uso simultáneo de un gran número de marcadores moleculares altamente polimórficos, del tipo microsatélite (Haley, 1995). Se ha definido a los loci candidatos como aquellos genes que por su función biológica participarían en la expresión de un carácter cuantitativo y por lo tanto

podrían explicar un porcentaje de su varianza fenotípica. Pueden mencionarse a modo de ejemplo las proteínas de la leche, la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH), el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (BoLA), etc.

Existen evidencias bien documentadas que permiten correlacionar algunas de las variantes de las proteínas de la leche con el rendimiento y la composición del producto obtenido (McLean *et al.,* 1984). Sin embargo, diferentes investigadores han llegado a resultados contradictorios. Así por ejemplo, para cierto locus, algunos autores han reportado una alta correlación entre un alelo o genotipo particular de la proteína de la leche y los caracteres de producción lechera; mientras que otros han hallado un pequeño o ningún grado de asociación. Las diferencias observadas pueden deberse al método estadístico empleado, al reducido número de marcadores y animales analizados, y al efecto de la recombinación.

Entre las proteínas detectadas en la leche se encuentran las caseínas (κ-caseína, βcaseína, αS1-caseína y αS2-caseína), βlactoglobulina y α-lactoalbúmina.

κcaseína (CASκ): proteína que constituye aproximadamente el 13 % de las caseínas totales. Mediante corridas electroforéticas, así como también a nivel de ADN, se han descrito dos variantes alélicas mayoritarias: A y B (Aschaffenburg, 1965; Eigel *et al.,* 1984; Levéziel *et al.,* 1988; Denicourt *et al.,* 1990; Medrano y Aguilar-Cordoba, 1990).

La leche producida por animales de genotipo BB contiene mayores niveles de proteínas, grasa y sólidos totales (Ng-Kwai-Hang *et al.,* 1984; McLean *et al.,* 1984, 1992; Geldermann *et al.,* 1985; Gonyon *et al.,* 1987; Aleandri *et al.,* 1990). Además este genotipo se ha correlacionado con un mayor rendimiento en litros de leche (Lin *et al.,* 1986). Se calcula que esta variante puede ofrecer un promedio de 2.000 Kg más de leche durante toda la vida productiva del animal (Fuente: Genmark, USA). Estas observaciones fueron confirmadas en diferentes razas como Holstein, Friesian, Jersey, Ayrshire, Guernsey y otras.

Sin embargo, en las diferentes razas, no siempre se presentan las mismas asociaciones marcador - QTL. Si tenemos en cuenta que el ligamiento entre el QTL y el marcador genético es incompleto, podrían existir en la población diferentes haplotipos marcador-QTL. De este modo, el alelo B de CASκ podría estar ligado al alelo de alta producción del QTL en algunos animales, mientras que en otros estaría ligado a la variante de baja productividad. Por lo tanto, los efectos estimados del QTL sobre el rasgo cuantitativo se verán sesgados por efecto de la recombinación. Así por ejemplo, Cowan et al. (1992) observaron que el alelo B de CASκ estaba asociada a una disminución en el porcentaje de grasa. Mientras que, Haenlein *et al.,* (1987), no encontraron asociación entre los alelos de CASκ y los caracteres de producción lechera.

La leche producida por animales con genotipo CASκ BB posee propiedades superiores para la manufacturación de

queso (Feagan *et al.,* 1972; Schaar *et al.,* 1984). La leche de tipo BB tiene cuajo más firme, y un mayor contenido en proteínas y sólidos totales (McLean y Schaar, 1989).

La leche derivada de animales CASκ AA tiene menor porcentaje de κ-caseina (κ-CN), y como consecuencia de esto una mayor proporción de micelas grandes (McLean *et al*, 1982). Por el contrario, la leche de animales CAS BB presenta mayor proporción de κ-caseína y micelas más pequeñas. Esta característica explica la formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos, lo que resulta en un rendimiento superior durante la producción de queso, comparada con la leche producida por animales con genotipo CASκ AA (Schaar, 1981).

Van Eenennaam y Medrano (1991) demostraron que la leche de los animales con genotipo CASκ AB contiene una mayor proporción de κ-CN B. Esto sugeriría que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos. La diferencia en la expresión de los alelos, explicaría las observaciones hechas previamente, que evidenciaban que la proporción de κ-CN en la leche depende del genotipo del animal (BB > AB > AA) (Mc Lean *et al.,* 1984).

Las diferencias en el contenido proteico de la leche, entre los animales CASκ AA y CASκ BB, se estimó en aproximadamente un 3%. Este locus puede explicar alrededor del 4% de la variación total en el contenido proteico (Haley, 1995).

α_{S1}-caseína (CASα_{S1}): Esta proteína constituye el 38 % de las caseínas totales presentes en la leche. Se han identificado con base en la migración electroforética, así como por técnicas moleculares, dos variantes principales denominadas B y C (Aschaffenburg, 1965). Estudios de comportamiento realizados en animales caracterizados genéticamente para esta proteína, evidenciaron que los individuos CASα_{S1} BB tenían un rendimiento en litros de leche significativamente mayor que los animales CASα_{S1} BC (Ng-Kwai-Hang *et al*, 1984). Estas observaciones indicarían la existencia de una fuerte correlación entre el alelo B y una mayor producción lechera. Sin embargo otros autores como Arave *et al*. (1971), no hallaron asociaciones significativas entre los genotipos de CASα_{S1} con producción lechera en vacas de la raza Holstein.

En las razas lecheras más difundidas, como las Holstein-Friesian, el alelo B se encuentra próximo a la fijación; este hecho podría haber sido consecuencia de la fuerte presión de selección ejercida sobre dichas razas durante el último siglo. Por esta razón se ha hecho difícil llevar a cabo los estudios de asociación entre los genotipos de CASα_{S1} y los caracteres de producción lechera.

(β-lactoglobulina (LGβ): La β-LG es la principal proteína del suero en la leche de los rumiantes, constituyendo el 50% de las proteínas presentes en el suero. Aunque todavía no está clara su función fisiológica, se cree que prodría participar en el transporte y metabolismo del retinol y los ácidos grasos (Frapin *et al.,* 1993).

Al igual que en el caso de κ-caseína, se han descrito dos variantes alélicas mayoritarias: A y B (Aschaffenburg, 1965). La expresión diferencial de los alelos A y B de βLG ha sido observada en diferentes poblaciones de ganado bovino lechero (McLean *et al*, 1984).

Numerosos autores han reportado el efecto cuantitativo de las variantes alélicas en la composición de la leche (Bech *et al.,* 1990), así como en la producción de queso (Schaar, 1985). Por ejemplo, Ng-Kwai-Hang *et al*. (1984) observaron un efecto significativo de LGβ sobre la cantidad de proteínas; Haenlin *et al*. (1987) hallaron una asociación entre LGβ y el porcentaje de grasa en la leche; Cowan *et al*. (1992), al estudiar dos familias de medias hermanas paternas de raza Holstein, reportaron un efecto de sustitución cromosómica significativo para el alelo A en una de ellas; Van der Berg et al. (1992) encontraron que la variante B estaba asociada con una mayor cantidad de caseínas, lo cual causaba un incremento en la conversión de leche en queso. Finalmente, cabe mencionar que no todos los autores han hallado correlaciones estadísticamente significativas entre los genotipos de LGβ y los caracteres de producción lechera (Mc Lean *et al*, 1984).

Podría resumirse que la variante A está asociada con un mayor nivel de β-LG y proteínas totales del suero de la leche, y con un menor contenido de caseínas y grasas (Boland *et al.,* 1992). Por otra parte, los animales con genotipo BB tienen un menor contenido de β-LG y un mayor contenido de caseínas, proteínas totales y grasa en la leche, lo que resulta

en mejores propiedades para la producción de queso (Tong *et al.,* 1993). Además, este genotipo ha sido correlacionado con un mayor rendimiento en litros de leche con respecto al genotipo AA, habiéndose observado para el genotipo AB un rendimiento intermedio (Jadot *et al*, 1992).

El estudio de la región promotora de este loci evidenció la presencia de 13 sustituciones nucleotídicas entre ambas variantes alélicas. Estas sustituciones que ocurren en los sitios específicos de unión de los factores de transcripción, serían las causantes de las diferencias observadas en la expresión de las variantes alélicas de LGβ. En los animales heterocigotos aproximadamente el 60% de la β-LG corresponde a la variante A, mientras que el 40% restante está contituída por la variante B (Graml *et al*, 1989). Se han reportado polimorfismos en la región promotora de la LGβ en cinco razas bovinas (Wagner *et al*, 1994). Dentro de la región promotora han sido reportados diez sitios polimórficos, los cuales fueron asociados a las variantes alélicas (Lum *et al.,* 1997).

Las distintas regiones promotoras evidenciaron diferente grado de afinidad al factor de transcripción AP-2, lo que podría llevar a formar un complejo de transcripción más o menos eficiente, que causaría diferencias cuantitativas en la expresión de βLG (Lum *et al,* 1997). Por lo tanto, el factor de transcripción AP-2 podría actuar como un modulador de la expresión de la LGβ.

α-lactoalbúmina (α-AL): La α-lactoalbúmina (α-LA) contituye el 20% de las proteínas presentes en el suero

de la leche. Hasta el momento han sido detectadas tres variantes: A, B y C (Aschaffenburg, 1965). Bleck y Bremel (1993) correlacionaron, en la raza Holstein, la variante A con una mayor cantidad de leche, proteínas y grasa. La variante B fue asociada con mayores porcentajes de proteína y grasa, observándose valores intermedios en los animales heterocigotos.

Asociaciones entre los haplotipos de las proteínas de la leche y caracteres de producción

Muchos de los estudios realizados han incluido, no sólo el análisis del efecto individual de las proteínas de la leche sobre la producción, sino también su efecto en forma conjunta. Así por ejemplo, Geldermann et al. (1985) observaron, en una familia de medias hermanas paternas de la raza Friesian, que los haplotipos CASα_{S1}-CASβ evidenciaban un efecto de sustitución significativo sobre la producción lechera. Haenlein *et al.* (1987) reportaron que la interacción entre los genotipos de CASα_{S1} y LGβ era significativa para el porcentaje de grasa y sólidos no grasos. Ron et al. (1994) observaron que la interacción entre los genotipos de LGβ y CASκ tenía un efecto significativo sobre el porcentaje de grasa. Velmala *et al.* (1995) reportaron diferencias significativas entre los haplotipos de las caseínas con rendimiento lechero y cantidad de grasa en la leche, en vacas de la raza Finnish Ayrshire. Lin *et al.* (1986), estimaron que el efecto de la interacción entre las proteínas de la leche era de 8,9% sobre la varianza fenotípica en la producción lechera, 8,6% y 5% en la cantidad de proteínas y grasa respectivamente.

Los primeros estudios tendientes a determinar los polimorfismos de ADN para la Prolactina se realizaron mediante la técnica de Southern Blot (Cowan *et al.,* 1989). Lewin et al (1992) utilizaron la técnica de PCR-RFLP para evidenciar el sitio de restricción polimórfico Rsal localizado en el exón 3 de PRL.

A pesar de la importancia fisiológica de esta hormona para la lactancia, son escasos los trabajos sobre asociación entre PRL y producción lechera. Cowan et al. (1990) establecieron, mediante la técnica de Southern Blot, la correlación entre las variantes de PRL y caracteres de producción lechera en una familia élite de la raza Holstein. Es por esta razón, que hoy en día podría considerarse como un QTL.

Hoj *et al*. (1993) definieron las variantes alélicas de GH con base en la presencia/ausencia de una inserción de aproximadamente 0,9 kb en la región 3´ (polimorfismo I/D) y al sitio de restricción polimórfico *MspI* ubicado en el exón 3 de este gen. Estos autores agruparon bovinos pertenecientes a las razas Red Danish y Norwegian Red en dos grupos, según fuera alta o baja la producción de grasa en leche. A partir de la tipificación de estos animales se evidenciaron diferencias significativas en las frecuencias del haplotipo D/ *MspI*(-) entre ambos grupos. Este resultado estaría indicando que la selección sobre el carácter grasa en leche habría incrementado las frecuencias de los alelos D y *MspI(-)*.

Lee *et al*. (1996), estudiaron el sitio de restricción polimórfico A*lu*I (exón 5) mediante la técnica de PCR-RFLP.

Dicha metodología se utilizó para analizar dos rebaños de la raza Holstein, uno seleccionado y otro control. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre las frecuencias génicas de ambos grupos. Por otra parte, la asociación entre los diferentes genotipos de A*lu*I y producción lechera, evidenció que el genotipo A*lu*I-/- estaba asociado con una disminución en el valor de cría para la producción lechera en el rebaño seleccionado, mientras que no se encontró correlación en el grupo control.

Yao *et al.* (1996) detectaron en toros Holstein, a través de la técnica de SSCP, dos polimorfismos en el gen GH dados por una transición T→C en el tercer intrón (GH4.1) y una transversión A→C en el tercer exón (GH6.2). Estas variantes se asociaron con caracteres de producción, ya que los toros $GH4.1^c/GH4.1^c$ evidenciaron una mayor producción de leche, grasa y proteínas, con respecto a los toros con genotipos $GH4.1^c/ GH4.1^t$ y $GH4.1^t/ GH4.1^t$. Efectos similares sobre los caracteres de producción lechera se observaron para el polimorfismo GH6.2, siendo el alelo $GH6.2^a$ el más favorable.

Los bovinos de carne, que en Colombia representan más del 60% de la población total de vacunos, también han sido objeto de estudio por parte de la genética molecular; genes polimórficos asociados a características de producción y calidad del producto cárnico han sido detectados y estudiados con profundidad.

En bovinos de carne se ha explotado la posibilidad de utilización de cruzamientos mediante poblaciones (razas) de

subespecies diferentes, como los que se han realizado entre razas de *Bos taurus taurus* y razas de *B. t. indicus*, y se han identificado numerosos QTLs que afectan a los caracteres más importantes de crecimiento, rendimiento a la canal o caracteres relacionados como el área del *Longissimus dorsi*, reproductivos, o caracteres morfométricos y, en menor medida, se han localizado QTLs sobre caracteres de comportamiento o patologías.

Los QTLs también pueden ser identificados explotando la variabilidad existente dentro de las razas o líneas y para ello se usan diversos diseños que sacan provecho del desequilibrio de ligamiento dentro de la población.

En bovinos de carne, sólo en raras ocasiones ha sido utilizado el diseño de medias hermanas; un ejemplo es el de la raza Japonesa Negra o Wagyu (Mizoshita *et al.,* 2004).

Por esta razón, las estrategias para reducir esta variabilidad apuntan a aumentar la potencia del análisis. Entre estas estrategias, además de las tradicionales como las medidas repetidas y el uso de familias grandes, se han desarrollado otras más específicas para este tipo de análisis como el genotipado selectivo (Darvasi y Soller, 1992), que consiste en elegir a los individuos que aparecen en ambos extremos de la distribución fenotípica de una variable, o la utilización de lotes de ADN junto con genotipado selectivo (Darvasi y Soller, 1994; Baro *et al.,* 2001).

La disponibilidad de numerosos marcadores fuertemente asociados (elevado desequilibrio de ligamiento) con

mutaciones funcionales que existe en los bovinos de carne hacen más fácil su aplicación directa en programas de MAS (Moore *et al.,* 2003; Kneeland *et al.,* 2004; Li *et al.,* 2004). Varias mutaciones puntuales (SNPs) han sido identificadas en genes como la μ-calpain (*CAPN1*), la calpastatina (*CAST*) o la lysil oxydasa (*LOX*) y asociadas con la terneza de la carne (Page *et al.,* 2002; Barendse, 2002), una de las variables con mayor impacto económico.

Mutaciones puntuales han sido también descritas en genes como thyroglobulin (*TG*), precursor de dos hormonas tiroideas implicadas en procesos del desarrollo de los adipositos (Barendse, 1999), el *retinoid related orphan receptor C* (*RORC*) (Barendse, 2004), o el *DGAT1* (Fries y Winter, 2004) todos ellos implicados en el grado de vetado de la carne. Otras mutaciones puntuales en el gen que codifica para la leptina (*LEP*) han mostrado una significativa asociación con la capacidad para el engrasamiento.

Avances en el mejoramiento genético por el uso de los marcadores moleculares

La incorporación de la información que proporcionan los avances en genómica en los programas de mejoramiento animal comienza a ser una realidad en especies de abasto como los porcinos (Andersson *et al.,* 1994) y los bovinos de carne y de leche; tal incorporación se lleva a cabo mediante herramientas de genética cuantitativa, lo cual se denomina de forma genérica 'selección asistida por marcadores' (MAS por *Marker Assisted Selection*) (Dekkers, 2004). Ésta puede

ser aplicada para aumentar la velocidad del progreso genético en programas de selección dentro de poblaciones o para explotar la variabilidad genética entre poblaciones en programas de cruzamiento o de introgresión.

Los programas tradicionales de selección se basan en el uso de medidas fenotípicas registradas en el propio individuo candidato a selección o en parientes suyos, con las que se predice su mérito genético para una o varias características.

En la medida que exista la posibilidad de registrar con un costo bajo, fenotipos en el propio candidato a selección, que estos fenotipos puedan ser obtenidos pronto en la vida del animal y constituyan un buen reflejo de su mérito genético (h^2 elevada), se entenderá que la utilización de información adicional, como son los marcadores genéticos, tendrán un escaso impacto en el progreso genético. Por el contrario, cuando los caracteres de interés manifiestan heredabilidades bajas, sean el resultado de acciones génicas no aditivas o de interacciones epistáticas, se registren tarde en la vida del animal o después de su sacrificio (caracteres de canal y calidad de carne), sean costosos de medir o sólo se puedan medir en uno de los dos sexos (caracteres lecheros), la posibilidad de utilizar marcadores de ADN puede representar una alternativa de gran interés para aumentar el progreso genético por unidad de tiempo (Lande y Thompson, 1990).

La razón de la ganancia genética (G) por unidad de tiempo, expresada en unidades de desviación típica genética, es la siguiente:

$$\Delta G = \frac{i * r}{l}$$

donde,

i : la intensidad de selección medida como la diferencia estandarizada entre la media fenotípica de los animales seleccionados y la media de la población.

r : la precisión con la que conocemos el mérito genético del candidato a selección.

l : el intervalo entre generaciones medido, por ejemplo, como la edad media de los padres cuando nacen los hijos que van a sustituirlos.

Estas tres variables de las que depende el progreso genético pueden verse favorecidas por la utilización de MAS. Se esperaría el incremento de la intensidad de selección ante el aumento del tamaño de la población candidata a selección, de tal forma que si el número de reproductores que se requieren para reposición constituye un valor fijo, el aumento del número de candidatos implica una mayor intensidad de selección. La precisión de selección (r) también puede incrementarse si la información disponible para conocer el mérito genético de un animal aumenta al incorporar los registros moleculares.

Finalmente, la posibilidad de combinar la utilización de información molecular con técnicas sofisticadas de reproducción asistida puede permitir una drástica reducción

del intervalo entre generaciones. Un ejemplo extremo planteado ya hace más de 15 años bajo el nombre de 'velogenética' (combinación de MAS y la manipulación de la línea germinal) es ilustrado por Georges y Massey (1991) cuando proponen la recolección de ovocitos directamente del ovario de una ternera cuando todavía no ha nacido. Estos ovocitos serían madurados y fertilizados *in vitro* y seleccionados mediante la utilización de información molecular antes de ser transferidos a una hembra receptora. El intervalo generacional se verá reducido ampliamente.

Una estrategia diferente, y que ha recibido gran atención (Smith, 1967; Soller y Beckman, 1988), es la selección basada en dos etapas: en la primera se selecciona utilizando la información molecular y en la segunda la información fenotípica.

Lande y Thompson (1990) proporcionan expresiones para calcular la eficiencia relativa de la MAS respecto a la selección basada únicamente en fenotipos cuando se utiliza información individual en diferentes supuestos, como ocurre cuando los fenotipos se limitan a un único sexo o cuando se practica selección en dos etapas: en la primera se utiliza sólo información molecular y en la segunda únicamente información fenotípica.

En ambos casos, a medida que la heredabilidad aumenta, se reduce la eficiencia relativa de MAS para una misma proporción de carácter explicado por el marcador. Así mismo, cuanto mayor es la proporción de variabilidad del carácter

explicada por el marcador mayor es la eficiencia relativa de MAS para un mismo valor de h^2. La información molecular puede ser incorporada, junto con el resto de información fenotípica, en un índice clásico de selección (Hazel, 1943) de la forma:

$$I = b_f X_f + b_m X_m$$

Donde:

Xf y *Xm*: es la información fenotípica y el valor molecular respectivamente que hay disponible para cada uno de los candidatos a selección.

bf y *bm*: son las ponderaciones de las fuentes de información fenotípica y molecular respectivamente, cuyo cálculo se hace de forma que se maximice el progreso genético.

La información molecular puede también incorporarse a las ecuaciones del modelo mixto (Fernando y Grossman, 1989):

$$y = Zu + Qq + e$$

Donde:

y : vector de fenotipos registrados.

u : vector de efectos poligénicos.

q : vector de efectos de los marcadores.

Así, el mérito genético estimado de un individuo *i* (*gi*), utilizando la información molecular y la información fenotípica, será:

$$g_i = u_i + g_{ip} + g_{im}$$

Donde:
gip y *gim*: los efectos de los alelos paterno y materno heredados por el animal *i*.

Por tanto, la selección puede practicarse utilizando como criterio un valor global que incluye, tanto el valor genético debido a los marcadores, como el debido al efecto de los genes.

Es importante señalar que, aunque se ha hecho referencia a trabajos en los que se indica la existencia de asociación, otras publicaciones manifiestan la ausencia de éxito cuando han tratado de validar la existencia de esa asociación en poblaciones diferentes. Así, por ejemplo, Casas *et al*. (2005) no lograron encontrar asociación entre el gen *TG* y el grado de veteado, Moore *et al*. (2003) tampoco hallaron asociación entre el gen *DGAT1* y el grado de engrasamiento de la canal, y Nkrumah *et al*. (2004) no encontraron asociación entre las mutaciones descritas en el gen *LEP* y la capacidad de engrasamiento del animal. Posiblemente lo que estén indicando estos resultados es que se trataría del segundo tipo de marcadores antes mencionados, es decir, mutaciones que están en desequilibrio de ligamiento con la mutación funcional.

La tercera categoría de marcadores, aquellos a los que hemos llamado 'marcadores directos', hacen posible lo

que se denomina 'selección asistida por genes' (GAS por *Gene Assisted Selection*); en principio, su aplicación es relativamente sencilla desde el momento en que se conoce exactamente la mutación funcional y el efecto que tiene sobre los caracteres.

Una de las aplicaciones de la GAS, que puede parecer practicable, es la introgresión asistida por marcadores. La introgresión genética se refiere al hecho de introducir en una población genes de otra población diferente. Este fenómeno puede perseguir el objetivo de incorporar un único gen de interés en esa población o, en el otro extremo, puede ser utilizado para sustituir una población por otra (cruzamiento por absorción). Aunque la posibilidad de disponer de marcadores de aquellos genes de interés que se desean introducir en una población facilita el proceso de introgresión, los elevados costos derivados de los intervalos prolongados entre generaciones y con más frecuencia, la reticencia de los criadores de una determinada raza a introducir genomas provenientes de otras, no hacen muy extensa la lista de ejemplos de introgresión asistida por marcadores, limitándose a ejemplos en los genes que se incorporan tienen un efecto grande.

Por citar dos ejemplos, uno en porcinos cuando se introdujo el alelo normal del gen *Hal* en la raza Pietrain (Hanset *et al.,* 1995), y el otro se refiere a la introducción en ovinos del gen *FecB* (Booroola) en una raza de aptitud lechera (Gootwine *et al.,* 1998). Curiosamente no se tiene referencia de ningún programa de introgresión del gen de la

miostatina en razas bovinas a pesar de su enorme influencia sobre gran número de caracteres de interés en esta especie, sobre todo en caracteres relacionados con la calidad de carne y la canal.

REFERENCIAS

Andersson, L., Haley, C.S., Ellegren, H., Knott, S.A., Johansson, M., Hansson, I., Hakansson, J. Y Lundstrom, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth y fatness in the pig. Science 263:1771.

Aleandri, R., G. Buttazzoni, J. C. Schneider, A. Caroli Y R. Davoll 1990. The effects of milk protein polymorphism on milk components y cheese-producing ability. J. Dairy. Sci. 73 : 241.

Andersson-Eklund, L. Y J. Rendel. 1993. Linkage between amylase-1 locus y a major gene for milk fat content in cattle. Animal Genetics 24 : 101 - 103.

Aschaffenburg, R. 1965. Variants of milk proteins y their pattern of inheritance. J. Dairy Sci. 128 - 132.

Aravec.W.,R.C. Lamb Y H.C. Hines. 1971. Blood y milk protein polymorphisms in relation to leed effiency y production traits of dairy cattle. J. Dairy Sci. 54 : 106-112.

Bech, A. M. Y K. R. Kristiansen. 1990. Milk protein polymorphisms in Danish dairy cattle y the influence of genetic variants on milk yield. T. Dairy Res. 57 : 53.

Boland, M.J., J.P Hill Y L.K. Creamer. 1992. Genetic manipulation of milk proteins & its consequences for the dairy industry. Australian Biotechnology 2(6) : 355 - 360.

Brum, E.W., W.H. Rausch, H.C. Hines Y T.M. Ludwick. 1967. Association between milk y blood polymorphism types y lactation traits of Holstein cattle. J. Dairy Sci. 51(7) :1031 - 1038.

Barendse, W.J. 1999. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248. En: http:// ep.espacenet.com; consulta: junio 2008.

Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meta tenderness. Patent WO02064820. En:http://ep.espacenet.com; consulta: junio 2008.

Barendse, W.J. 2004. DNA markers for marbling. Patent WO2004070055. En: http:// ep.espacenet.com; consulta: junio 2008.

Baro, J.A., Carleos, C., Corral, N., López, T. Y Cañón, J. 2001. Power analysis of QTL detection in half-sib families using selective DNA pooling. Genet. Sel. Evol. 33: 231- 248.

Casas, E., White, S.N., Riley, D.G., Smith, T.P.L., Brenneman, R.A., Olson, T.A., Johnson, D.D., Coleman, S.W., Bennett, G.L. Y Chase, C.C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosome 14 y 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. J. Anim. Sci. 83: 13-19.

Cowan, C.M.; M.R. Dentine, R.L. Ax,. Y L.A. Scchuler. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with growth hormone y prolactin genes in Holstein bulls: evidence for e novel growth hormone allele. Animal Genetics 20 : 157 -165.

Cowan, C. M., M. R. Dentine Y T. Coyle. 1992. Chromosome substitution effects associated with -casein y -lactoglobulin in Holstein cattle. J. Dairy Sci. 75 : 1097 - 1104.

Darvasi, A. Y Soller, M. 1992. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus y a quantitative trait locus. Theor. Appl. Genet. 85: 353- 359.

Darvasi, A. Y Soller, M. 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker y a quantitative trait locus. Genetics 138:1365-1373.

Dekkers, J.C.M. 2004. Commercial application of marker y gene assisted selection in livestock: strategies y lessons. J. Anim. Sci. 82 (Suppl): E313-E328.

Denicourt, D., M.P. Sabour Y A.L Mcallister. 1990. Detection of bovine k-casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. Animal Genetics 21: 215-216.

Eigel, W. N, J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrel Jr.,V. R. Harwalkar, R. Jennes Y R. Mcl. Whitney. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk : Fifth revision. J. Dairy Sci. 67: 1599-1631

Feagan, J. T., L. F. Bailey, A. F. Mclean, D. M. Ellis Y N. J. S. Ellis. 1972. Coagulation of milk proteins. 1. Effect of genetic variants of milk proteins on milk rennet coagulation y heat stability of normal milk. Aust. J. Dairy Technol. 27: 129.

Frapin, D., E. Dufour Y T. Haertle. 1993. Probing the fatty acid binding site of -lactoglobulins. J. Protein Chem. 12 : 443.

Fries, H.R. Y Winter A., 2004. Methods of testing a mammal for its predisposition for fat content of milk and/or its predisposition for meta marbling. Patent WO20040234986. En: http://ep.espacenet.com; consulta: junio 2008.

Georges, M. Y Massey, J.M., 1991. Velogenetics or the synergistic use of marker assisted selection y germ-line manipulation. Theriogenol. 25:151-159.

Gootwine, E., Yossefi, S., Zenou, A., Bor, A. 1998. Marker assisted selection for FecB carriers in Booroola Awassi crosses. Proc. 6th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, Australia. pp. 161-164.

Geldermann, H.,U. Piepper Y B. Roth. 1985. Eflects of marked chromosome sections on milk performence in cattle. Theor. Appl. Genet. 70 : 138 - 146.

Gonyon, D.S., R.E. Mather, H.C. Hines, G.F.W. Haenlein, C.W. Arave Y S.N. Grant. 1987. Associations of bovine blood y milk polymorphisms with lactation traits: Holstein. J. Dairy Sci. 70 : 2585 - 2598

Graml, R., G. Weiss, J. Buchberger Y F. Pirchner. 1989. Different rates of synthesis of whey protein y casein by alleles of the beta-lactoglobulin y alpha-s1-casein locus in cattle. Genet. Sel. Evol. 21 : 547.

Hanset, R., Dasnoi, C., Scalais, S., Michaux, C., Grobet, L. 1995. Effets de l'introgression dons le genome Pietrain de l'allele normal aux locus de sensibilite´ a l'halothane. Genet. Select. Evol. 27: 77-88.

Haenlein, G.F.W., D.S. Gonyon, R.E. Mather Y H.C. Hines. 1987. Associations of bovine blood y milk polymorphisms with lactation traits. Guernseys. L Dairy Sci. 70 : 2599 - 2609.

Haley, C. S. 1995. Livestock QTLs-bringing home the bacon?. TIG 11(12) : 488-492.

Hoj, S., M. Fredholm, N. Larsen Y V.H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. Animal Genetics 24 : 91-96.

Jadot, M., J.Laloux, A.Burny Y R.Kettmann. 1992. Detection of bovine -lactoglobulin genomic variants by the polymerase chain reaction method y molecular hybridization. Animal Genetics 23(1) : 77-80.

Kneeland, J., Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Murdoch, B., Hansen, C. Y Moore, S.S. 2004. Identification y fine mapping of quantitative trait loci for growth traits on bovine chromosome 2, 6, 14, 19, 21 y 23 within one comercial line of Bos Taurus. J. Anim. Sci. 82: 3405-3414.

Lande, R. Y Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics 124:743-756.

Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C. Y Moore, S.S. 2004. Identification y fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosome 2, 5, 6, 19, 21 y 23 in a commercial line of *Bos taurus*. J. Anim. Sci. 82: 967-972.

Lee, B.K., G.F. Lin, B.A. Crooker, M.P. Murtaugh, L.B. Hansen Y H. Chester-Jones. 1996. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. Domestic Animal Endocrinology 13(4) : 373-381.

Lewin, H.A., K. Schmitt, R. Hubert, M.J.T. Vaneltk Y N. Arnheim. 1992. Glose linkage between bovine prolactin y BoLA-DRB3 genes: Genetics mapping in cattle by single sperm typing. Genomics 13 : 44-48.

Levéziel, H., L. Méténier, M.F. Mahé, J. Choplain, J.P. Furet, G. Pabeuf, J:C. Mercier Y F. Grosclaude. 1988. Identification of the two common alleles of the bovine - caseín locus by the RFLP technique using the enzyme HindIII. Génét. Sél. Evol. 20(2) : 247-254.

Lin, C.Y, A..J. Mcallister, K.F. Ng-Kwai-Hang Y J.F. Hayes. 1986. Effects of milk protein loci on first lactation in dairy cattle. L Dairy Sci. 69(3) : 704 - 711

Lum L. S., Dovc P. Y L F. Medrano. 1997. Polymorphisms of bovine -lactoglobulin promoter y differences in the binding affinity of activator protein-2 transcripton factor. J. Dairy Sci. 80 : 1389-1397.

Mclean, Dm,E.R.B. Graham, R.W. Ponzoni Y H.A. Mckenzie. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield y composition. J. Dairy Sci. 73 : 2647 - 2656.

Mclean, D. M., E. R. B. Graham Y H.A. Mckenzie. 1982. Estimation of casein composition by gel electrophoresis. 21st Int. Dairy Congr., Moscow 1(2) : 221.

Mclean, D.M. Y J. Schaar. 1989. Effects of -lactoglobulin y -casein genetic variants y concentration on syneresis of gels from renneted heated milk. J. Dairy Research 56 : 296.

Medrano, J.F. Y E. Aguilar-Cordoba. 1990. Genotyping of bovine Kappa-casein following DNA secuence amplification. Biotechnology 8 : 144 - 146.

Mizoshita, K., Watanabe, T., Hayashi, H., Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J. Y Sugimoto, Y. 2004. Quantitative trait loci analysis for growth y carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. J. Anim. Sci. 82: 3145-3420.

Moore, S.S., Li, C., Bassarab, J., Snelling, W.M., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C. Y Benkel, B. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci y assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. J. Anim. Sci. 81: 1919-1925.

Ng-Kwai-Hang, K.F; L F. Mayes, J. E. Moxley Y G. Monardes. 1984. Association of genetic variants of casein y milk serum proteins with milk, fat y ptotein production by dairy cattle. J. Dairy Sci. 67(4) : 835 - 840.

Nkrumah, J.D., Li, C., Basarb, J.B., Guercio, S., Meng, Y., Murdoch, B., Hansen, C. Y Moore, S.S. 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behavior, carcass quality y body composition. Can. J. Anim. Sci. 84: 211-219.

Page, B.T., Casas, E., Heaton, M.P., Cullen, N.G., Hyndman, D.L., Morris, C.A., Crawford, A.M., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Keele, J.W. Y Smith, T.P.L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. J. Anim. Sci. 80: 3077-3085.

Schaar, J. 1981. Casein stability y cheesemaking. Properties of milk; effects of handling, mastitis y genetic variation. Rep. 52. Swed. Univ. Agric. Sci., Uppsala, Sweden.

Schaar, J. 1984. Effects of -casein genetic variants y lactation number on the renneting propeities of individual milks. J. Dairy Research 51 : 397.

Schaar, J. 1985. Effects of genetic variants of -casein y -lactoglobulin on cheese making. J.Dairy Research 52 : 429

Smith, C. 1967. Improvement of metric traits through specific genetic loci. Anim. Prod. 9: 349-358.

Soller, M. Y Beckmann, J.S. 1988. Genomic genetics y the utilization for breeding purposes of genetic variation between populations. En: Weir, B.S., Eisen, E.J., Goodman, E.E. y Namkoong, G. (eds.). Proceedings of the Second International Conference on Quantitative Genetics, Sinauer, Sunderland, Mass. pp. 161-188.

Tong, P. S., S. Vink, N. Y. Farkye Y L F. Medrano. 1993. Effects of genetic variants of mik protein on the yield of Cheddar cheese. Page 179 in Cheese Yield y factors Affecting Its Control Int. Dairy. Fed., Cork, Ireland.

Van Der Berg G., J. T. Escher, P. J. De Koning Y H. Bovenhuis. 1992. Genetic polymorphism of -casein y -lactoglobulin in relation to milk composition y processing properties. Netherl&s Milk & Dairy Journal 46 : 145 - 168.

Van Eemennaam, A. L. Y J. F. Medrano. 1991. Differences of milk proteins expression in the milk heterozygous k-casein cows. J. Dairy Sci. 74 : 1491 - 1496.

Velmala, R., J. Vilkki, K. Elo Y A. Maki-Tanila. 1995. Casein haplotypes y their association with milk production traits in the Finnish Ayshire cattle. Animal Genetics 26 : 419-425.

Wagner, V, T. Schild Y H. Geldermann. 1994. DNA variants within the 5-flanking regions of milk protein genes. II. The -lactoglobulin-encoding gene. Theor. Appl. Genet. 89 : 121

Yao J., S.E Aggrey, D. Zadworny, J.F. Hayes Y U. Kuhnlein. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis y their association with millk production traits in Holsteins. Genetics 144 : 1809 -1816.

Zwiauer, D. 1980. Beziehungen zwischen biochemischen Markergenen und Leistungseigenschaften beim Rind. Foitschr Tierz Züchtungsbiol 2. Parey, Hamburgo Berlin

CAPÍTULO 4

Evolución y diversidad de los Bovidos domésticos

Juan C. Rincón[1],
José Julián Echeverri Zuluaga[2],
Albeiro Lopez-Herrera[3]

[1] Zoot, MSc, PhD(C), Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Estudiante Posgrado en Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

[2] Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

[3] Zoot, MV, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Introducción

En las últimas décadas la biología molecular ha revolucionado diversos campos de la investigación, entre estos la filogenética. Las nuevas tecnologías han sido utilizadas cada vez más constantemente, permitiendo avanzar y comprender de una manera más detallada las relaciones filogenéticas existentes entre y dentro de diferentes organismos, dándonos una idea acerca de su evolución. Los marcadores moleculares y las técnicas que permiten determinar e identificar diferentes polimorfismos al interior del genoma, han permitido determinar la diversidad, el flujo genético, la dispersión y la historia evolutiva de diferentes organismos, así como su grado de similitud entre otras cosas, que permiten dar el primer paso hacia el conocimiento de los recursos genéticos y para la implementación de programas que permitan identificar especies o variedades en riesgo de extinción.

La determinación de las relaciones existentes entre organismos y su diversidad, partiendo solamente de los datos fenotípicos, no explica completamente las posibles relaciones y desafíos a los que se vieron sometidos los organismos en diferentes periodos evolutivos, es por esto que la introducción de información adicional presente en el DNA y proteínas, permitió generar nuevas evidencias del origen evolutivo, de las relaciones y cambios existentes en

diferentes grupos animales con el transcurso de los tiempos. El principal problema de la implementación únicamente de datos fenotípicos para predecir las variaciones genéticas y el origen de los individuos, radica en que hay una fuerte influencia del ambiente sobre la expresión de la mayoría de características fenotípicas, es decir, que el fenotipo usualmente es distante del genotipo que presenta un individuo, por lo tanto las clasificaciones morfológicas puedan tener un sesgo ambiental que no necesariamente explican los procesos evolutivos, sin embargo, la información de relaciones biológicas existentes entre organismos basado únicamente en los datos moleculares, a menudo son muy riesgosas.

La determinación de las relaciones existentes entre y dentro de diferentes organismos de importancia zootécnica ha sido desarrollada mediante diversas técnicas moleculares en diferentes especies y variedades que serán tratadas a lo largo del presente capítulo. Para el entendimiento de las relaciones genéticas, es importante, en primera instancia entender la importancia de los polimorfismos y las técnicas que permiten obtener datos sobre las diferencias al interior del genoma.

Muchas de las técnicas actuales que se utilizan para determinar la diversidad al interior de los genomas animales, pretenden recoger los diferentes cambios progresivos que se han generado por la evolución de los individuos en el planeta tierra, por lo tanto, quieren identificar sitios específicos que permitan la separación de grupos a diferentes escalas de

jerarquía con el fin de identificar las diferencias y relaciones evolutivas que surgieron entre grupos y al interior de grupos evolutivos. Dichas técnicas han pretendido la identificación de diferentes regiones polimórficas al interior del DNA, es así como los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés), los minisatélites y microsatélites, los INDELS, las inversiones y las variaciones en el número de copias (CNV´s) han generado diferentes desafíos en el desarrollo tecnológico para la identificación de estas regiones polimórficas de una manera cada vez mas tecnificadas, eficiente, rápida y económica, de tal manera que es posible la evaluación de poblaciones y grupos cada vez más grandes, con una mayor precisión, con mejores argumentos filogenéticos y poblacionales.

El desarrollo reciente de equipos computacionales cada vez más potentes, ha permitido el análisis de datos cada vez más complejos y grandes, permitiendo dilucidar y resolver los problemas y procedimientos matemáticos propios de los datos resultantes de las investigaciones científicas. Este desarrollo, ha permitido la elaboración de software y equipos tecnológicos en diferentes áreas del conocimiento biológico, lo que ha permitido que los datos a menudo complejos y abundantes que surgen de las poblaciones de organismos en diferentes partes del mundo puedan ser compartidas y analizadas por investigadores y redes interdisciplinarias a lo largo del mundo, esto ha permitido generar en las últimas décadas un avance notable en las herramientas bioinformáticas adecuadas, y ha permitido un gran avance para comprender la magnitud de la diversidad, del flujo

genético, de la dispersión, el origen y la historia evolutiva de diferentes grupos animales.

Constitución genética y fenotipo

Todos los organismos se pueden clasificar de acuerdo a su genotipo y fenotipo, sin embargo, las relaciones existentes entre estos a menudo son muy complejas principalmente por que el fenotipo se ve alterado por una serie de factores genéticos y ambientales que hacen que no haya una correspondencia directa entre la constitución genética y las características observables. Muchas de las variaciones en el fenotipo entre individuos en poblaciones naturales son multifactoriales, por lo tanto no existe una correspondencia directa acorde con la segregación mendeliana y por tanto en muchos casos no se presentan las relaciones mendelianas directas basadas en el fenotipo (Griffiths *et al.,* 1999).

Un ejemplo común para determinar las relaciones existentes entre el genotipo y el fenotipo, es el propuesto en el grupo sanguíneo de humanos, debido a que no siempre es posible afirmar el genotipo de un individuo a partir de su fenotipo y por tanto debe haber un análisis detallado para comprender las verdaderas relaciones existentes entre organismos. De acuerdo a lo anterior, es posible observar en la figura 1, como algunos individuos con tipo de sangre A pueden ser de dos tipo A_O ó AA, y de igual manera con los B, pueden ser B_O ó BB.

Fenotipo (Sangre)	Grupo Sanguíneo A	Grupo sanguíneo B	Grupo sanguíneo AB	Grupo sanguíneo 0
Genotipo (Sangre)	AA A_0	BB B_0	AB	00

Figura 1. Fenotipo y genotipo.

En las últimas décadas el desarrollo de las técnicas en biología molecular que permiten determinar gran cantidad de polimorfismos al interior del DNA y proteínas, ha permitido el desarrollo de trabajos poblacionales con un sesgo mucho menor, lo que ha permitido entender un poco más las dinámicas poblacionales y los comportamientos evolutivos de diferentes organismos (Allan y Max, 2010). Muchos de esos trabajos permitieron medir y entender de una manera cada vez más detallada, los diferentes mecanismos por los cuales la variación genética es mantenida de una generación a otra y predecir modelos que permitan identificar la pérdida de diversidad como punto clave en la identificación de poblaciones en riesgo de extinción.

La posibilidad de encontrar marcadores moleculares polimórficos permitió el desarrollo de métodos menos sesgados para el estudio de la variación genética, aunque separó un poco el interés sobre las complejas relaciones entre el genotipo y el fenotipo y distrajo la atención para el

desarrollo de trabajos que involucraran ambos conceptos con el fin de identificar las verdaderas relaciones evolutivas y las dinámicas poblaciones entre organismos.

Múltiples técnicas han sido desarrolladas para la identificación de polimorfismos al interior del DNA y las proteínas, entre estas técnicas se encuentran la electroforesis y sus diferentes adaptaciones o modificaciones, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), el uso de enzimas de restricción, los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de los amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés), la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD´s, por sus siglas en inglés), el Southern blot, los microarreglos y la secuenciación. Estas técnicas permiten identificar diferentes zonas polimórficas y la identificación de diferentes marcadores moleculares con diferente información polimórfica (Allan y Max, 2010) (Figura 2).

Las tecnologías de DNA han sido ampliamente usadas debido principalmente a que la información polimórfica de este, presenta más información sobre la variación genética que las proteínas, debido a que los polimorfismos de nucleótidos son detectados incluso si los polimorfismos son sinónimos o están en regiones no codificantes (Becerra y Paredes, 2000).

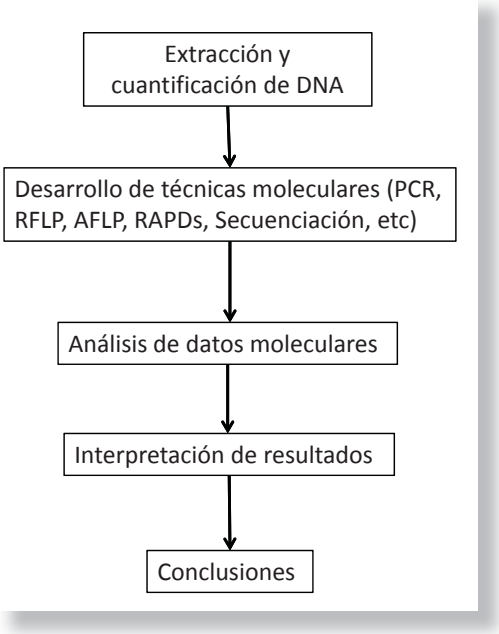

Figura 2. Pasos a seguir para la obtención de datos moleculares para el análisis de diversidad y relaciones evolutivas.

Obtención del DNA

En la actualidad hay muchos métodos y kits comerciales que permiten la extracción de DNA a partir de tejido, sangre, semen, pelo, saliva, leche, entre otros recursos. En los últimos años los kits y métodos de extracción son cada vez mas económicos y permiten obtener DNA de mejor calidad y en poco tiempo. A partir de este DNA, usando diferentes tecnologías, se puede hacer un seguimiento sobre marcadores genéticos presentes en las poblaciones de individuos. Debido a que el material genético es transmitido de los padres a su descendencia, es posible a partir de los marcadores

moleculares inferir sobre las relaciones genéticas presentes entre individuos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no todo el DNA es heredado de la misma manera y en algunos casos es pertinente conocer los diferentes modos de herencia con el fin de interpretar diferentes escenarios evolutivos (Echeverri *et al.,* 2011).

Los organismos que se reproducen sexualmente heredan aproximadamente la mitad del material genético de cada uno de sus parentales, esto es conocido como herencia biparental, sin embargo, en los animales superiores que se reproducen sexualmente no presentan una herencia total de su DNA por mitades de ambos padres. Es el caso de la herencia del genoma mitocondrial, que presenta herencia uniparental y todo el material genético mitocondrial encontrado al interior de las células presenta herencia materna (Freeland *et al.,* 2005) (Figura 3).

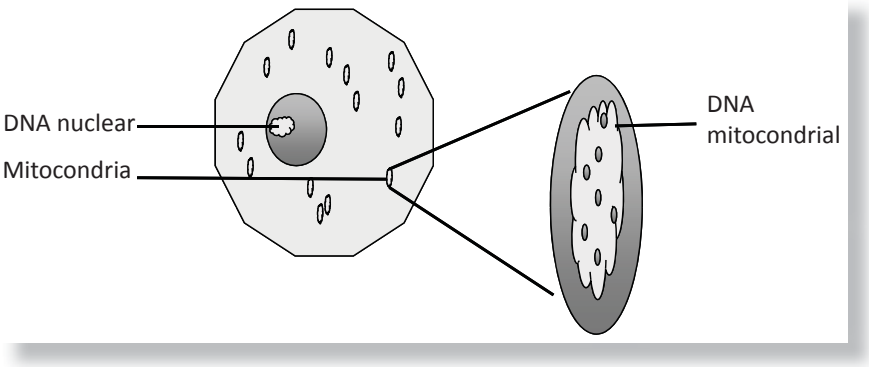

Figura 3. Información genética en una células eucariota. La mayor cantidad de información genética de la célula se encuentra en el núcleo que presenta herencia biparental, sin embargo existe información genética en el DNA mitocondrial que presenta herencia uniparental.

-Información del DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial contiene entre otras cosas, la información para la respiración celular. El material genético mitocondrial codifica para 13 proteínas, 22 tRNA y 2 rRNA´s. La estructura, el tamaño y el arreglo de los genes mitocondriales son relativamente conservados entre diferentes animales, aunque en algunos casos se han encontrado diferentes re-arreglos en algunas especies animales (Freeland, 2005).

Los marcadores genéticos mitocondriales presentan importancia en el estudio genéticos poblacionales en animales, debido a que estos son relativamente fáciles de manejar, son de tamaño pequeño, haploides, presentan altas tasas de mutación (Brown *et al.,* 1982) y presentan un arreglo conservado en la mayoría de los animales, por lo tanto, es posible usar muchos cebadores universales para amplificar regiones mitocondriales incluso en especies en las que se conoce muy poco de su información genética, revelando diferentes linajes genéticos dentro y entre poblaciones. Una característica adicional que confiere importancia en los estudios de diversidad y de poblaciones es la falta de recombinación en el DNA mitocondrial, generando un patrón esperado igual entre la madre y su descendencia, lo cual confiere información de gran importancia en estudios de filogeografía y filogenia (Ferris *et al.,* 1983).

En la actualidad es bien sabido que algunos animales presentan herencia mitocondrial paterna o herencia biparental, condición conocida como heteroplasmia

(Lightowlers *et al.,* 1997), sin embargo, la mayoría de animales domésticos presentan casi exclusivamente herencia mitocondrial materna, por lo que lo marcadores mitocondriales proveen información adicional de eventos evolutivos ocurridos en las diferentes poblaciones.

-Información del DNA nuclear

La herencia del DNA nuclear, se entiende usualmente como genes y regiones que se heredan biparentalmente, debido a la reproducción sexual. Este tipo de información genética es comúnmente estudiada y evidencia una gran parte de la diversidad presente entre los organismos, debido a que esta información nuclear es mucho mas grande en proporción a la información presente en las organelas (Li, 1997). Sin embargo, los cromosomas sexuales representan una excepción a la regla, debido a que existe un cromosoma que determina el sexo en los mamíferos, aunque en las aves, y algunos reptiles no existe la determinación genética del sexo, sino que dicha determinación es ambiental (Hurles y Jobling, 2001).

En los mamíferos las hembras son homogaméticas y los machos heterogaméticos, es decir, que los machos tienen copias diferentes del cromosoma sexual, el X y el Y, por el contrario la hembras presentan los cromosoma XX. Teniendo en cuenta lo anterior, todas las hembras transmiten a su descendencia un cromosoma sexual X, mientras que los machos pueden transmitir un X o un Y y por lo tanto determinar el sexo. Debido a que el cromosoma Y se presenta sólo en machos en una sola copia, este cromosoma se considera haploide, sin

embargo hay unas pequeñas regiones de recombinación con el cromosoma X, aunque la mayoría constituye regiones no recombinantes (Hurles y Jobling, 2001).

Las mutaciones en el cromosoma Y son relativamente bajas, incluso se han reportado regiones de mutación varias veces más bajas que las regiones autosómicas (Shen *et al.,* 2000), estos bajos niveles de mutación representan una herramienta potencial en la identificación de marcadores moleculares para obtener información acerca de la herencia paterna y potencialmente podría aportar información similar a la obtenida con la herencia mitocondrial materna (Hellborg y Ellegren, 2004).

Marcadores Moleculares dominantes y co-dominantes

En organismos diploides es fácil encontrar organismos homocigotos que presentan un solo tipo de alelo específico (Por ejemplo AA), mientras que lo organismos heterocigotos presentan dos alelos diferentes para el mismo locus (por ejemplo AB). La posibilidad de poder distinguir entre individuos homocigotos de los heterocigotos es la característica que comparten todos lo marcadores co-dominantes. Por su parte los llamados marcadores dominantes aunque pueden representar la diversidad presente en una población dada o entre poblaciones, esta no permite determinar los individuos como homocigotos o heterocigotos, diferencialmente (Freeland, 2005) (Figura 4).

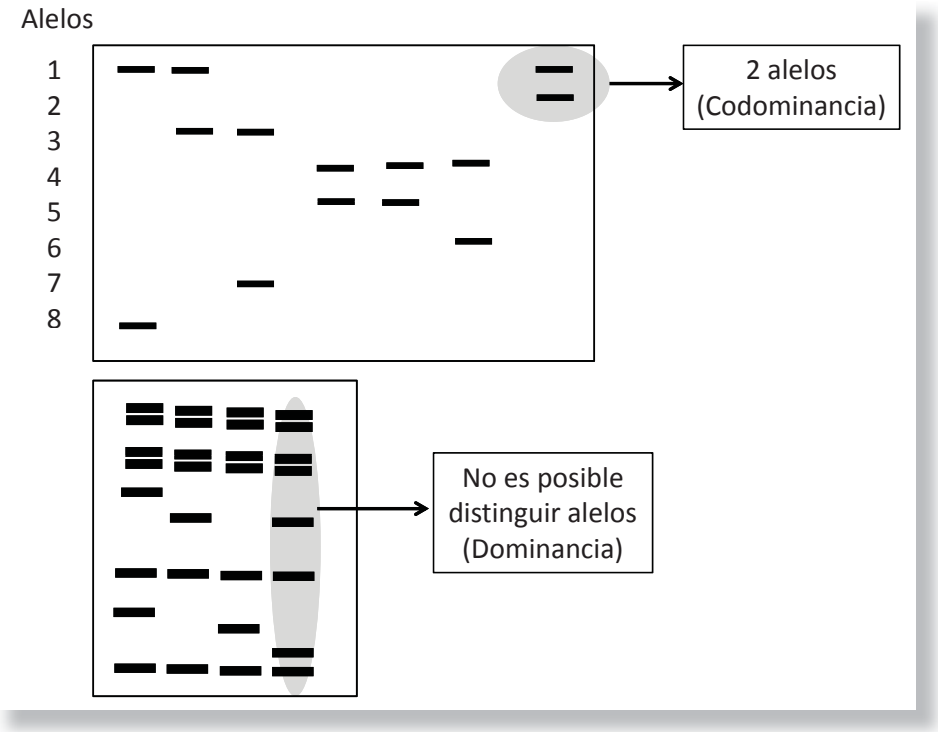

Figura 4. Electroforesis en gel para un marcador co-dominante (Minisatélites) y un marcador dominante RAPD

Los marcadores co-dominantes corresponden comúnmente a un solo locus, pero las pruebas de diversidad y de poblaciones que involucran marcadores co-dominantes a menudo utilizan marcadores en múltiples locus, con el fin de obtener la mayor información posible acerca del organismos específico. Por otra parte, los marcadores dominantes son marcadores que generan datos de varios locus simultáneamente y por esto son reconocidos también como marcadores multi-locus. Ambos marcadores han sido usados exitosamente en la determinación de la diversidad en diferentes organismos (Freeland, 2005).

Diversidad

La diversidad genética es una de las características mas importantes que presentan las poblaciones, teniendo en cuenta que estas se encuentran en un ambiente susceptible a constantes cambios, donde la diversidad otorga una cualidad a las poblaciones para poder adaptarse a los diferentes cambios ambientales que se presenta con el transcurrir de los tiempos.

La diversidad también permite a las poblaciones disminuir la posibilidad de entrecruzamiento y endogamia, lo cual reduciría su capacidad de desempeño y adaptación frente a un medio ambiente cambiante y dinámico (Freeland, 2005). Debido a todo esto, la evaluación de la diversidad genética en las poblaciones es de gran importancia en los estudios sobre diferentes organismos, debido a que permiten identificar los recursos genéticos con los que se cuentan y adicionalmente desarrollar planes de conservación biológica.

Existen varias medidas poblacionales de importancia para determinar la diversidad genética. Una de las medidas mas utilizadas en las investigaciones científicas son la heterocigosidad observada y la esperada (Ho y He), la comparación de estas dos, genera un indicio acerca de la diversidad en una población específica y permite inferir algunas cosas sobre la dinámica poblacional (Hartl y Clark, 2007).

Cuando se determina la diversidad de un organismo o población específica, es importante tener en cuenta que la

diversidad puede variar de acuerdo al tipo de marcador molecular que se elige y al número de marcadores empleados para realizar el análisis. Esta variación se debe a las diferentes tasas de mutación que presentan los marcadores moleculares, es así como es mas probable que se presente una mutación para generar un microsatélite diferente a que se presente una mutación para generar un SNP específico. Otra posible causa es cuando se utilizan marcadores mitocondriales, debido no sólo a la tasa de mutación del genoma mitocondrial, sino también por el tamaño total del genoma y el tipo de herencia, por lo tanto, es común encontrar que algunos hallazgos de diversidad sean diferentes de acuerdo a los marcadores empleados y a la cantidad de estos (Li, 1997).

La diversidad genética es influenciada por diferentes factores como la deriva genética, la migración, los cuellos de botella, el efecto fundador, las mutaciones, la selección natural, los métodos de reproducción, entre otros (figura 5), todos estos factores pueden afectar el desarrollo y la diversidad genética en las poblaciones, sin embargo, muchos de estos son ampliamente conocidos y no se mencionaran en el presente capítulo (Hartl y Clark, 2007).

Las poblaciones genéticas se encuentran influenciadas por procesos inter e intrapoblacionales, por lo tanto es importante en la dinámica de poblaciones determinar el flujo genético y las relaciones poblacionales para comprender los procesos evolutivos.

Figura 5. Factores que afectan la diversidad genética.

Subdivisión poblacional

La mayoría de poblaciones presentan un nivel de diferenciación genética, es decir, que algunas poblaciones presentan un rango de diferenciación entre ellas y por tanto no se comportan como una única población. Muchas metodologías han sido desarrolladas con el fin de determinar el flujo genético y las subdivisiones poblacionales, entre estas se encuentran las distancias genéticas y los estadísticos F de Wright (1969).

Distancias genéticas

Las distancias genéticas constituyen medidas por las cuales se determina la diferencia entre poblaciones. Múltiples planteamientos han sido logrados con el fin de determinar la

similitud entre las poblaciones, muchas de ellas basadas en la ecología de especies particulares, sin embargo, una de las medidas más utilizadas en animales a lo largo del tiempo es la distancia genética de Nei (1972), para calcular esta, primero se debe determinar el índice de identidad genética, el cual refleja la similitud de las poblaciones. Las distancias genéticas a menudo se representan de múltiples maneras, pero es común encontrarlas en diagramas, en arboles ó en cuadros pareados.

Algunas otras medidas han sido evaluadas en animales domésticos basados en la similitud entre poblaciones, sin embargo, uno de los métodos más utilizados a lo largo del tiempo es el método propuesto por Wright para determinar la estructuración genética en las poblaciones (Freeland, 2005).

Estructura de poblaciones, estadísticos F de Wright

Uno de los métodos más utilizados para determinar la diferenciación genética entre poblaciones fue el propuesto por el genetista estadunidense Sewall Wright (1951). Dicho método usa el coeficiente de entrecruzamiento para dividir la variación genética en y entre poblaciones, lo que permite determinar en última instancia la estructuración poblacional, teniendo en cuenta que la base para el flujo genético es el modelo de islas infinitas, en el cual se asume entre otras cosas un equilibrio entre migración y deriva genética entre todas las poblaciones (Figura 6) (Sork *et al.,* 1999).

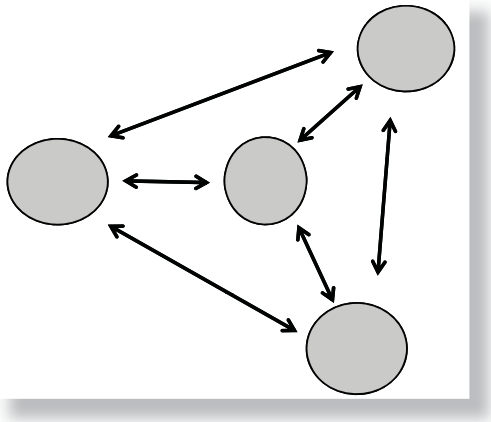

Figura 6. Modelo de islas infinitas. Este modelo asume equilibrio entre migración y deriva génica entre todas las poblaciones, es decir que hay igual intercambio génico entre las diferentes poblaciones.

La partición de la variación fue tomada por medio de tres estadísticos principalmente, aunque posteriormente se pudieron realizar particiones adicionales de la variación al interior de cada población específica. Uno de estos estadísticos fue el F_{IS}, el cual mide el grado de entrecruzamiento entre los individuos con respecto a su subpoblación. Esto refleja la probabilidad de que dos alelos en el mismo individuo de la subpoblación sean idénticos por descendencia. El segundo estadístico es el F_{ST}, el cual se conoce como índice de fijación y permite determinar la diferenciación genética entre subpoblaciones, ya que evidencia la medida de entrecruzamiento de las subpoblaciones con respecto a la población total y refleja la probabilidad de que dos alelos tomados aleatoriamente de una subpoblación sean idénticos por descendencia. El tercer estadístico es el F_{IT}, que constituye el coeficiente de entrecruzamiento para un

individuo por medio de la heterocigosidad de un individuo relativo en la población total (Hartl y Clark, 2007).

Algunas subdivisiones al interior de las poblaciones han sido propuestas en diferentes artículos investigativos, es así como es posible encontrar jerarquías al interior de las poblaciones que parten de una población total, seguidos de regiones, posteriormente subpoblaciones, para finalmente llegar al individuo, de esta manera surgen estadísticos adicionales como los F_{RT} y los F_{IR}, los cuales presentan una interpretación similar a F_{ST} y F_{IS} pero a una escala jerárquica diferente.

Uno de los estadísticos mas importantes en la determinación de la estructura de las poblaciones es el F_{ST}, debido a que permite determinar que poblaciones se comportan como una sola y cuales hacen parte o se comportan como poblaciones separadas y aisladas. Teniendo en cuenta lo anterior, es importante mencionar que cuando las subpoblaciones no se encuentran diferenciadas, la magnitud del F_{ST} será cero ó cercana a cero, y a medida que las poblaciones sean mas diferenciadas, la magnitud del estadístico F_{ST} será cercana a 1, lo cual indicaría en el caso de ser uno, que ambas poblaciones presentan alelos fijados contrarios (Hartl y Clark, 2007).

Finalmente, vale la pena mencionar que existen algunos métodos análogos basados en el método de Wright que permiten determinar la estructuración poblacional, pero que presentan algunas variaciones con respecto al

método original, debido a que en algunos casos se asumen algunas cosas adicionales y a menudo son específicos para marcadores particulares. Entre estos métodos se encuentra el G_{ST} propuesto por Nei (1973), este estadístico es similar al F_{ST}, pero en este caso se utiliza cuando hay sólo dos alelos por locus, en el caso de alelos múltiples, G_{ST} equivale a $F_{ST.}$ Un estadístico similar constituye θ (Weir y Cockerham, 1984) el cual tiene en cuenta el tamaño muestral y el número de poblaciones muestreadas. Adicionalmente, existe el estadístico R_{ST}, desarrollado por Slatkin (1995), especialmente para el análisis de microsatélites debido a que asume el modelo de mutación por pasos.

Todos los modelos constituyen un acercamiento matemático para determinar la estructuración existente entre las poblaciones encontradas natural y artificialmente, por lo tanto, dichos métodos presentan una interpretación similar y un argumento teórico parecido al método originalmente propuesto por Wright (1951).

Partiendo de las medidas de diversidad y de los métodos de diferenciación poblacional es posible entrar a un nuevo campo que involucra la representación gráfica de las relaciones existentes entre poblaciones, entre razas, biotipos, líneas genéticas y especies, dicha área, involucra el uso de una serie de métodos adicionales y elaboraciones matemáticas que permiten comprender mejor las diferentes relaciones existentes en los diferentes niveles.

Árboles Filogenéticos (generalidades)

El DNA en los eucariotas constituye la información genética que posee todos los códigos necesarios para la vida, sin embargo, este DNA también recoge una serie de información evolutiva que nos permite entender la historia y los procesos demográficos que han sufrido diversos organismos (Hartwell *et al.,* 2008). A partir de la teoría de Darwin-Wallace se generan dos campos de investigación sobre la historia evolutiva de los organismos y se despierta el interés por conocer las fuerzas evolutivas que modelan la biodiversidad y sus adaptaciones.

Existen diversas fuerzas evolutivas, entre estas se encuentran la selección natural, las mutaciones, la deriva génica, la migración y la endogamia, y por lo tanto todas se pueden presentar con diferente magnitud sobre las diferentes poblaciones de organismos (Hartl y Clark, 2007).

La determinación de las relaciones evolutivas de diferentes organismos se ha abordado desde diferentes enfoques estadísticos y nos permiten no sólo hablar de las relaciones entre organismos, sino también sobre el proceso mediante el cual se desarrollaron los diferentes cambios sobre organismos particulares en el pasado (Li, 1997).

-Homología y relaciones genéticas

La homología se puede definir como la relación genética existente entre dos especies o caracteres que conservan un origen común (Petsko, 2001), es decir, que comparten un mismo ancestro y por tanto son producto de un proceso

de divergencia evolutiva. Por otro lado, la Analogía es la relación entre características comunes, pero no a partir de un ancestro común, es decir que existe una relación de convergencia. Lo anterior es importante si se tiene en cuenta que sólo se pueden hacer reconstrucciones filogenéticas a partir de caracteres homólogos (Freeland, 2005).

Las relaciones entre los genes homólogos pueden ser de tres tipos, los parálogos que son los que se encuentran relacionados con un proceso de duplicación génica y por lo tanto pueden estar presentes en una misma especie, aunque no necesariamente se restringe a esto. Los ortólogos, que se encuentran asociados con un proceso de especiación y a menudo se tratan como genes de alta similitud presentes en dos especies diferentes (Jensen, 2001) (figura 7). Finalmente, encontramos los genes Xenólogos, que son productos de un evento de transferencia horizontal.

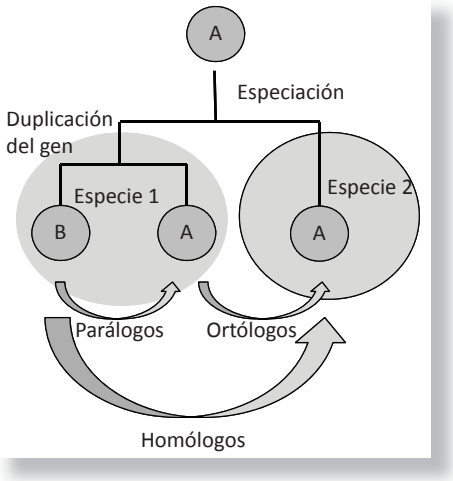

Figura 7. Genes Homólogos: Ortólogos y parálogos.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas existentes entre individuos tienen en cuenta los conceptos utilizados anteriormente, pero además de ellos se tienen en cuenta otros conceptos comúnmente utilizados para distinguir las relaciones existentes entre especies o caracteres en un árbol filogenético. Estas relaciones son las llamadas relaciones monofiléticas, que es cuando todos los organismos han evolucionado a partir de una población ancestral. Existe otro tipo de relaciones, como es el caso de las relaciones polifiléticas, que es cuando los organismos en una rama ó árbol, descienden de varios ancestros diferentes. Finalmente, las relaciones parafiléticas, que consisten en que el árbol o rama incluye el ancestro común de los miembros, pero no incluye a todos los descendientes (Freeland, 2005) (Figura 8).

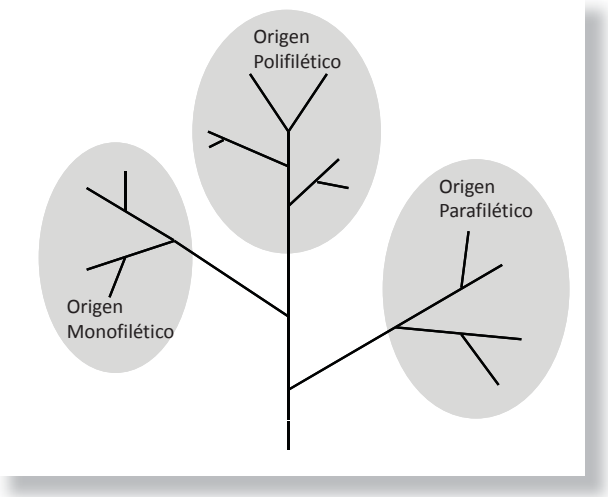

Figura 8. Relaciones filogenéticas.

-Arboles filogenéticos (UPGMA, Neighbor joining, Máxima verosimilitud, Bayesianos)

Un árbol filogenético es un diagrama compuesto por nodos y ramas (Figura 9), que presenta una hipótesis gráfica de las relaciones evolutivas existentes entre caracteres ó especies. Los árboles poseen dos componentes, tasa y tiempo, aunque no todos los árboles reflejan el tiempo evolutivo. Los árboles adicionalmente pueden presentar raíz que indicaría el ancestro común de todos los taxas sobre los que se quiere hacer inferencia. Finalmente, la mayoría presentan nodos internos y nodos externos o terminales, los cuales representan las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) (Baldauf, 2003).

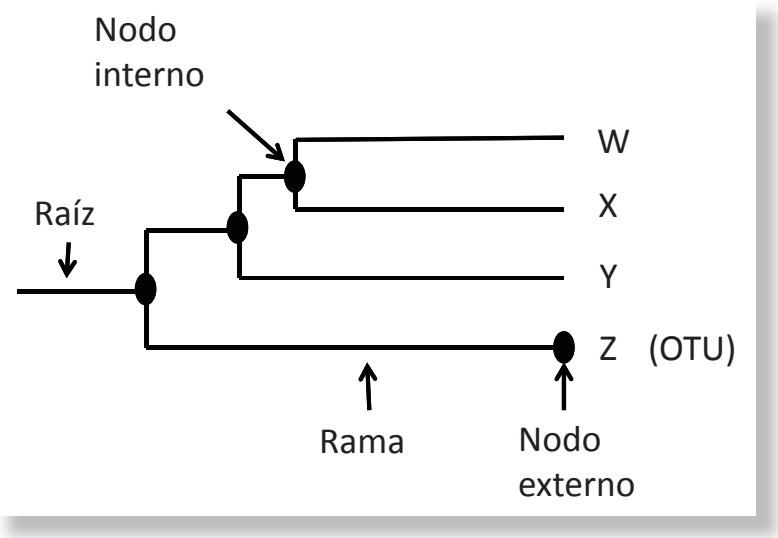

Figura 9. Descripción del árbol filogenético.

Existen básicamente dos tipos de árboles, los árboles de especies, que muestra las relaciones evolutivas presentes entre diferentes especies y por tanto, los nodos siempre se refieren a eventos de especiación (Figura 10), y los árboles de genes, en los cuales se representa la historia de un gen particular y por tanto, los nodos representan eventos de especiación o duplicación de genes (Figura 10).

Los árboles se construyen en base a las relaciones existentes entre las diferentes unidades taxonómicas (OTUs). Dichas relaciones se determinan en términos de similitud, la cual es cuantificada por diferentes métodos que permiten generar una topología basada en las diferencias existentes en los organismos ó genes. La filogenia molecular se basa en las diferencias polimórficas de las secuencias de DNA o en los cambios presentes en diferentes aminoácidos en el caso de las proteínas (Linder y Warnow, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, las relaciones filogenéticas requieren la estimación de las relaciones presentes entre caracteres o individuos, por lo tanto, de acuerdo al método de estimación se pueden obtener diferencias en la conformación y agrupamiento de los OTUs, aunque cuando se cuenta con información suficiente y confiable, es posible obtener topologías muy cercanas usando los diferentes metodologías (Lio y Woldman. 1998).

Existen diferentes tipos de métodos para determinar la topología y la distancia genética entre organismos o caracteres, entre estos se encuentran los métodos basados

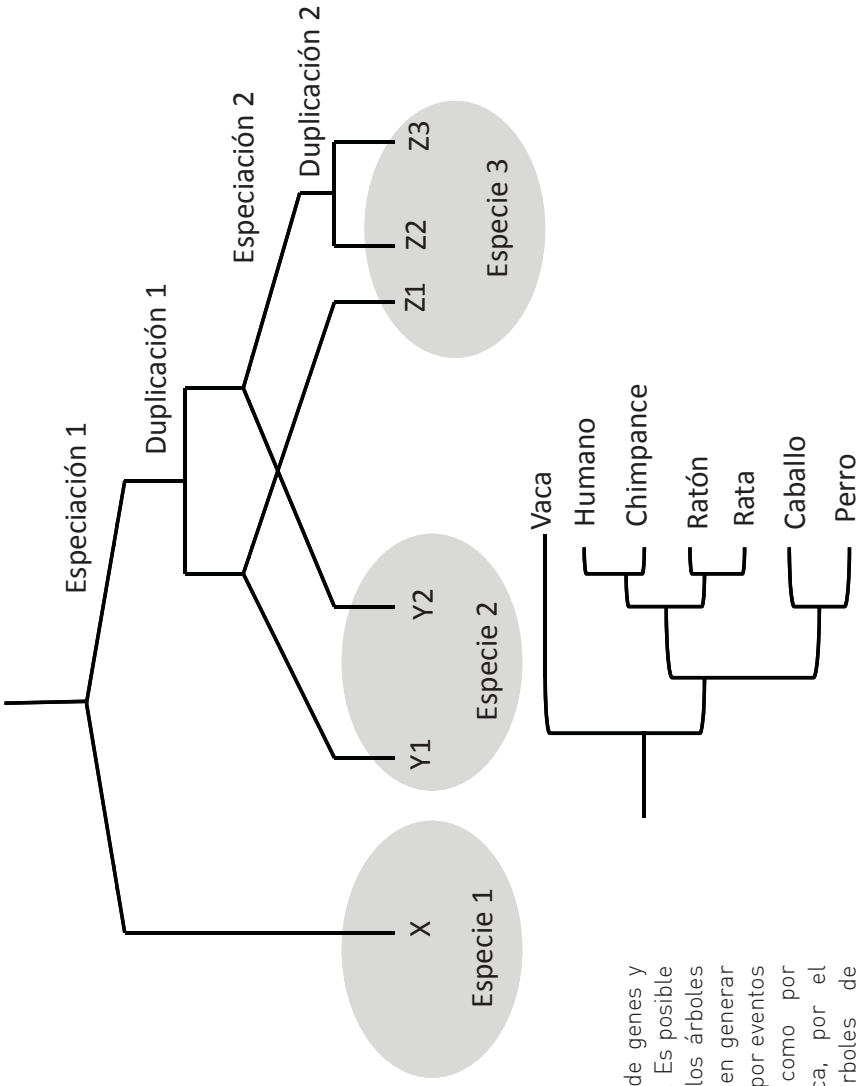

Figura 10. Árbol de genes y árbol de especies. Es posible observar que en los árboles de genes se pueden generar divergencia tanto por eventos de especiación como por duplicación génica, por el contrario los árboles de especies siempre involucran eventos de especiación.

el algoritmos, como el UPGMA (del inglés, Unweighted pair Group method with arithmetic mean) y Neighbor Joining (NJ), los cuales determinan la topología y la distancia al mismo tiempo, y por tanto, son rápidos y livianos computacionalmente hablando. Por otra parte, los métodos de optimización como el de máxima parsimonia y máxima verosimilitud hacen una separación y escogen en un espacio optimo los mejores, posteriormente, plantean el proceso evolutivo como un espacio de probabilidades, lo cual los hace un poco más lentos para determinarse (Dowell, 2008), aunque con la posibilidad computacional moderna a menudo es posible reconstruir situaciones complejas en poco tiempo (Baldauf, 2003). Un tercer método lo constituyen los métodos bayesianos que serán descritos posteriormente.

Cuando se analizan secuencias de proteínas o DNA, es necesario en primaria instancia realizar un alineamiento adecuado de las secuencias con el fin de determinar la homología de los caracteres moleculares (Durbin *et al.,* 1998). En la actualidad existen diferentes programas y sitios web que permiten realizar la alineación de secuencias con la utilización de diferentes algoritmos como el clustal W y el Clustal muscle, el BLAST, el FASTA, entre otros (Hall, 2004). Es importante mencionar que a menudo se podrán encontrar secuencias con baja similitud y por lo tanto, se pueden presentar regiones no alineables que deben ser excluidas en los análisis filogenéticos por que estos generan hipótesis de falsas relaciones.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que algunos métodos necesitan un modelo de sustitución para

poder ser corridos. Estos modelos permiten realizar una aproximación a los modelos naturales de sustitución y por tanto, brindan un soporte estadístico para la determinación de las topologías. Existen diferentes modelos de sustitución y diferentes metodologías que permiten predecir el mejor modelo bajo unas circunstancias dadas.

Modelos de sustitución

Básicamente, existen dos aproximaciones posibles para determinar los modelos de sustitución apropiados para utilizar como información en la construcción de árboles filogenéticos. Los métodos empíricos que son calculados a partir de la comparación de múltiples alineaciones de secuencias y que determinan valores fijos para los parámetros de sustitución (Comúnmente usados en secuencias de aminoácidos) y los métodos paramétricos que se basan en la modelación de ciertas propiedades químicas y composicionales determinadas de acuerdo a cada base de datos. Ambos resultan en modelos de procesos markovianos (Gollery, 2008).

Existen tres parámetros básicamente en los procesos de sustitución. La frecuencia que indica la proporción de cada nucleótido. La tasa de cambio que involucra las proporciones existentes entre transiciones y transversiones y finalmente la heterogeneidad entre tasas de sustitución que determina relaciones entre posiciones, regiones codificantes y no codificantes (Freeland, 2005). Es importante aclarar que los diferentes modelos de sustitución básicamente involucran

diferentes suposiciones con respecto a los diversos parámetros utilizados, y es posible partir de modelos como el de jukes-cantor (1969) que involucra la suposición de que todas las bases presentan una probabilidad de sustitución igual y la frecuencia de todas las bases es igual, lo cual a menudo no es cierto y más teniendo en cuenta que existe una mayor probabilidad de que se presenten mutaciones transicionales que transversionales. De la misma manera, existen métodos que plantean suposiciones a menudo mas complejas y acordes a las realidades de las secuencias, que involucran variaciones en los diferentes parámetros mencionados anteriormente, tal es el caso de kimura 3-parametros que plantea una diferente frecuencia entre las bases, además permite plantear una distinción entre transiciones y transversiones, pero asume que todas las frecuencias de transición son iguales.

Algunos modelos adicionales han sido planteados, los cuales presentan diferentes suposiciones con respecto a la información paramétrica utilizada, estos modelos no serán tratados en el presente capítulo, sin embargo, si se pretende aclarar que básicamente existen dos criterios que permiten determinar el modelo de sustitución mas adecuado, uno de estos es el criterio de información Akaike y el otro es el criterio de información bayesiano, los cuales presentan diferencias en su asunciones y modo de determinar, pero que normalmente son concordantes entre sí (Liò y Goldman, 1998).

Métodos de reconstrucción filogenética

-UPGMA es un método de parsimonia que basado en distancias genéticas, busca la topología del árbol que tenga una longitud total que minimiza las distancias entre los OTUs, a partir de una matriz de distancias pareadas. Este método, usa el criterio de mínima evolución que busca el árbol cuya longitud de las ramas sea la mínima y que comúnmente, se ajustan a un árbol bajo el supuesto de reloj molecular (Durbin *et al.,* 1998).

-Neighbor Joining es un método basado en el criterio de mínima evolución, y también se basa en la transformación de la información polimórfica en una matriz de distancias genéticas que le permiten determinar la topología de un árbol cuya longitud aditiva de las ramas sea la mínima (Hall, 2004).

-**Máxima Parsimonia** es un método que prefiere la topología que requiera el menor número de pasos evolutivos, es decir que busca el árbol más parsimonioso. Existen diferentes algoritmos que utilizan el criterio de sitios informativos, que son todos aquellos sitios polimórficos entre los individuos o caracteres de la muestra en cuestión. Mediante esta metodología es posible obtener diferentes árboles igualmente parsimoniosos (Baldauf, 2003).

-El **método de Máxima Verosimilitud** requiere de un modelo probabilístico de sustitución nucleotídica, por lo que previamente debe ser estimado el mejor modelo de acuerdo a los datos moleculares que se tienen. Este método, utiliza

la matriz original de los datos, por lo tanto, no se basa en distancias genéticas. La base de calculo se basa en la probabilidad de los datos dada una hipótesis, es decir que dada una topología, teniendo en cuenta la longitud de las ramas y el modelo de sustitución, busca la mayor probabilidad acorde con los datos moleculares (Falsenstein, 1981).

-**Inferencia Bayesiana** es una aproximación que busca obtener la topología optima del árbol filogenético. Este requiere varias búsquedas para establecer el soporte relativo de las biparticiones, es decir que siempre requiere hacer el análisis de bootstrap y jackniffing para obtener una magnitud que soporten los clados. El método no busca una sola topología óptima sino una población de árboles muestreados en función de su probabilidad *a posteriori*. La estimación se basa en la estimación bayesiana que plantea la relación entre la función de verosimilitud y las probabilidades *anteriori* y *posteriori*. De esta manera la probabilidad *a posteriori* de un árbol se interpreta como la probabilidad de que un árbol específico sea el correcto. El método mas común por el cual se puede obtener una aproximación a la probabilidad *posteriori* es el de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC), implementando algoritmos como el de Metropolis-Hastings (Gollery, 2008).

Teniendo en cuenta las metodologías descritas anteriormente, es importante mencionar que todos los árboles bayesianos calculan una fuerza de asociación en los clados para realizar la topología y por tanto, intrínsecamente calcula dicha fuerza que comúnmente es presentada en los árboles finales. Dicha fuerza de asociación es llamada Bootstrap que

es un método que cambia aleatoriamente las posiciones de las bases y rehace la construcción filogenética. La medida de soporte se refiere a un intervalo de confianza de 0 a 100 y puede ser calculado de manera simultánea en algunas otras metodologías como Máxima verosimilitud, Neighbor Joining y máxima parsimonia (Li, 1997).

Filogenia de los Bovinos

El ganado vacuno pertenece al orden de los artiodáctilos (ungulados), los cuales comúnmente se han dividido en tres grupos, los suiformes, los tilopodos y los rumiantes. Dentro de este ultimo orden se encuentran la familia Tragulidae y el infraorden de los Pecora, compuesto por las familias Antilocapridae, Cervidae, Moschidae, Giraffidae y Bovidae (Janis y Scott, 1987). Al interior de estos grupos, la familia Bovidae ha sido ampliamente estudiada debido a que allí se encuentran los ganados vacunos domesticados, sin embargo aún hay controversias sobre las diferentes relaciones existentes entre los miembros de esta familia y su tiempo de emergencia que es calculado en mas de 20 millones de años (Allard *et al.,* 1992).

Decker *et al.,* 2009, utilizó una gran cantidad de datos genómicos para determinar las relaciones filogenéticas existentes al interior del grupo de los rumiantes (Ruminantia), incluyendo el extinto *Bison priscus*. En los últimos años ha sido posible obtener el genoma mitocondrial completo del Aurochs (*Bos primigenius*), el progenitor del ganado doméstico (*Bos Taurus*). Inclusive, se han realizado trabajos,

en miras a conocer la diversidad genética y preservación del Aurochs Danes. Dicho trabajo secuenció un fragmento de 252 pares de bases ubicadas en la región multivariable 1 de la región control de la mitocondria y encontró que los Aurochs del sur de Escandinavia presentan estructuración poblacional que indican una diversificación local relativamente reciente a partir de unos pocos haplotipos ancestrales originarios de la población de Europa Occidental. Adicionalmente, en este estudio, no se encontraron haplotipos similares a los del ganado doméstico, por tanto, esto parece indicar que la introgresión entre estas especies fue muy limitada (Gravlund *et al.,* 2012).

Por otro lado, la familia Bovidae esta compuesta por 9 subfamilias que son: La subfamilia Bovinae de gran importancia económica debido a que en esta se encuentran los vacunos domésticos, la subfamilia Cephalophinae, Hippotraginae, Antilopinae, Peleinae, Reduncinae, Aepycerotinae, Alcelaphinae y Caprinae (Gatesy *et al.,* 1997). En este último grupo se encuentran las ovejas y las cabras que serán tratadas mas adelantes en el capítulo.

La subfamilia Bovinae comúnmente se encuentra dividida en tres grupos según los diferentes reportes filogenéticos obtenidos con diferente información molecular y utilizando DNA mitocondrial, nuclear y del cromosoma Y. Estos grupos son llamados tribus y en este se encuentran la tribu Tragelaphini (Antílopes con cuernos de espiral), Boselaphini (antílopes Chousinga y Nilgai) y Bovini (Búfalos y Ganado Taurino) (Beintema *et al.,* 1986, Gatesy *et al.,* 1997).

La tribu Bovini contiene algunas de las especies domésticas más importantes del mundo, la domesticación del ganado vacuno y de sus taxas relacionados más estrechamente fue uno de los avances significativos de la transición neolítica. Dicha tribu ha generado un gran interés sobre las relaciones existentes entre sus diversos miembros, ya que múltiples esfuerzos utilizando diferentes marcadores moleculares, a menudo han generado clados poco satisfactorios para la historia evolutiva de esta tribu (Bibi y Vrba, 2010).

Algunos estudios filogenéticos han encontrado que la dramática expansión del ganado doméstico, ha evidenciado un incremento de la introgresión de su DNA en muchas poblaciones salvajes, lo cual ha generado múltiples confusiones en el entendimiento de las relaciones filogenéticas al interior del grupo (Verkaar *et al.,* 2004; Halbert *et al.,* 2005). En las ultimas décadas, las reconstrucciones filogenéticas usando linajes mitocondriales han permitido clarificar la filogénesis de la subtribu Bovina (Hassanin y Ropiquet, 2004, 2007). Debido entre otras cosas, a que el DNA mitocondrial presenta herencia materna, por lo que la introgresión generada por lo machos puede ser obviada (Verkaar *et al.,* 2004). Por este motivo, el genoma mitocondrial ha sido ampliamente utilizado para la determinación de las relaciones filogenéticas existentes entre diferentes especies de bóvidos. Muchos análisis poblacionales y filogenéticos se han basado en esta información.

El clado Bovini cuenta con aproximadamente 30 especies, las cuales se encuentran divididas entre los grupos Bovina

(género *Bos*, incluyendo el Bison) y Bubalina (géneros *Syncerus* y *bubalus*), lo cual ha generado gran interés sobre su filogenia. Uno de los mayores desafíos sobre este clado radica en que existe una especie llamada Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*), la cual es un antílope de Vietnam y Laos que presenta un pequeño tamaño, cuernos simples, fosa preorbital grande, lo cual lo hace parecer un bóvido de apariencia primitiva, sin embargo, los trabajos en filogenia molecular, constantemente ubican el Saola en el grupo Bovini (hassanin y Douzery, 1999; Gates y Arctander, 2000).

La primera divergencia en la tribu bovini ocurrió hace 5 a 10 millones de años (Janecet *et al.,* 1997; MacEachern *et al.,* 2009). Dicha divergencia ha generado dos grupos consistentemente separados en diversos trabajos filogenéticos y que adicionalmente, no presentan evidencias de producción de descendencia hibrida viable (Allard *et al.,* 1992; Wall *et al.,* 1992; Hassanin y Ropiquet, 2004), dichos grupos son los ya mencionados Bovina y Bubalina, sin embargo, Hassanin y Douzery (1999) habían definido tres subtribus, adicionando a las anteriormente mencionadas, la subtribu Pseudoryina, representada únicamente por *P. Nghetinhensis*.

Entre los diferentes problemas en la composición del clado Bovini, se encuentra la ubicación del Kouprey. Algunas investigaciones morfológicas han llevado a diferentes conclusiones, por una parte Groves (1981) propuso que Kouprey se encuentra asociado con Aurochs (*Bos primigenius*), que es el ancestro de los vacunos domésticos,

y por otro lado Geraads (1992) propuso que había un grupo hermano compuesto por Banteng, Gaur y Aurochs asociado con los domésticos. Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido consistente con los datos obtenidos de diferentes estudios moleculares (Buntjer *et al.,* 2002), por tal motivo se mencionaran algunos estudios que han intentado dilucidar dichas relaciones.

En una investigación Buntjer *et al.,* (2002), utilizaron AFLPs con la intención de detectar las variaciones en el genoma nuclear de la subtribu Bovini y encontraron 361 marcadores con suficiente redundancia. Para determinar las relaciones existentes entre los diferentes miembros de la subtribu realizaron árboles de Neighbor Joining y Máxima Parsimonia. Los resultados obtenidos sugirieron la conformación de tres grupos, el primero formado por el Búfalo de agua y el Búfalo africano, el segundo, conformado por los ganados Taurus y Cebú y finalmente el agrupamiento que incluye el Bison Europeo y el Americano, los cuales pueden producir híbridos fértiles. Adicionalmente, sugirieron un agrupamiento entre el Banteng y el Gaur aunque los algoritmos no pudieron agrupar consistentemente estas especies con el Yak. Finalmente, los autores concluyen que con una adecuada precaución, los datos obtenidos por AFLP pueden ser usados para dilucidar relaciones filogenéticas. Algunos resultados adicionales basados en DNA nuclear y mitocondrial han relacionado de la misma manera, el ganado Taurus y el Cebú (Wall *et al.,* 1992; Bradley *et al.,* 1996) y plantean que esto es evidente por la completa fertilidad de la descendencia producida. Sin embargo, algunos otros estudios no soportan esta hipótesis (Schreiber *et al.,* 1999).

La subtribu bovina esta compuesta por las especies existentes *Bos taurus, Bos indicus, Bos javanicus* (Banteng), *B. grunniens* (Yak), *B. gaurus,* (Gaur), *B. frontalis* (Gayal), *Bison bison* (Bison americano), *Bison bonasus* (Bison europeo) y los diferentes *Bubalus* (Hassanin y Ropiquet. 2004). Para investigar las diferentes relaciones del género *Bos*, se han utilizado diferentes datos moleculares, a partir de DNA mitocondrial, nuclear y del cromosoma Y.

Recientemente el Kuprey (*Bos sauveli*) y el Banteng fueron catalogados como especies, a pesar de la introgresión del genoma mitocondrial del Kouprey en el Banteng camboyano (Hassanin y Ropiquet, 2007), adicionalmente, todos los autores consideran que el Kouprey son miembros de la tribu Bovini (Grooves, 1981; Geraads, 1992). Algunos otros aportes se han realizado tratando de dilucidar las relaciones filogenéticas de la subtribu Bovina, sin embargo aún hay algunas relaciones que no quedan claras por sus bajos niveles de confianza y los resultados contrastantes obtenidos mediante diferentes datos y métodos para la elaboración de los árboles (Hassanin y Ropiquet, 2004).

En una investigación reciente, Rosli *et al.,* (2011) usando un segmento de la secuencia del gen citocromo b, buscando entender las relaciones del Gaur con los demás miembros del género *Bos*, realizaron árboles de Neighbor Joining, de Máxima Parsimonia y Bayesianos en miras a aclarar las relaciones existentes entre los diferentes miembros del grupo. Los resultados obtenidos, mostraron una divergencia del ganado Gaur con respecto a los *Bos taurus* y a los *Bos*

indicus, formando un grupo monofilético asociado al Banteng. Esta topología fue fuertemente respaldada por lo valores de significancia y concuerda con algunos trabajos mencionados anteriormente. Los resultados adicionalmente mostraron que el Yak es un clado mayor asociado a Banteng y Gaur, formando todos un grupo de ganado salvaje, separado del ganado doméstico que se encontró asociado entre sí (*B. taurus* con *B. indicus*).

En el estudio realizado por Verkaar *et al.,* (2004) usando la información molecular de tres segmentos mitocondriales y dos segmentos génicos del cromosoma Y, buscando aislar el efecto de la introgresión que pudieron tener los diferentes grupos, determinaron las relaciones existentes entre los grupos *Bos* y *Bison*. Los resultados obtenidos mediante 4 metodologías diferentes fueron consistentes, mostrando en el caso de los datos mitocondriales, 4 grupos bien establecidos, el primer grupo que ubica el ganado taurino con el cebuino, concordante con lo obtenido por otros autores mencionados anteriormente, un segundo grupo conformado por el Bison europeo, y un tercer grupo que asociaba al Bison Americano con el Yak, y finalmente un grupo del que hace parte el Banteng, Gaur y el Gayal (*Bos frontalis*). Por el contrario, las secuencias del cromosoma Y indicaron asociación entre el Bison Americano y el Europeo, lo cual esta acorde con su parecido morfológico, con la fertilidad completa de la descendencia hibrida y con algunos otros estudios mencionados anteriormente. Sin embargo, los autores mencionan que es posible que haya habido una introgresión de genes del cromosoma Y en el Bison europeo, por una posible entrada de toros americanos,

lo cual explica el hallazgo de un fósil de Bison europeo sin un ancestro identificable.

MacEachern *et al.,* 2009, reconstruyeron las relaciones filogenéticas existentes entre 14 especies representativas de los Bovinae, para tal fin utilizaron 84 secuencias de genes autosomicos de 4 cromosomas diferentes. Realizaron árboles de Neighbor Joining y calcularon las tasas de sustitución neutral por sitio en regiones sinónimas y no codificantes, con el fin de identificar relaciones y tiempos de divergencia entre especies y evaluar la evidencia de introgresión y clasificación de linajes. En esta investigación, encontraron tres linajes distintos, el clado Búfalo y mas recientemente una divergencia que llevó al Banteng, Gaur y Mithan. finalmente un clado compuesto por el ganado doméstico. Los mismos autores sugieren que un cuarto linaje puede surgir; este linaje tendría el Bison y el Yak, los cuales fueron agrupados separados del ganado doméstico y del grupo compuesto por Banteng, Gaur y Mithan. Sin embargo, los mismos autores concluyen que sigue habiendo una incerteza en la reconstrucción filogenética, debido a que muchas de las especies en Bovini divergieron en un corto periodo de tiempo.

Con la intención de clarificar las relaciones existentes en la tribu Bovini, Hasssanin y Ropiquet (2004) analizaron 20 diferentes taxa de los cuales se obtuvieron 2065 caracteres nucleotídicos, de tres segmentos del gen de lactoferrina y dos genes mitocondriales (El citocromo b y la subunidad II de la citocromo C oxidasa). Con la información obtenida realizaron árboles de Máxima Parsimonia y Bayesianos, mediante

los cuales pudieron mostrar que el Kouprey pertenece a la subtribu bovina y que tres clados diferentes pueden ser identificados en este grupo, el primero contiene el ganado taurino, el cebú y el Bison europeo. El segundo involucra el Yak y el Bison Americano; y el tercero contiene el Banteng, el Kouprey y el Gaur. Las dos metodologías utilizadas mostraron topologías muy similares que fortalecen los resultados obtenidos.

Teniendo en cuenta todos los resultados mencionados anteriormente, es posible deducir que muchos estudios concuerdan en la asociación de algunos grupos de la subtribu Bovina, sin embargo, algunas relaciones permanecen algo ambiguas y son poco consistentes. Buscando clarificar y resumir algunos de los resultados mencionados anteriormente, en la figura 11 se observa una representación resumida una hipótesis de las relaciones existentes dentro de la subtribu Bovina.

Finalmente, vale la pena mencionar que la información taxonómica limitada, disminuye la confiabilidad y precisión de las filogenias, debido a que dificulta la interpretación de los datos, desde los diferentes enfoques evolutivos. Por tanto los trabajos mas robustos a menudo requieren del uso de la taxonomía acompañada de la filogenia molecular en miras a obtener buenos resultados que aclaren las relaciones existentes entre diferentes grupos.

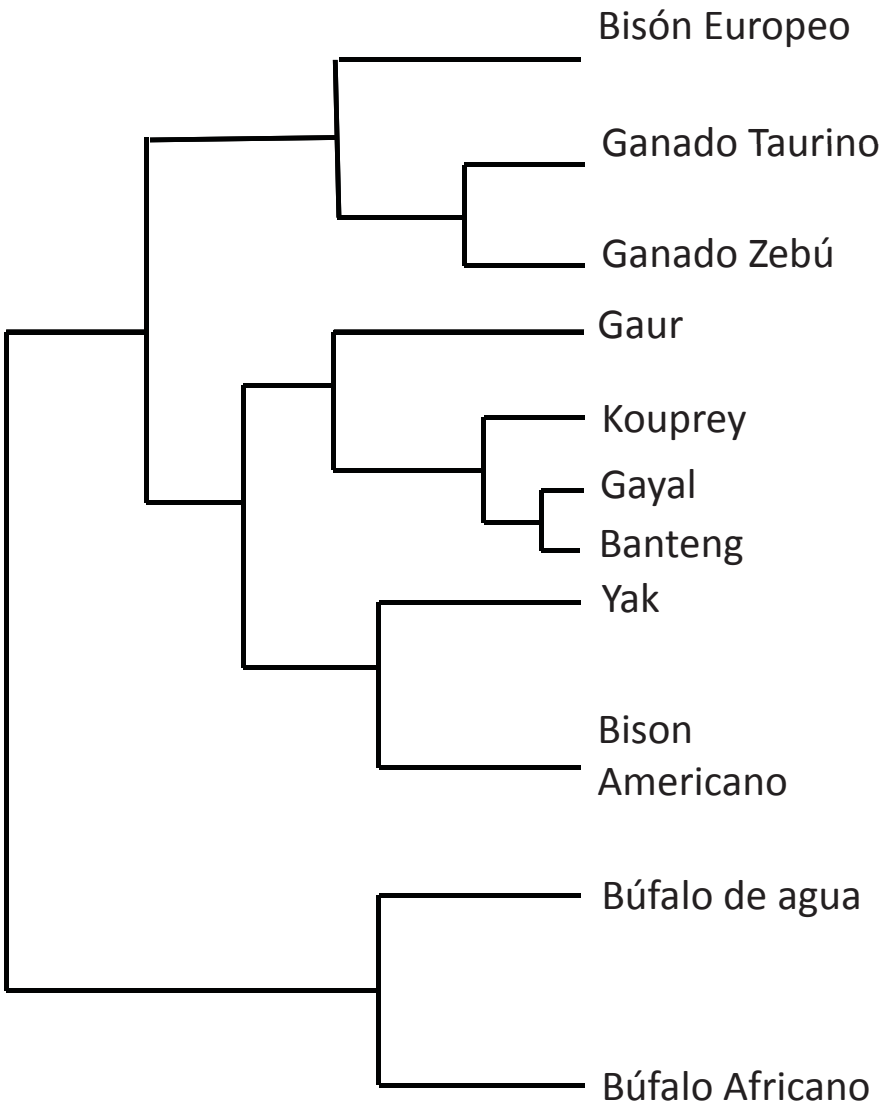

Figura 11. Filogenia de la subtribu Bovina

Diversidad en poblaciones bovinas

La variabilidad genética en las especies de animales domésticos ha ido disminuyendo progresivamente, principalmente por la sustitución de razas y la cría selectiva buscando aumentar la productividad y la calidad de los productos de origen animal. Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado en todo el mundo diversos estudios en miras a identificar la variabilidad genética existente tanto en los animales utilizados en producción como la de los animales criollos de cada país, debido a que presentan un alto potencial como recurso genético, a su capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales propias de cada lugar y a la resistencia a enfermedades que presentan.

Con la intención de identificar dicha diversidad, Pizarro *et al.,* (2009) quisieron determinar como se comportaban las poblaciones de ganado de carne del sur de Chile en cuanto a la diversidad y la estructuración poblacional que presentan. Para tal fin, utilizaron DNA de diferentes bovinos criollos con el fin de amplificar 10 marcadores de tipo microsatélite. En los resultados obtuvieron una heterocigosidad media en la población de 0.73 lo cual indica una diversidad alta entre los diferentes ganados criollos evaluados. Adicionalmente, los análisis de estructuración de poblaciones mostraron un valor de F_{ST} de 0.137 lo cual indica una estructuración en la población, debido principalmente, a que algunas poblaciones pareadas se encontraban altamente diferenciadas.

En Colombia estudios similares han sido realizados con el objeto de determinar las diferentes relaciones existentes

entre grupos de animales criollos y comerciales, identificando a menudo estructuración genética y alta diversidad (Bedoya *et al.,* 2001; Rincón *et al.,* 2012). Inclusive, Moreno *et al.,* (2001), realizaron una caracterización de las relaciones filogenéticas y de la diversidad genética encontrada en el ganado criollo colombiano. En dicho estudio, utilizaron 7 razas de ganado criollo Colombiano (El Blanco Orejinegro, el Romosinuano, el Costeño Con Cuernos, el Sanmartinero, el Chino Santandereano, el Harton del Valle y el Casanareño) usando el Cebú como control. Para todas las razas se utilizaron 7 marcadores de tipo microsatélite. En los resultados obtenidos se reportaron la presencia de 4 alelos nuevos, lo cual es un indicio de la alta variabilidad que presentan estos ganados. Entre las razas analizadas, se encontró que las dos razas con mayor variabilidad son el Blanco Orejinegro y el San Martinero. La heterocigosidad media que obtuvieron fue de 0.52, pero con valores individuales tan altos como 0.92, lo cual habla de la alta diversidad que se puede encontrar en estos grupos. Finalmente determinaron el coeficiente de endogamia F_{IS} y encontraron una endogamia de 0.14 pero con una variación muy alta, sin embargo dicho valor hace pensar en una tendencia a la endogamia presente en estos ganados, posiblemente por el poco número de animales que se conservan de cada raza criolla.

Filogenética de los caprinos y ovinos

Como se presentó anteriormente en la descripción de la filogenia bovina, es aceptado que el ganado caprino y ovino pertenecen al orden de los artiodáctilos, al suborden de los

rumiantes (Ruminantia), al infraorden Pecora, a la familia Bovidae, al igual que los bovinos, pero difiere a nivel de subfamilia, debido a que hace parte de la subfamilia caprinae (Janis y Scoott, 1987; Gatesy *et al.,* 1997).

La subfamilia caprinae comprende 18 especies, las cuales fueron clasificadas en 4 tribus (tribu Caprini, Rupicaprini, Ovibovini y Saigini) de acuerdo a sus similaridades morfológicas, ecológicas y conductuales (Nowak, 1991). La tribu caprini corresponde a las cabras (*Capra*) y ovejas (*Ovis*) domésticas y a los géneros *Ammotragus, Hemitragus y Pseudois*, las cuales se consideran relacionadas. La tribu Rupicaprini, es considerada la tribu mas basal y tendría los géneros *Rupicapra, Capricornis, Naemorhedus y Oreamnos*. La tribu Ovibovini por su parte fue dividida de acuerdo a sus características morfológicas en *Budorcas y Ovibos*, que constituyen los caprinos mas grandes. Finalmente, la tribu Saigini, incluiría los últimos dos géneros, que son *Saiga* y *Pantholops* (Hassanin *et al.,* 1998).

El estatus filogenético de los últimos dos géneros mencionados han sido ampliamente controversiales y algunas clasificaciones ubican estos dos géneros en la subfamilia Antilopinae de los bóvidos (McKenna y Bell, 1997). Por otro lado Gentry (1992) sugirió incorporar a *Saiga* dentro de Antilopinae y *Pantholops* dentro de Caprinae.

Los diferentes estudios realizados, usando el gen de la citocromo b, en genes nucleares mitocondriales, en secuencias de k-caseína han generado diferentes hipótesis desafiantes

contra la clasificación morfológica ampliamente aceptada (Chikuni *et al.,* 1995; Cronin *et al.,* 1996; Gatesy *et al.,* 1997). Todos esos estudios sustentaban el origen monofilético de los miembros de la subfamilia Caprinae, Sin embargo Gatesy (1997) separó al género *Saiga* del grupo.

Por otra parte, en el mismo estudio, Gatesy *et al.,* (1997) encontraron una fuerte relación entre los géneros *Capra, Hemitragus y Pseudois*. Adicionalmente, planteo también fuertes relaciones entre *Ovibos, Capricornis* y *Naemorhedus* y finalmente un grupo que relaciona a *Oreamnos* y *Ovis*. Estos hallazgos, generaron una fuerte confrontación contra la organización inicialmente planteada de acuerdo a las características ecológicas, conductuales y morfológicas. Sin embargo, las muestras utilizadas no son contundentes debido principalmente a los tamaños de muestra tan pequeños utilizados en los diferentes estudios.

Posteriormente, Hassanin *et al.,* (1998) secuenciaron el gen mitocondrial citocromo b, de 18 especies de la subfamilia Caprinae y encontraron que la subfamilia es monofilética excluyendo a *Saiga,* lo cual coincide con lo propuesto por Gatesy *et al.,* (1997). Adicionalmente, los hallazgos sugieren que no hay un soporte que permite afirmar las relaciones entre las cuatro tribus como normalmente habían sido aceptadas. Finalmente, los autores sugieren el agrupamiento en tres grupos conformados por (1) *Budorcas* y *Ovis* (2) *Capricornis, Ovibos* y *Naemorhedus* (3) *Capra, Hemitragus* y *Pseudois*. Los demás géneros pertenecientes a la subfamilia no fueron tenidos en cuenta ya que los valores de Bootstrapping no fueron lo suficientemente altos para concluir.

El género *Capra*, contiene las cabras domésticas (*Capra hircus*) y las salvajes, que contienen la cabra Bezoar (*Capra aegagrus*), Tur (*Capra cylindricornis*), Markhor (*Capra falconeri*) e Ibex (*Capra pirenaica*). Todas provienen del viejo mundo, Sin embargo, su historia evolutiva ha sido dificultosa y permanece pobremente entendida, debido principalmente a la rápida expansión del taxa *Capra* (Manceau *et al.,* 1999), haciendo difícil evaluar el número de especies y sus relaciones filogenéticas.

Dentro del género *Capra*, se estima que existen entre 6 a 9 especies y subespecies. Sin embargo, los cruces entre diferentes especies pueden producir descendencia fértil. La clasificación morfológica de este grupo tradicionalmente se ha basado en la morfología de los cuernos de los machos adultos. Sin embargo algunos estudios filogenéticos han presentado diferencias con respecto a la clasificación morfológica (Pidancier *et al.,* 2006).

Teniendo como objetivo aclarar la controversia en los diferentes estudios morfológicos y moleculares, Pidancier *et al.,* (2006) evaluaron la historia evolucionaria del género *Capra* usando la información molecular de dos genes localizados en el cromosoma Y (Amelogenina y dedos de Zinc Y) y las secuencias del citocromo b. Los resultados mostraron dos grupos, uno que se encontraba formado por la cabra doméstica, Bezoar y Markhor, lo que sugiere que la cabra doméstica se origina de una o ambas especies. El otro grupo, poseía las demás especies silvestres. La morfología de los cuernos por lo general concordó con la filogenia generada

con el análisis de datos del cromosoma Y. Adicionalmente, los reportes encontrados para los análisis del citocromo b, sugieren también la formación de dos clados diferentes, sin embargo, los miembros de estos grupos no fueron concordantes. Los resultados contrarios fueron explicados por la posibilidad de una posible introgresión del DNA mitocondrial entre taxas ancestrales.

Diversidad en poblaciones caprinas

Algunos estudios de diversidad que evaluaron el DNA del cromosoma Y sugieren que las cabras son genéticamente más diversas (diversidad entre poblaciones) que las ovejas. Sin embargo, las ovejas presentaron más variación dentro de las poblaciones, indicando diferente estratificación de la diversidad (Meadows *et al.,* 2004).

Luikart *et al.,* (2001) secuenciaron el segmento hipervariable de la región control del DNA mitocondrial de 88 razas y encontraron 3 linajes de cabras altamente divergentes, con un linaje solo del este y sur de Asia, estos resultados sugieren que las cabras tienen múltiples orígenes maternos. Adicionalmente, encontraron que las poblaciones de cabras son menos estructuradas genéticamente que las poblaciones de ganado vacuno. En las cabras solamente un 10% de la variación del DNA mitocondrial se encuentra entre continentes, lo que sugiere un alto flujo genético por transporte de animales entre continentes.

En otro estudio, Naderi *et al.,* (2007), secuenciaron un segmento de la región control del DNA mitocondrial de 2430 individuos. Los hallazgos mostraron que todos los grupos tenían una alta diversidad de haplotipos y mucha de la diversidad fue distribuida entre grupos y regiones geográficas. Encontraron adicionalmente, que hay un haplotipo predominante (Frecuencia del 90%) y altamente disperso en el mundo.

Finalmente, en un estudio realizado por Bruno-de-Sousa *et al.,* (2011), buscaron evaluar la diversidad genética de las razas nativas portuguesas Algarvia, Bravia, Charnequeira, Preta de Montesinho, Serpentina y Serrana. Para tal fin, utilizaron 25 marcadores microsatélites en 193 animales y encontraron una alta variabilidad genética con una heterocigosidad esperada de 0.70. Adicionalmente, encontraron valores de F_{ST} de 0.031, indicando que no hay estructuración genética en la población y por tanto gran parte de la variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones y no tanto entre ellas, sin embargo, la población de Algarvia y Bravia, se encontraron separadas, y se comportan como poblaciones diferentes. Para terminar los autores concluyen que algunas razas mostraron señales de erosión genética, lo cual plantea la necesidad de establecer planes de conservación y manejo del recurso genético.

Para concluir, vale la pena mencionar que la mayoría de estudios indican que las poblaciones de cabras presentan una alta variabilidad al interior de ellas (Bruno-de-Sousa *et al.,* 2011), pero esa alta variabilidad hace que la proporción

de varianza entre diferentes grupos, razas y linajes sea muy pequeña. Esta alta variación dentro de la especie parece indicar que el proceso de selección para cría dentro de los diferentes grupos de cabras no ha sido tan fuerte como el ejercido sobre otros grupos de animales doméstico, sin embargo, la gran cantidad de grupos distintos si indican los diferentes procesos de cría que han tenido que afrontar desde la domesticación.

REFERENCIAS

Allan GJ y Max TL. 2010. Molecular genetic techniques y markers for ecological research. Nature Education knowledge, 11: 2.

Allard MW, Miyamoto MM, Jarecki L, Kraus F, Tennant MR. 1992. DNA systematics y evolution of the artiodactyl family Bovidae. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 89: 3972-3976

Baldauf SL. 2003. "Phylogeny for the faint of heart: a tutorial." Trends in Genetics, 19(6): 345-351.

Becerra V y Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agric Tec, 60: 270-281.

Bedoya G, Carvajal LG, Bermúdez NR, Moreno FL, Márquez ME, Davies S, Derr J, Ossa J, Ruiz A. 2001. Estructura molecular y poblacional del Ganado criollo Colombiano (GCC). Rev Col Cienc Pec, 14: 109-120.

Beintema JJ, Fitch WM, y Carsana A. 1986. Molecular evolution of pancreatic-type ribonucleases. Molecular Biology y evolution, 3: 262-275.

Bibi F, Vrba E. 2010. Unraveling bovin phylogeny: accomplishments y challenges. Bibi y Vrba BMC Biology 2010, **8**:50. http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/50

Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. 1996. Mitochondrial diversity y the origins of African y European cattle. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 5131–5135.

Brown W M, Prager E M, Wang A. And Wilson A C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo y mode of evolution. J. of Mol. Evol, 18: 225-239.

Bruno-de-Sousa C, Martinez AM., Ginja C., Santos-Silva F., Carolino, M.I. Delgado J.V., Gama L.T. 2011. Genetic diversity y population structure in Portuguese goat breeds. Livestock Science. 135: 131–139.

Chikuni K, Mori Y, Tabata T, Saito M, Momma M, y Kosugiyama, M. 1995. Molecular phylogeny based on the k-casein y cytochrome b sequences in the mammalian suborder Ruminantia. J. Mol. Evol, 41: 859-866.

Cronin M A Stuart R Pierson B J y Patton J C. 1996 K-casein gene phylogeny of higher ruminants (Pecora, Artiodactyla). *Mol.* Phylogenet. Evol. 6: 295-311.

Decker JE, Pires JC, Conant GC, McKay SD, Heaton MP, Chen K, Cooper A, Vilkki J, Seabury CM, Caetano AR, Johnson GS, Brenneman RA, Hanotte O, Eggert LS, Wiener P, Kim JJ, Kim KS, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Neibergs HL, McEwan JC, Brauning R, Coutinho LL, Babar ME, Wilson GA, McClure MC, Rolf MM, Kim J, Schnabel RD, Taylor JF. 2009. Resolving the evolution of extant y extinct ruminants with high-throughput phylogenomics. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:18644-18649.

Dowell K. 2008. Molecular Phylogenetics: An introduction to computational methods y tools for analyzing evolutionary relationships. 1-18. http://math.umaine.edu/~khalil/courses/MAT500/papers/MAT500_Paper_Phylogenetics.pdf

Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison A. 1998. Biological Sequence Analysis. Cambridge University Press: Cambridge.

Echeverri J, López-Herrera A, Arango J, Rodríguez N, Forero J, Rincon JC. 2011. Genética molecular aplicada al mejoramiento animal. Primer Edición. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín-Publicaciones. Colombia. Pp 186.

Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a máximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17, 368–376.

Ferris SD, Sage RD, Huang CM, Nielson JT, Ritte U, Wilson AC. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 80: 2290–2294.

Freeland J. 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester. England. Pp 388

Gatesy J, Amato G, Vrba E, Schaller G, DeSalle R. 1997. A cladistic analysis of mitocondrial ribosomal DNA from the Bovidae. Molecular phylogenetics y evolution 7:303-319.

Gatesy J, Arctander P. 2000 Hidden morphological support for the phylogenetic placement of *Pseudoryx nghetinhensis* with bovine bovids: A combined analysis of gross anatomical evidence y DNA sequences from five genes. *Syst Biol*, 49:515-538.

Gentry, A W 1992.The subfamilies y tribes of the family Bovidae. *Mammal Rev.* 22: 1-32.

Gollery M. 2008 Handbook of Hidden Markov Models in Bioinformatics. CRC Press, Taylor & Francis Group: London.

Griffiths AJ, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. 1999.Modern genetic analysis. Edition original. New York: W.H. Freeman y company.

Halbert ND, Ward TJ, Schnabel RD, Taylor JF, Derr JN. 2005 Conservation genomics: disequilibrium mapping of domestic cattle chromosomal segments in North American bison populations. Mol Ecol, 14(8):2343-62.

Hall BG. 2004 Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.

Hartl DL, y Clark AG. 2007. Principles of population genetics. 4th edition Sunderland (MA): Sinauer Associates Inc Publishers 5-138.

Hartwell, LH, L Hood, ML Goldberg, AE Reynolds, LM Silver, RC Veres. 2008 Genetics: From Genes to Genomes, 3rd Ed. McGraw-Hill: New York.

Hassanin A, Pasquet E y Vigne JD. 1998. Molecular Systematics of the Subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as Determined from Cytochrome b Sequences. Journal of Mammalian Evolution 5 (3): 217-236.

Hassanin A, Douzery EJP. 1999. Evolutionary affinities of the enigmatic saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in the context of the molecular phylogeny of Bovidae. Proc Biol Sci, 266:893-900.

Hassanin A y Ropiquet A. 2004.Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) y the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain. 1937. Molecular Phylogenetic Evolution 33: 896-907.

Hassanin A y Ropiquet A. 2007. Resolving a zoological mystery: the kouprey is a real species. Proc Biol Sci, 274(1627):2849-55

Hellborg L, Ellegren H, 2004. Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. Mol Biol Evol 21, 158–163

Hurles, M.E., Jobling, M.A., 2001. Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. Mol Ecol 10, 1599–1613

Janecek LL, Honeycutt RL, Adkins RM, Davis SK 1996 Mitochondrial gene sequences y the molecular systematics of the artiodactyl subfamily bovinae. Mol Phylogenet Evol, 6(1):107-19.

Janis CM y Scott KM. 1987. The interlationships of higher ruminants families with special emphasis of the members of the Cervoidae. American Musea Novitates 2893: 1-85.

Jensen R. 2001. Orthologs y paralogs: we need to get it right. Genome Biology 2 (8): Interactions 1002.1-1002.3.

Li, WH (1997) Molecular Evolution. Sinauer Associates: Sunderland, MA.

Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N: Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy y disease. Trends Genet 1997, 13:450-455

Linder, CR, T Warnow (2005) "An overview of phylogeny reconstruction." In the Handbook of Computational Molecular Biology, Chapman y Hall/CRC Computer & Information Science.

Liò P, Goldman N. 1998 "Models of Molecular Evolution y Phylogeny." Genome Research, 8:1233-1244.

Luikart G, Gielly L, Exco**Y**er L, Vigne J.-D, Bouvet J, Taberlet, P, 2001. Multiple origins y weak phylogeographic structure in domestic goats.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 5927–5932.

MacEachern S, McEwan J y Goddard M. 2009. Phylogenetic reconstruction y the identification of ancient polymorphism in the Bovini tribe (Bovidae, Bovinae). BMC Genomics, 10:177. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/177.

Manceau V, Després L, Bouvet J, Taberlet P, 1999. Systematics of the genus Capra inferred from mitochondrial DNA sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. 13, 504–510.

McKenna M C, y Bell S K. (1997). Classification of Mammals Above the Species Level, Columbia University Press, New York.

Meadows JR, Hawken RJ, Kijas JW. 2004. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. Anim Genet. 35, 379-85.

Moreno F, Bedoya G, Derr J, Carvajal LG, Bermudez N, Zuluaga F, Ossa J, Berdugo J, Estrada L, Barrera J, Scott D, Ruíz-Linares A. 2001. Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo Colombiano. Revista Corpoica 3 (2): 17-23.

Naderi S, Rezaei HR, Taberlet P, Zundel S, Rafat SA, Naghash HR, El-Barody MA, Ertugrul O, Pompanon F, 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. PLoS One 2, e1012.

Nei M. 1972. Genetic distance between populations.American Naturalist 106: 283--292.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70: 3321--3323.

Nowak R M. 1991. Walker's Mammals of the Word, Vol. II, 5th ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore y London.

Petsko G. 2001. Comment: Homologuephobia. Genome Biology 2 (2): Comment 1002.1-1002.2

Pidancier N, Jordan, S, Luikart G, Taberlet P, 2006. Evolutionary history of the genus Capra (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitocondrial DNA y Y-chromosome phylogenies. Mol. Phylogenet. Evol. 40, 739–749.

Rincon JC, López A, Echeverri J. 2012. Genetic variability of the bovine prolactin-Rsal loci in Holstein cattle in Antioquia province (Colombia). Rev Colomb Cienc Pecu 2012; 25:191-201

Rosli MK, Zakaria SS, Syed-Shabthar SM, Zainal ZZ,Shukor MN, Mahani MC, Abas-Mazni O y Md-Zain BM. 2011. Phylogenetic relationships of Malayan gaur with other species of the genus Bos based on cytochrome b gene DNA sequences. Genetics y Molecular Research 10 (1): 482-493

Schreiber A, Seibold I, Nötzold G, Wink M. 1999. Cytochrome b gene haplotypes characterize chromosomal lineages of anoa, the Sulawesi dwarf buffalo (Bovidae: Bubalus sp.). J Hered 90 165–176.

Shen P, Wang F, Underhill P A, Franco C, Yang W H, Roxas A, Sung R, Lin A A, Hyman RW, Vollrath D et al. 2000. Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 7354--7359.

Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139: 457-462.

Verkaar EL, Nijman IJ, Beeke M, Hanekamp E, Lenstra JA. 2004. Maternal y paternal lineages in cross-breeding bovine species. Has wisent a hybrid origin? Mol Biol Evol, 21(7):1165-70.

Victoria L, John Nason, Diane R, Campbell y Juan F Fernandez. 1999. Review: Landscape approaches to historical y contemporary gene flow in plants. Tree 14 (6): 219-224

Wall DA, Davis SK, Read BM. 1992. Phylogenetic Relationships in the Subfamily Bovinae (Mammalia: Artiodactyla) Based on Ribosomal

DNA. J of Mammalogy, 64(1):262-75.

Weir BS. y Cockerham C C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323--354.

Wright S. Evolution y Genetics of Populations, The theory of gene frequencies. 2nd volume. Chicago (IL): University of Chicago Press, 1969. 211-455.

CAPÍTULO 5

Las técnicas moleculares como herramientas en la acuicultura

Sandra Clemencia Pardo Carrasco[1],
Samir Benicio Brú Cordero[2]

[1] MVZ, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

[2] Profesional en Acuicultura, MSc(c). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Acuícolas. Grupo de investigación CINPIC, Universidad de Córdoba.

ACUICULTURA: SISTEMA PRODUCTOR DE ALIMENTOS EN EL MUNDO

De acuerdo con la definición de la FAO (2003), acuicultura es la cría de organismos acuáticos, siendo considerados dentro de ellos los peces, moluscos, crustáceos y las algas. La cría supone la intervención humana para incrementar la producción; por ejemplo: concentrar la población del organismo en cuestión, alimentarlos o protegerlos de los depredadores. También supone tener la propiedad de las poblaciones de organismos que se estén cultivando. De acuerdo con los escritos de Fan Li, sus orígenes se registran en China desde hace más de 4000 años con la costumbre de los emperadores de mantener sus peces favoritos en estanques (Overturf, 2009). El crecimiento de la acuicultura ha sido importante en las últimas décadas, teniendo un incremento de la producción, donde en 1950 se produjeron menos de 1 millón de toneladas mientras que para el 2008 la producción fue de 52,5 millones de toneladas.

El crecimiento de la producción acuícola en el mundo ha sido rápido pero diferente entre regiones, por ejemplo: en América Latina y el Caribe desde 1970 hasta 2008 el crecimiento fue de 21,1% anual; en la región del Cercano Oriente fue de 14,1%, en África de 12,6% y China de 10,4%; en Europa y Norte América este crecimiento es apenas

de 1,7% y 1,2%, respectivamente, presentando una tasa promedio superior al 3,6% al año desde 1980.

Debido a este crecimiento, el sector se ha convertido en una fuente importante de trabajo y sustento para miles de familias en todo el mundo. Se estimó que en el 2008 hubo al menos 44,9 millones de personas vinculadas directamente, con tiempo total o parcial en procesos de captura y cultivo de organismos acuáticos, de este total, al menos el 12% fueron mujeres. Desde 1980 hasta 2008, el crecimiento en el número de empleos fue 167%; adicionalmente se estima que por cada empleo directo, son generados al menos 3 indirectos en asuntos de cosecha y proceso (FAO, 2012).

De los organismos acuáticos utilizados para consumo humano más del 46% es suministrado por la acuicultura, el resto proviene de la pesca. Se espera que la acuicultura supere y satisfaga la demanda creciente, ya que el suministro de organismos acuáticos por parte de la pesca llegó al límite. Para el año 2008, los peces provenientes de captura y cultivo, proporcionaron cerca de 142 millones de toneladas, de esto, el 46% fue resultado de la acuicultura. La producción acuícola a nivel mundial ha estado dominada por la región Asia-Pacífico, teniendo el 89% en cantidad y el 79% del valor (FAO, 2010).

Según la FAO, para el año 2005 los peces respondían por el 85% de toda la producción acuícola, donde más de 240 especies fueron producidas en sistemas acuícolas; sin embargo, solamente 25 especies respondieron por el 90% de la

producción (FAO, 2005). Para el año 2010 la cifra de especies aumentó a 541 especies de las cuales 327 corresponden a peces con escamas (FAO, 2012), lo anterior evidencia la alta diversidad, especialmente cuando es comparada con otros sistemas de producción animal como bovinos, porcinos y aves.

Dentro de los peces diádromos (peces cuyos sus ciclos reproductivos requieren del transito entre agua dulce a salada o viceversa) el principal representante es el Salmón del atlántico, seguido del milkfish, la trucha arcoíris y las anguilas. Los más importantes productores de estas especies son Noruega y Chile, seguidos por algunos países Europeos, Asiáticos y Norteamericanos. Dentro de la producción total de moluscos en el 2008, la distribución estuvo así: ostras (31,8%), almejas (24,6%), mejillones (12,4%) y vieras (10,7%). Los crustáceos, básicamente camarón blanco *Littopenaeus vannamei*, son producidos en los tres ambientes, 47,7% en agua salobre, 38,2% en agua dulce y 14,1 en agua salada.

Como se anuncia en el párrafo anterior, la acuicultura es realizada en varios ambientes, en agua dulce se produce un 59,9%, en agua salada 32,3% y en ambientes salobres apenas el 7,7%. De igual forma, los organismos producidos en cada ambiente son diversos y a su vez los precios. En ambientes marinos se producen en términos generales los de mayor valor, incluyendo peces, crustáceos y orejas de mar; pero también ostras, mejillones, almejas, vieras y berberechos. Para el año 2008, la producción acuícola en agua dulce estuvo dominada por carpas (Ciprinidae) con un

71,1% en países como China, India, Bangladesh, Myanmar, Vietnam, Indonesia y Pakistan. Recientemente, el bagre panga (*Pangasius* sp) ha tenido un crecimiento dramático, 1,2 millones de toneladas en 2008 (FAO, 2010).

La pesca y la acuicultura juegan un papel importante en la seguridad alimentaria, en primer lugar porque más del 80% es desarrollada por pequeños productores que adquieren con ella ingresos y calidad de vida, y en segundo lugar porque los consumidores reciben una fuente de proteína de origen animal de alta calidad. Según la FAO (2010), una porción de 150 g de pez proporciona cerca del 50 al 60% del requerimiento diario de proteína para un adulto. Adicionalmente, los peces son fuente esencial de vitaminas y minerales, y usualmente son bajos en grasas saturadas, carbohidratos y colesterol. La acuicultura continúa siendo el sector productor de alimentos con más rápido crecimiento, con el cual la población ha pasado de consumir 0,7kg per capita en 1970 a 7,8 kg per capita en el 2008. La mayor parte de la producción acuícola es destinada para consumo humano, por ejemplo en China, el 80,2% del pescado consumido en el 2008 provino de esta actividad.

En el 2007 los peces representaron más del 15,7% de la proteína animal consumida por la población humana y más del 6,1% de toda la proteína. Es decir que los peces alimentaron a más de 1.500 millones de personas con aproximadamente el 20% de la proteína animal consumida por cabeza, y a 3.000 millones de personas con casi el 15% de la proteína total. Este suministro de proteína animal

se hace más importante para los países en desarrollo e incluso para los países clasificados como de bajos ingresos y déficit alimentario (LIFDCs). En estos países, el porcentaje de la proteína suministrada por los peces llega a ser más del 20% de la proteína total consumida por los humanos y seguramente es superior por las producciones y las pescas artesanales de las cuales se carece de datos. En términos de calorías, la contribución está cerca a 30,5 calorias/*per capita*/día. Los peces tienen un excelente valor nutritivo (Snook, 1984; Haard, 1995), alta digestibilidad y la razón de eficiencia de la proteína oscila entre 2,7 y 3,2 (Jhaveri *et al.,* 1984).

Con respecto a la seguridad alimentaria, los productores en Asia, especialmente China, Vietnam, India, Indonesia y Bangladesh, se han beneficiado del desarrollo de cultivos de especies de nivel trófico bajo, como las carpas, los barbos, las tilapias y el bagre Pangasius (FAO, 2012). De acuerdo con la FAO (2012) para el 2010 las tilapias y otros cíclidos produjeron cerca de 3,5 millones de toneladas, representando el cuarto grupo de peces de agua dulce en producción, después de las carpas cabezona y plateada, las carpas indias y las carpas herbívoras.

Las tilapias son hoy en día cultivados en todo el mundo, las cuales, además de la ventaja de ser de un nivel trófico bajo, tienen una apropiada composición nutricional, tanto en cuerpo completo como en filete, lo que la proyecta como adecuada para la nutrición humana. Algo importante del trabajo realizado por González y Brown (2006) es el

hecho que las tilapias niloticas objeto de su estudio, fueron alimentadas con fuentes de proteína de origen vegetal, posibilitando eliminar de los cultivos la harina de pescado como fuente de proteína, haciendo más sustentable su práctica. Estos autores encontraron que los porcentajes de extracto libre de carbono y nitrógeno fueron similares en el cuerpo entero (53.76y 6.96%, respectivamente), en el filete (47.06 y 6.75%, respectivamente), y carcasa (56,36 y 7.04%, respectivamente), mientras que los porcentajes de nitrógeno (N), azufre (S), y proteína fueron más altos en el filete (13,34, 1,34, y83,37%, respectivamente) que en el cuerpo entero (9,27, 0,62, y 57,97%, respectivamente) y carcasa (7,70, 0,39, y 48,15%, respectivamente); en todos los casos se presentan como porcentaje de la materia seca. El cuerpo entero de la tilapia es una excelente fuente de ácidos grasos ω3, calcio y fósforo, al ser comparado con el filete. La relación entre los ácidos grasos ω3:ω6 en este estudio fue de 0,47:1 en el cuerpo entero, y de 0,55:1 en el filete. Los autores comentan que la tilapia es buena fuente de vitamina D, ácido ascórbico y selenio, pudiendo incluso, ser utilizada para alimentar tripulantes de naves espaciales en viajes largos (González y Brown, 2006).

ACUICULTURA EN COLOMBIA

El inicio de la acuicultura en Colombia se remonta al año 1939 con la introducción de la trucha arcoíris, el objetivo no era precisamente la producción en sistemas confinados, y sí el reproblamiento de cuerpos de agua de la región Andina. Posteriormente fueron introducidos la Carpa *Cyprinus*

carpio (Linnaeus) y las Tilapias *Oreochromis* sp. (Linnaeus), estos dos últimos con el objetivo de hacer piscicultura en estanques. Para la década del 60 se introduce la tilapia pechiroja *Tilapia rendalli* (Boulenger) y justamente en ese momento se inician los estudios con especies nativas como Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner) en el Centro Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC). Para los años 80 se consigue la reproducción de la cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier) y se establece la producción de alevinos (Cruz-Casallas *et al.,* 2011). A partir de este momento se puede decir que nace oficialmente la piscicultura en Colombia, se consolidan empresas del sector privado que hasta hoy en día vienen jalonando la producción, se fortalecen los grupos de investigación de varias universidades (Universidad de los Llanos, Universidad de Córdoba, Universidad de Antioquia, Universidad del Magdalena, Universidad Surcolombiana, Universidad de Nariño y Universidad Nacional de Colombia) así como los cursos de pregrado y posgrado que se encargan de la formación del recurso humano.

Actualmente en Colombia la producción acuícola está representada por 5 especies: 4 peces de agua dulce que son Tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*, Tilapia roja *Oreochromis* sp (Linnaeus), y Cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier); y trucha arcoíris *Oncorhyncus mykiss* (Walbaum); adicionalmente una especie de crustáceo marino: camarón blanco *Littopenaeus vannamei*. Sin embargo, existen en el territorio nacional otras especies nativas que representan el 4% de la producción

nacional (Espinal *et al.*, 2005), teniendo aun muchos asuntos tecnológicos y ambientales por resolver. Por esta razón los grupos de investigación y los productores realizan esfuerzos para convertirlas en productos de interés viables y competitivos, es el caso de los bagres como el yaque *Leiarius marmoratus*, el blanquillo *Sorubim cuspicaudus*, los bocachicos *Prochilodus magdalenae* y *P. mariae*, el pirarucú *Osteoglossum bicirrhosum* y el yamu *Brycon amazonicus* (Spix y Agassiz) (Atencio-Garcia *et al.,* 2003; CCI, 2009; Yosa *et al.,* 2009; Garcia *et al.,* 2011; Cruz-Casallas *et al.,* 2011).

Un factor que resta competitividad a la acuicultura en Colombia es la limitada oferta de especies (Espinal *et al.,* 2005; Cruz-Casallas *et al.,* 2011), lo que dificulta la posibilidad de negociar en el mercado globalizado y competitivo que existe hoy. Por esto, es necesario usar herramientas de investigación que intenten de forma más ágil resolver los problemas en reproducción, larvicultura, nutrición y sanidad que aquejan a las especies nativas con potencial de producción piscícola. De acuerdo con Cruz-Casallas *et al.* (2011) una buena alternativa es la introducción de bagres nativos como el yaque *Leiarius marmoratus*.

FACTORES LIMITANTES DE LA ACUICULTURA

A pesar de existir una larga tradición de prácticas acuícolas en algunos lugares del mundo, aun es un sector de la producción de alimentos muy joven, con rápido

crecimiento y con problemas técnicos y ambientales, por lo que los gobiernos buscan, a través de esfuerzos nacionales e internacionales, dirigir la actividad hacia la sostenibilidad.

Como sucede con todas las especies animales en producción, con la intensificación surgen necesidades técnicas que deben ser resueltas a través de la práctica y la investigación. En acuicultura se ha generado investigación para determinar las condiciones ideales del agua de cultivo, las densidades de siembra y las dietas para las especies disponibles que se producen bajo condiciones locales (Overtuf, 2009). Adicionalmente a estos asuntos netamente técnicos de producción, hoy nos enfrentamos con requerimientos de orden ambiental y social fundamentales para tener sostenibilidad y alcanzar las expectativas que se han cifrado sobre la acuicultura de traer desarrollo rural y aliviar la pobreza en el mundo.

Entonces, hoy la industria acuícola tiene el desafío de hacer uso eficiente de los recursos naturales, ser ambientalmente responsable y entregar un producto, además de nutritivo, inocuo y funcional. El uso de mejores prácticas de manejo es la principal estrategia para mejorar el desempeño ambiental de la acuicultura (Boyd *et al.,* 2007); sin embargo, de acuerdo con Overtuf (2009) hasta hace poco la acuicultura fue considerada como una ciencia aplicada, antes de lo cual el progreso obtenido era más empírico, y con observación de los animales cultivados para definir condiciones óptimas para el cultivo.

A la acuicultura se le adjudican muchos impactos ambientales negativos (Tacon *et al.,* 2010), dentro de los cuales los más relevantes y criticados son la destrucción y la pérdida de hábitats (Stickney y Mc Vey 2002), el excesivo consumo de agua, la contaminación de los ambientes acuáticos con pesticidas y medicamentos (Tett, 2008), y los escapes de especies invasoras y su interacción con poblaciones silvestres (Svasand*et al.,* 2007; Chevassus-au- Louis y Lazard, 2009). Esto último puede ocasionar la disminución del recurso pesquero, lo cual se incrementa dramáticamente con el uso de harina y aceite de pescado (principales materias primas para los alimentos), y con la captura de semillas de peces de algunas especies de las que no se consigue la reproducción en cautiverio o es más costosa (Naylor *et al.,* 2000; Tacon y Metian, 2008; Leung y Dudgeon, 2008; Phillips y Subasinghe, 2008; Bosma y Verdegem, 2011). Existen otros impactos de orden social y económico por la reducción al acceso a los recursos por la población humana y el desplazamiento de comunidades de pescadores (Ronnback *et al.,* 2002; Viswanathan y Genio, 2001).

La harina de pescado es una materia prima de importancia crítica en el uso para los alimentos de animales (e.j pollos, cerdos) y para la acuicultura (e.j, salmon, trucha y camarones). Existe un gran precocupación por el incremento de la demanda por harina de pescado, por su efecto sobre el estancamiento en el suministro de peces pelágicos, otorgando insostenibilidad a los sistemas acuícolas (Kristofersson y Anderson, 2006). Tacon *et al*., (2010) aseguran que la sustentabilidad de la acuicultura está en riesgo, especialmente de los sistemas de producción con especies de valor y de alto nivel trófico

(carnívoros), a menos que estas industrias puedan reducir su dependencia de la captura de peces para el suministro de las principales materias primas y de semillas de peces para los cultivos.

Costa-Pierce y Page (2010) plantean varias alternativas para hacer de la acuicultura una actividad sustentable, dentro de ellas, dos resultan relevantes para el desarrollo de la temática del presente libro. Una de ellas es incrementar la investigación para descubrir ingredientes con características funcionales para las dietas de peces, buscando eliminar el uso de harina y aceite de pescado. También proponen desarrollar modelos ecológicos de acuacultura que permitan su interacción con el ambiente de forma responsable.

USO DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN ACUICULTURA

Gran parte de la investigación en acuicultura pretende responder preguntas sobre cómo mejorar el ambiente de cría, identificar alternativas para la alimentación eficiente, cómo mejorar aspectos sanitarios y ambientales y, asegurar la calidad del producto final para el consumo humano en cuanto a inocuidad y funcionalidad. Las técnicas moleculares modernas son una herramienta valiosa para responder estas preguntas y por lo tanto es necesario comprenderlas para poder aplicarlas entendiendo sus alcances y limitaciones. A continuación se describen algunos usos que en la actualidad se hacen de las técnicas moleculares en distintos ámbitos de la acuicultura.

Herramientas para la identificación de especies acuícolas y otros organismos usados en los sistemas de producción

Debido a la altísima diversidad de peces en el mundo, con frecuencia estos no pueden ser identificados con precision, especialmente cuando se sospecha de actividades ilegales, como traslado de especies acuícolas entre cuencas, venta de peces declarados en peligro de extinción como los citados en el Libro Rojo de los Peces de Colombia (Mojica *et al*., 2012) y cuando se requiere la correcta identificación de las especies para los cultivos y la investigación. Por lo anterior, las técnicas forenses son herramientas que pueden ser usadas en la identificación de las especies acuícolas y las de pesca. Las técnicas forenses incluyen el análisis del ácido desoxiribonucleico (DNA), el cual es hoy en día muy común para resolver crímenes en humanos y con uso cada vez más frecuente en especies animales no humanas. Las especies se diferencian en sus secuencias de DNA y la única porción de las secuencias (comparado con un código de barras de DNA) puede ser usado para comparar individuos con muestras conocidas geneticamente. Existe un número de referencias genéticas, conocido como Código de barra de la Life Initiative, la cual contiene una sección para peces conocida como FISH-BOL (www.fishbol.org) que incluye el código de barras para 7700 especies de peces, y el FishPopTrace (maritimeaffairs.jrc.ec.europa.eu/web/fishpoptrace) (FAO, 2010).

A través de estas técnicas también es posible identificar plenamente los microrganismos que se utilizan dentro de los nuevos sistemas de producción acuícola, como es el caso

de los organismos del biofloc (Avnimelech *et al.,* 2012), el perifiton (Azim *et al.,* 2005) y de los sistemas particionados de acuicultura con altas densidades de algas (Tidwell, 2012). Dentro de estos microorganismos se encuentran bacterias, hongos, protozoarios y algas que deben ser identificados con precisión para fines científicos.

Las técnicas moleculares también pueden ser empleadas para mejorar las condiciones de cultivo, buscando la asociación entre los organismos de cultivo con las bacterias benéficas y el control de aquellas que significan riesgos para el estatus sanitario del cultivo. De acuerdo con Overturf (2009) es importante conocer cuales son los miembros de una microbiota normal y cuales no, cuales tienen patogenicidad y cuales son susceptibles de convertirse en probióticos.

Potencial de la nutrigenómica en la alimentación acuícola y la disminución de los impactos ambientales de la acuicultura

El alimento balanceado elaborado para el sector acuícola representa el 8% del total de la industria de alimento para animales en producción y dentro de los costos de producción acuícola representa cerca del 60% (FAO, 2010). De otra parte, es reconocido que los alimentos acuícolas son la principal fuente de materia orgánica, amonio y fósforo que deterioran la calidad del agua en cultivo y en los cuerpos hídricos receptores del efluente (Boyd *et al*., 2007). En los sistemas tradicionales la conversión de proteína en carne de pescado es tan sólo del 15 al 30%, el resto es arrojado al medio ambiente generando contaminación (Acosta-

Nasar *et al*., 1994; Gross *et al*., 2000). Por estas razones, es necesario mejorar la eficiencia en el proceso alimenticio, con la elaboración de dietas adecuadas para obtener un mayor aprovechamiento y contaminar menos.

Existen problemas globales que afectan directa o indirectamente a la empresa acuícola en los asuntos de los alimentos balanceados como son el crecimiento desmedido de la población, el incremento en la demanda de alimentos para los humanos, la producción de biocombustibles, la contaminación de cuerpos de agua, las enfermedades generalizadas en los sistemas de producción, y el desconocimiento de nuevas materias primas aptas para optimizar las dietas artificiales que contribuyan en el rendimientos de la producción. Por tanto, es perentorio usar las herramientas tecnológicas para mejorar el bienestar de la población y el planeta en general, con mayor rendimiento en la producción de alimentos, eficiencia en el uso y protección de los recursos naturales (Giualdoni, 2010).

El rendimiento de cualquier organismo depende en parte de las condiciones ambientales y en parte de sus genes; asimismo, el conjunto de todos los genes de un individuo constituye su genoma. El conocer la secuencia de la información genética de un organismo o el código genético completo del mismo no necesariamente indica que el investigador pueda acercarse a diseñar animales más productivos de manera relativamente fácil, aun hace falta trabajar sobre la expresión de dichos genes (Lopez *et al*., 2003).

En la base de datos del genoma animal (Gregory 2005; http://www.genomesize.com) aparece información sobre el tamaño para varias especies de peces de cultivo: catfish *Ictalurus punctatus* (1,0 pg), tilapia *Oreochromis niloticus* (1,0 pg), carpa común *Ciprinus carpio* (1.8 pg), salmón del Atlántico *Salmo salar* (3,0 pg), trucha arcoíris *Oncorrynchus mykiss* (2,8 pg), sea bass rayado *Dicentrachus labrax* (0,9 pg), bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (0,9 pg), y sea bream dorado *Sparus auratus* (0,95 pg). Existe una relación directa entre el tamaño del genoma y la cantidad de tiempo, dinero y trabajo necesarios para obtener suficiente información que pueda ser usada en beneficio de la especie y su cultivo (Overtur, 2009).

Las últimas metas de la investigación en genómica acuícola son entender cómo la composición genética afecta la biología del organismo y desarrollar herramientas de diagnóstico para predecir el desempeño de la especie con base en los genes y el contenido del genoma de cada individuo (Overturf, 2009).

La nutrigenómica es la ciencia que estudia la expresión de los genes en relación con la nutrición y el desarrollo de enfermedades asociadas a dicha expresión. Se ha logrado establecer que los nutrientes pueden afectar la expresión génica, activando o desactivando ciertos genes. Los genes son los responsables de la mayor parte de la actividad celular día a día, de modo que su expresión tiene un impacto profundo sobre la salud y el desempeño de los individuos. Por tanto, la nutrigenómica es el estudio de la relación entre nutrientes y expresión génica (Kore *et al.,* 2008).

La nutrigenómica ofrece la posibilidad de mejorar la dieta (dieta personalizada) buscando evitar o retrasar la aparición de enfermedades asociadas a la interrelación entre genes y nutrición. El objetivo de la nutrigenómica en animales domésticos es estudiar los efectos de la dieta sobre los cambios en la expresión génica, o reglamentar métodos que pueden estar asociados con varios procesos biológicos relacionados con el papel de los nutrientes en la regulación de la salud y desarrollo animal (Kore *et al.,* 2008; Peralvo, 2010).

La nutrigenómica puede ser aplicada en acuicultura de diferentes maneras, especialmente en el área de resistencia a las enfermedades. La facilidad de obtener esta información sobre resistencia en animales vivos a través de la nutrigenómica puede ofrecer un rápido entendimiento científico en acuicultura. Asimismo, la pieza central del equipamiento en la investigación de la genómica –el microarreglo de DNA– puede ser adaptado para aplicaciones en áreas tales como la detección rápida de baja concentración de patógenos, de químicos perjudiciales en el agua y tiene un tremendo potencial en el área de seguridad en la alimentación y trazabilidad (Lopez *et al*., 2003).

Leaver *et al.,* (2008) basados en el precepto que los lípidos son la principal fuente de energía para los peces, así como los mecanismos por los cuales asignan energía para el metabolismo, desarrollo, crecimiento y reproducción, concluyen que estos son importantes para comprender las estrategias de la vida de los peces. Sucede que en las dietas

comerciales de peces el aceite de pescado es la principal fuente de lípidos, por lo que resulta importante reducir los niveles de aceite de pescado para disminuir la presión sobre el recurso pesquero, el cual ya llegó a su límite de extracción. Resulta insensato que el crecimiento de la producción acuícola deba ser soportado en el recurso pesquero, poniendo en mayor peligro los bancos naturales de peces. Por lo anterior, el empleo de técnicas moleculares y genómicas para el estudio del metabolismo de lípidos, específicamente ácidos grasos y ácidos grasos altamente insaturados, y como influyen los genes sobre el comportamiento son relevantes.

Los ácidos grasos y sus derivados son conocidos por regular directamente las actividades de una variedad de factores de transcripción cuyas funciones son el control de los genes responsables del metabolismo de ácidos grasos, colesterol y los hidratos de carbono (Jump, 2004). Estos factores de transcripción son proteínas; en los peces, estas proteínas y sus genes no han sido muy estudiados con excepción de los proliferadores de peroxisoma activados por los receptores (PPARs). Sin embargo, la disponibilidad de las secuencias genómicas de peces al menos haría posible identificar homólogos de estos genes importantes (Leaver *et al.,* 2008).

Este tipo de estudios tienen relación directa con la formulación de dietas óptimas para la alimentación de los peces en la acuicultura. La disponibilidad de las secuencias del genoma de peces está proporcionando la información crítica para facilitar gran parte de la investigación en esta

área. Un ejemplo reciente es del descubrimiento del gen de la leptina a través de la *in silico* (simulación por computador) utilizando el pez globo, y los enfoques de este tipo serán muy valiosos para la identificación y caracterización de nuevas hormonas en peces (Leaver *et al.,* 2008).

Los estudios de nutrigenómica en peces han dado ideas sobre las respuestas a los cambios en la dieta (Jordal *et al*., 2005). Por ejemplo, en pez halibut, dos estudios tuvieron como objetivos, primero, estudiar los cambios en la expresión de los genes asociados con el uso de dietas microparticuladas en varios estadios de desarrollo, y segundo, identificar los cambios en la expresión de los genes inducidos por el reemplazo de harina de pescado por harina de soya (Overturf, 2009). Estos reemplazos son necesarios por la alta demanda mundial de harina de pescado, la cual contribuye con el declino de los stocks de peces en el mar. Por tanto, se hace necesario usar fuentes proteicas alternativas como la harina de soya, siempre y cuando se obtengan resultados similares en crecimiento y no aparezcan efectos secundarios, como lo que sucede con los salmónidos cuando se incluye harina de soya, ocasiona inflamación en el intestino posterior (Bakke-McKellep et al. 2007). Sin embargo, esto no sucede en el halibut del Atlántico, por lo que se esta estudiando a través de microarreglos, en muestras de larvas alimentadas con harina de soya, los cambios en la expresión de los genes en el tracto gastrointestinal que indiquen las respuestas inflamatorias u otros procesos detrimentales de su condición (Overturf, 2009).

El proceso de larvicultura es uno de los más delicados en la producción de semillas para cultivo. Uno de los asuntos más cruciales es el suministro de un alimento que tenga la calidad necesaria en la cantidad suficiente y el tamaño apropiado para la boca de las pequeñas larvas. En las larvas de peces marinos, el uso de alimento vivo resulta una labor dispendiosa y muy costosa (Cahu *et al*., 2001). Por lo anterior, reemplazar alimentos vivos con dietas microparticuladas resultaría beneficioso económicamente si las ganancias de pesos fueran las mismas (Overturf, 2009).

Otro uso potencial para la nutrigenómica en acuicultura es con respecto a los alimentos funcionales. Existe suficiente evidencia científica para respladar la hipótesis que propone que a través de la modulación de funciones específicas en el cuerpo, la dieta puede traer beneficios fisiológicos y sicológicos al ser humano (Roberfroid, 1999). Esto puede lograrse por medio de los alimentos funcionales, que fueron definidos por Diplock *et al.* (2009) de la siguiente manera: "un alimento puede ser reconocido como funcional si es satisfactoriamente demostrado que más allá de su efecto nutricional, actúa beneficiando una o más funciones en el cuerpo, siendo pertinente para el bienestar y la salud o la reducción de riesgo de enfermedad". Con la divulgación sobre los alimentos funcionales, el público cada vez más preocupado por su salud, está muy interesado en las ventajas potenciales otorgadas por ciertos alimentos (Anne, 2007). Dentro de este grupo de alimentos, los peces poseen alta potencialidad por su alto contenido de ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por el ser humano y que en las proporciones adecuadas pueden

otorgar beneficios al consumirlos. Entonces, un alimento puede ser funcional a través de la aplicación de medios tecnológicos o biotecnológicos para incrementar, disminuir, remover o adicionar componentes que han sido demostrado tener efectos interesante.

Marcadores moleculares en reproducción acuícola

Un reto de la acuicultura es la diversificación y la reproducción controlada de nuevas especies de interés comercial. Sin embargo, en la mayoría de los casos la reproducción en cautiverio de estas nuevas especies sigue siendo un proceso poco controlado y aleatorio en gran parte de las instalaciones piscícolas. Estos problemas son, en parte, la consecuencia de alteraciones en las condiciones ambientales (ciclos de luz y temperatura) a las que se hayan sometidos los animales en cultivo, y que en muchos casos difieren sensiblemente de las condiciones que encuentran en el medio natural. Si a esto le aunamos los problemas asociados al desarrollo (viabilidad, malformaciones), el manejo (estrés, patologías), y la alimentación (piensos no formulados para la especie), resulta fácil comprender lo difícil que es incorporar nuevas especies para su producción en acuicultura (Carrillo, 2009).

Los marcadores genéticos son fragmentos o secuencias de DNA que se pueden relacionar con un rasgo genético, son variaciones que nos permiten caracterizar cepas, grupos, especies, poblaciones o grupos taxonómicos mayores y son comúnmente llamados polimorfismos (Frankham, 2003), los más comúnmente empleados en acuicultura

son: a) polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP); b) perfiles múltiples arbitrarios de amplificación entre estos los RAPD (polimorfismos del DNA amplificado con cebadores arbitrarios, SSCP (Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN), AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados); c) polimorfismo de restricción: numero variable de repeticiones en tándem o VNTR dentro de estos encontramos los microsatélites (STR – 2 y 5 nucleótidos) y minisatelites; d) Otros marcadores como SNP (variaciones de una sola base nucleotídica) y los EST (fragmentos de genes expresados) marcadores dependientes de secuencia (Montaño-Perez et al., 2006; Astorga, 2008).

Algunas especies de peces pasan un periodo relativamente largo hasta alcanzar su maduración sexual, por ello los métodos de selección genética tradicionales han evolucionado más lentamente que en el sector ganadero, por ejemplo en el salmón solo se han estudiado 10 generaciones en 20 años de investigación. Por éste motivo las técnicas moleculares de selección asistida por marcadores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible para acelerar la producción de progenies de peces con características ventajosas o deseables comercialmente (Lopez *et al*., 2003).

Los marcadores moleculares pueden ser orientados hacia la selección de reproductores buscando con esto seleccionar características como mayor tamaño, mejor conversión alimenticia, resistencia a enfermedades, resistencia al stress, asignación de parentesco entre los peces cultivados

para evitar problemas endogámicos, y la identificación de secuencias susceptibles de ser empleadas en la elaboración de organismos transgénicos (Lopez *et al*., 2003).

La genómica se aplica para entender la naturaleza genética (heredabilidad, varianza y correlaciones) de los rasgos deseables mediante la identificación de genes o regiones cromosomales que directamente influyen sobre dichas características (Dekkers y Hospital, 2002, Montaño-Perez *et al*., 2006). Se están desarrollando estudios en busca de loci polimórficos y usarlos como marcadores en la selección de reproductores, que apoyen programas de selección. Según Montaño-Perez *et al*. (2006) el desarrollo de marcadores moleculares ha tenido un impacto revolucionario en la genética animal permitiendo un rápido progreso en trabajos sobre variabilidad y cruzamiento, identificación de parentesco de especies y líneas, y construcción de mapas genómicos de especies acuáticas. Estos estudios a su vez, aceleran la identificación de genes involucrados en un rasgo característico de interés, los QTLs (Quantitative trait locus), para que la selección de los progenitores sea asistida por marcadores moleculares (Masojc, 2002; Liu y Cordes 2004).

Las tilapias son el grupo de peces de agua dulce más importantes y con la mayor expansión en la producción de la acuicultura en los últimos años (Fitzsimmons y González, 2005), pertenecen a la familia cichlidae, hay cerca de 3000 especies que en los últimos años han sido catalogadas como especies de mayor comercialización y aplicabilidad de sistemas productivos. Para alcanzar el máximo desempeño

de las especies dentro de los sistemas de cultivos y tener el mejor desempeño reproductivo es necesario trabajar de la mano con los marcadores moleculares, y apuntar a la selección estricta de genes que codifican a un mejor desempeño reproductivo y conservación del paquete productivo de las tilapias. En estas especies, los AFLP se ha utilizado para la construcción de mapas genéticos de tilapia del nilo *Oreochromis niloticus* (Kocher *et al.,* 1998) y para la búsqueda de QTLs de tolerancia al frío y ganancia de peso corporal en híbridos (Moen *et al.,* 2004). Monitorear cruces entre especies con intensión de obtener una tilapia mejorada, con mayor tolerancia al frío y salinidad (Agresti *et al.,* 2000) así como la inducción de ginogénesis (método tradicional de producción de líneas puras de peces) y para poder monitorear marcadores ligados o específicos del sexo (Ezaz *et al.,* 2004, Montaño-Perez *et al*., 2006).

Sukmanomom *et al.,* (2012) estudiaron los cambios genéticos intra e inter específicamente en tilapia del nilo en Tailandia, implementando catorce loci microsatélites para examinar los cambios genéticos de las cuatro cepas de tilapia del Nilo, derivados de tilapia genéticamente mejorada (GIFT) y dos cepas derivadas de una cepa local de Chitralada de tilapia del Nilo en Tailandia. Tres de las cuatro poblaciones derivadas de GIFT han conservado su pureza y no se redujo su variación genética. Sin embargo, la introgresión resultó en relativa elevada variación genética a las cepas originales Chitralada. Comprueba esta metodología una herramienta fundamental para identificar las variaciones genéticas cuando se empiezan cruces con tilapias objetos del proceso productivo y con el

pasar del tiempo sufren modificaciones en su desempeño productivo.

Es conveniente inferir que los marcadores moleculares unidos a la creatividad experimental y dedicación de los investigadores, pueden ofrecer en un mediano plazo la respuesta a muchos interrogantes planteados en la empresa acuícola en la etapa de reproducción, donde la carga genética ofrecida por un reproductor, previa selección por características fenoticas, no se ve reflejado en su progenie debido a que su componente genómico puede estar cargando recesivamente y no expresando un gen de crecimiento y resistencia tan anhelado por el productor. Para el caso puntual de las tilapias, estas deberán contener o copiar genes que transcriban características productivas superiores, capaces de afrontar los problemas de bajo crecimiento y vulnerabilidad a las enfermedades dadas por el manejo inadecuado y confinamiento como bacteriosis, myxobolus, hongos y demás patógenos que afectan el crecimiento.

La carga hibrida que portan las tilapias pueden ser a largo plazo un arma de doble filo, que necesita una renovación y selección de características puntuales que alejen un embotellamiento genético y expresen genes no amigables con el buen crecimiento y resistencia al cultivo.

Finalmente el uso de marcadores moleculares es el camino más corto en la franca búsqueda de genes asociados al crecimiento y potencial de cultivo en acuicultura y que estarían aportando biomasa (carne de pescado). Por lo anterior

y teniendo en cuenta el aumento de la población mundial, para mantener el consumo per capita hasta el año 2030 la acuicultura necesitará un sumistro adicional de 23 millones de toneladas de alimentos acuáticos (FAO, 2012). Dicha meta solo será alcanzable con tecnologías claras y organismos aptos genéticamente y de esta manera confirmar el precepto de que la respuesta al aumento de la productividad en la empresa acuícola: "Esta por dentro – en sus genes".

Uso de marcadores moleculares en el control de las enfermedades de los organismos acuáticos

Es posible que nos estemos aproximando a un importante hito. Después de un constante crecimiento, en especial durante los últimos cuatro decenios, la acuicultura está por primera vez en disposición de proporcionar la mitad del pescado consumido por la población humana mundial. Esto es un reflejo no sólo de la vitalidad del sector de la acuicultura, sino también del crecimiento económico mundial y de los avances continuados en la elaboración y comercio de productos pesqueros (FAO, 2009).

A nivel global el cambio climático está afectando la estacionalidad de determinados procesos biológicos, modificando con ello las redes tróficas marinas y de agua dulce, ritmos reproductivos y rendimientos en cultivo y calidad del agua, con consecuencias imprevisibles en la producción de la pesca y la acuicultura. Es también motivo de preocupación el aumento del riesgo de invasión por parte de otras especies y la difusión de enfermedades transmitidas a través de vectores (FAO, 2009).

Un manejo sanitario efectivo del cultivo acuícola consiste en prácticas y procedimientos que enfatizan la prevención de brotes de enfermedades infecciosas y no-infecciosas, resulta vital el establecimiento de planes de manejo sanitario que favorezcan la barrera protectora ante los ataques infecciosos. Los niveles de estrés manejados por los peces en cultivo – altas densidades, estructura de bajo volumen – han condicionado el éxito de la producción acuícola, y cada vez es más frecuente la presencia de enfermedades (virales y bacterianas) que influyen considerablemente en los aspectos económicos de la actividad (Yañez & Martínez, 2010).

La presencia de enfermedades en organismos acuícolas es generalizada, atacan crustáceos, moluscos y peces, y para efectos prácticos se hará énfasis en la piscicultura de salmones por ser considerados renglones de mayor aporte económico en la empresa productora acuícola.

El cultivo de salmónidos es una de las principales actividades relacionadas con la acuicultura a nivel nacional y una de las que genera productos acuícolas con mayor valor económico a nivel mundial (FAO, 2006). Al igual que en otros sistemas intensivos de producción animal, el éxito de esta actividad depende en gran medida del control de las enfermedades infecciosas. Un ejemplo claro del impacto que pueden ocasionar ciertas patologías en el cultivo del salmón, es la crisis que ha afectado durante los últimos años a la industria salmonicultora como consecuencia de los brotes del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA).

Dentro de las principales enfermedades bacterianas que afectan al cultivo de peces salmónidos en Chile se pueden mencionar la Piscirickettsiosis o síndrome rickettsial del salmón (SRS) para salmón del Atlántico *Salmo salar*, salmón coho *Oncorhynchus kisutch*y trucha arco-iris *Oncorhynchus mykiss* (Leal & Woywood, 2007); la enfermedad bacteriana del riñón (BKD), el síndrome del alevín de trucha arco iris (RTFS) y la enfermedad entérica de la boca roja (ERM). Entre las enfermedades virales más relevantes se encuentran la necrosis pancreática infecciosa (IPN), la necrosis eritrocítica viral (VEN) (Smith *et al.,* 2001) y recientemente el virus ISA.

Teniendo en cuenta que las enfermedades han tenido demasiada relevancia en la industria salmonicultora tanto en Europa, Norteamérica y Latinoamérica (caso Chile) y que las medidas utilizadas para la prevención y su tratamiento (vacunaciones, antibióticos, etc.) no muestran resultados significativos, resulta necesario desarrollar estrategias orientadas a establecer un control efectivo y sustentable de estas patologías. Es así que optar por el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades constituye una solución factible al problema (Stear *et al.,* 2001). Sin embargo, la investigación en este campo a la fecha ha sido escasa y con pocos trabajos publicados que apunten a determinar los factores genéticos que influencian la resistencia. No obstante, en la actualidad se llevan a cabo diversos proyectos de investigación que utilizan herramientas de genética cuantitativa y molecular, y de genómica funcional para identificar los factores genéticos asociados a la resistencia frente a las tres enfermedades económicamente más

relevantes para la industria del salmón: Piscirickettsiosis, IPN e ISA (Yáñez y Martínez, 2010).

Los programas de mejoramiento genético han incluido la resistencia a enfermedades solamente con base en la información de parientes, lo cual afecta el grado de progreso genético realizable en cada generación. Lo anterior se debe a que la precisión con la cual se predicen los valores genéticos utilizando información familiar es menor, comparada con la que se obtiene al utilizar la información de los propios candidatos a reproductores (Falconer y Mackay, 1996). Además, la selección familiar no permite utilizar la variación del muestreo mendeliano y, al mismo tiempo, es complicado manejar las tasas de consanguinidad a niveles aceptables cuando el número de familias es relativamente bajo (Martínez, 2007).

La información de marcadores moleculares ligados a los QTL y a genes de efecto mayor puede ser incluida en los programas de mejoramiento genético, en lo que se ha denominado selección asistida por marcadores (MAS) o genes (GAS). Estas metodologías pueden ser de gran utilidad en programas que incluyen caracteres complicados de medir en el propio candidato a la selección, como es el caso de la resistencia a enfermedades infecciosas (Meuwissen, 2003). Para poder implementar programas de MAS o GAS que incluyan la resistencia a enfermedades dentro del objetivo de mejoramiento, en primer lugar se deben conocer los factores genéticos que explican la variación cuantitativa para esta característica. En los últimos años se ha progresado en la

disección del componente genético implicado en la respuesta del hospedero frente a ciertos patógenos, principalmente utilizando modelos animales como pollo y ratón (Qureshi *et al.,* 1999). En salmónidos existe reducida información sobre la arquitectura genética de la resistencia a enfermedades, pero es de esperar que con el actual desarrollo y disponibilidad de recursos genómicos en estas especies y el mayor conocimiento sobre la biología de la respuesta inmune en teleósteos, se disponga en el futuro de mayores antecedentes sobre los QTL o genes involucrados en la variación del carácter.

La resistencia a enfermedades infecciosas se define como la capacidad del hospedero para iniciar y mantener respuestas dirigidas a prevenir el establecimiento de un agente infeccioso y/o eliminarlo del organismo. Seleccionar peces que incrementen su resistencia a enfermedades es un método factible para mejorar la productividad y el bienestar animal, lo que ofrece ventajas sobre otros métodos de control frente a las infecciones (Stear *et al.,* 2001). En Noruega, desde 1993 se ha incluido la resistencia a enfermedades virales y bacterianas dentro de los programas de mejoramiento convencionales en salmones (Gjøen y Bentsen 1996). Sin embargo, la metodología presenta dificultades con el criterio de selección utilizado para medir la resistencia.

Los salmónidos, no se encuentran al margen del desarrollo de nuevas técnicas para el análisis genómico. Se han utilizado consecuentemente herramientas en la identificación de los factores genéticos involucrados en la resistencia a enfermedades infecciosas en salmónidos. Las estrategias

utilizadas en el estudio están basadas principalmente en el análisis de genes candidatos, mapeo de QTL y en estudios de expresión génica (Yáñez y Martínez, 2010).

Los genes MHC (coplejo mayor de histocompatibilidad) han sido identificados, clonados y caracterizados en salmón del Atlántico, trucha arco-iris y en otros salmónidos (Shum *et al.,* 2002). Además, se ha demostrado que estos genes son altamente polimórficos en estas especies (Garrigan y Hedrick, 2001; Aoyagi *et al.,* 2002). Se ha analizado la asociación entre un polimorfismo ligado a genes MHC clase II y la resistencia frente al virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHN), en retrocruzas de trucha arco-iris y trucha cutthroat (*Oncorhynchus clarki*). En salmón del Atlántico se ha demostrado la asociación entre alelos MHC clase IIB específicos y la resistencia frente *Aeromonas salmonicida* (Langefors *et al.,* 2001; Lohm *et al.,* 2002).

Debido a la naturaleza poligénica de la resistencia a enfermedades, es importante considerar el trasfondo genómico y las interacciones que pueden ocurrir entre genes (epístasis), lo que dificulta aún más el análisis de genes candidatos individuales involucrados en la variación de la resistencia (Yañez y Martínez, 2010).

En salmónidos existe un gran número de microsatélites disponibles para su utilización en estudios genéticos (Phillips *et al.,* 2009). Basándose en el alineamiento de más de 100.000 secuencias de ESTs (Marcadores de secuencias expresadas) se han detectado más de 2.500 SNPs putativos en *Salmo salar*,

con una tasa de validación mayor a un 70% (Hayes *et al.,* 2007). En trucha arcoíris utilizaron AFLPs y microsatélites, detectado marcadores asociados con resistencia a IHN dentro de tres grupos de ligamiento diferentes (Rodríguez *et al.,* 2004). Para esta misma enfermedad se han detectado marcadores RFLPs asociados a familias resistentes y susceptibles, en retrocruzas de trucha arcoíris y trucha cutthroat (Palti *et al.,*1999). La información de estos QTL, junto con la secuenciación y el mapeo físico del genoma, facilitarán la determinación de las mutaciones involucradas en la resistencia, a través de estudios posicionales. Estas mutaciones podrán ser utilizadas directamente en programas de selección genética.

Según Yañez y Martinez (2010), a la fecha no existen estudios orientados a analizar la expresión diferencial entre peces resistentes y susceptibles para una determinada infección. La información entregada por este tipo de análisis puede ser utilizada en el descubrimiento de nuevos grupos de genes, con o sin una función asignada, que podrían estar relacionados con la resistencia a enfermedades. Sin embargo, se debe tener en cuenta que genes expresados diferencialmente pueden estar, probablemente, actuando en trans, es decir, cuya expresión está regulada por otros genes, lo que va a tener implicaciones al momento de asociar polimorfismos de éstos con la resistencia (Martínez, 2007).

Otra posibilidad es considerar los niveles de expresión diferencial como un carácter cuantitativo. Esto podría permitir la identificación de QTL asociados a diferencias en

los patrones de expresión génica, entre individuos resistentes y susceptibles (eQTL) (Pomp *et al.,* 2004). Sin embargo, aún es poco claro cómo la información entregada por análisis de expresión puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético (Walsh y Henderson, 2004).

Ante lo anterior se concluye que existe una reducida y dispersa información relacionada con los factores genéticos involucrados en la resistencia a enfermedades infecciosas en salmones. El empleo de herramientas moleculares será de vital importancia para identificar genes que tienen influencia de manera significativa sobre la variación de caracteres productivos en especies acuícolas.

Los microarreglos son un método para detectar cambios a nivel de un ácido nucleico o una proteína por hibridización de una muestra preparada sobre un slide o membrana de nylon conteniendo cientos o miles de puntos de secuencias complementarias o de anticuerpos (Overturf, 2009). El uso de microarreglos adecuadamente elaborados, hace posible correlacionar la expresión de genes con rasgos productivos relevantes para la industria acuícola mundial, por ejemplo, la resistencia a patógenos o al estrés ambiental.

Los microarreglos de DNA en salmónidos aparecieron por primera vez en la literatura en 2004 (Rise *et al*., 2004b), siendo usados para estudiar los genes y las vías moleculares involucradas en procesos normales y patológicos. Por ejemplo, el microarreglo 4K IMB y la RT-PRC fueron usadas para identificar en hígado, bazo y riñón craneal del salmón

del atlántico, los genes sensibles al patógeno *Aeromonas salmonicida* (Ewart *et al*., 2005).

La *Aeromonas salmonicida*, es el agente etiológico de la furunculosis, uno de los patógenos de peces más estudiados por los impactos económicos que tiene sobre la producción de salmones (Overturf, 2009). Los microarreglos de DNA bacterial también pueden ser utilizados para examinar los perfiles de transcripción y la expresión de los genes de las bacterias bajo condiciones seleccionadas. En la actualidad, se busca conocer los mecanismos de patogenicidad de este agente observando las diferencias en la expresión de los genes en varios estados de infección, en varios tejidos y en células bacterianas en crecimiento bajo ciertas condiciones de restricción como la ausencia de hierro (Overturf, 2009).

Podemos anotar que el hombre ha sido capaz de generar problemas a través de sus acciones (domesticación, intensificación, uso acelerado de recursos naturales, contaminación) aunque todas ellas con fines nobles: suplir la demanda mundial de alimentos y generar mayor bienestar al ser humano. Afortunadamente, el ingenio del ser humano también le ha permitido crear herramientas valiosas para enfrentar los problemas que los sistemas de producción animal padecen hoy. Los ejemplos de uso de las técnicas moleculares presentadas intentan resolver la problemática de la acuicultura, especialmente aquella que tiene que ver con los impactos ambientales causados, con el estatus sanitario de las poblaciones en cultivo, con la nutrición y con la selección de reproductores que permita un mejoramiento de las especies acuícolas.

REFERENCIAS

Acosta-Nassar MV, Morell JM, Corredor JE. 1994. The nitrogen budget of a tropical semi-intensive fresh water fish culture pond. J. World Aquac. Soc.; 25: (2), 261- 270.

Agresti JJ, Seki S, Cnaani A, Poompuang S, Hallerman EM, Umiel N, Hulata G, Gall GAE, May B. 2000. Breeding new strains of tilapia: Developmen of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture. 185: 43-56.

Anne S. 2007. The sustainability of functional foods. Social Science & Medicine, 64(3), p. 554–561.

Aoyagi K, JM Dijkstra, C Xia, I Denda, M Ototake, K Hashimoto, T Nakanishi. 2002. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J Immunol 168, 260-273.

Astorga MP. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No.12. Roma, FAO. pp. 277–287.

Atencio-García V, Kerguelén E, Wadnipar L, Narváez A. 2003. Manejo de la primera alimentaciòn del bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Revista MVZ Córdoba 8(1): 254-260.

Avnimelech Y. 2012. Biofloc technology. A practical guide book, 2d edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Azim ME, Verdegem MCJ, van Dam AA, Beveridge MCM. (Eds.) 2005. Periphyton— Ecology, Explotation and Management. CABI Publishing, Wallingford, 319p.

Bakke-McKellep AM, Koppang EO, Gunnes G, Sanden M, Hemre GI, Landsverk T, Krogdahl A. 2007. Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans. Journal of Fish Diseases. 30:65–79.

Bosma R, Verdegem MCJ. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limits. Livestock science, 139; 58-68

Boyd C, Tucker C, Mcnevin A, Bostick K, Clay J. 2007. Indicators of Resource Use Efficiency and Environmental Performance in Fish and Crustacean Aquaculture.Reviews in FisheriesScience, 15:327–360.

Cahu CL, Zambonin-Infante JL. 2001. Substitution of live food by formulated diets marine fish larvae. Aquaculture. 200:161–180.

Carrillo M. 2009. La reproducción de los peces- aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Fundación observatorio español de acuicultura. Madrid. 719 p.

CCI 2009. Pesca y acuicultura Colombia. Bogotá: Corporación Colombia Internacional, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 111p.

Chevassus-au-Louis B, Lazard J. 2009. Perspectives pour la recherche biotechnique en pisciculture. Cah. Agric. 18, 91–96.

Costa-Pierce, B.A. and G.G. Page. 2010, in press. Sustainability science in aquaculture. In: Costa- Pierce, B.A. (ed.), Ocean Farming and Sustainable Aquaculture Science and Technology. Encyclopedia of Sustainability Science and Technology. Springer Science, N.Y.

Cruz-Casallas PE, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM. 2011. Fish farming of native species in Colombia: current situation and perspectives. Aquaculture Research, 42, 823-831

De-Shou Wang, Tohru Kobayashi, BalasubramanianSenthilkumaran, Fumie Sakai, CheniCherySudhakumari, Taiga Suzuki, MichiyasuYoshikuni, Masaru Matsuda, Ken-ichirouMorohashi, Yoshitaka Nagahama. 2002. Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 297, Issue 3, 27 September, Pages 632-640.

Dekkers JCM, Hospital F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. Nature Rev. Genet. 3: 22-32

Diplock A T, Aggett P J, Ashwel M, Bornet F, Fern E B, Roberfroid M B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. British Journal of Nutrition 81 (Suppl. 1), S1-S27.

Espinal GC, Martínez CH, González RF. 2005. La cadena de la piscicultura en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica, 1991-2005 Documento de Trabajo No. 106. 41p

Ewart KV, Belanger JC, Williams J, Karakach T, Penny S, Tsoi SCM, Richards RC, Douglas SE. 2005. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (Salmo *salar)* in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. Developmental and Comparative Immunology. 29:333–347.

Ezaz MT, Harvey SC, Boonphakdee C, Teale AJ, McAndrew BJ, Penman DJ. 2004. Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in nile tilapia (*Oreochromiss niloticus* L.). Mar. Biotechnol. 6: 435-455.

Falconer DS, TFC Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Essex, UK.

FAO. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. State of world aquaculture. FAO Fisheries technical paper. No 500. Rome, Italy.

FAO. 2009. Departamento de pesca y acuicultura. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. 218p.

FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuícultura. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma, 242 p.

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuícultura. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma, 231p

FAO. 2005. FAO Yearbooks of Fishery Statistics: Summary Tables. Aquaculture Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fitzsimmons K, Gonzalez-Alanis P. 2005. Cultivo de tilapia – Una revision. In: Memorias de la segunda reunion nacional de la red de tilapia. 2do Foro Internacional de Acuicultura. Instituto Nacional de la Pesca. SAGARPA. Hermosillo, Sonora 115-144.

Frankham R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comp. Rend. Biol.* 326: 22-29.

García JJ, Celis LM, Villalba EL, Mendoza LC, Bru SB, Atencio VJ, Pardo SC. 2011. Evaluación del policultivo de bocachico *Prochilodus magdalenae* y tilapia *Oreochromis niloticus* utilizando superficies fijadoras de perifiton. Med. Vet. Zoot. 58(II), mayo-agosto: 71-83

Garrigan D, Hedrick PW. 2001. Class I MHC polymorphism and evolution in endangered California Chinook and other Pacific salmon. Immunogenetics 53, 483-489.

Gjøen HM, Bentsen HB. 1997. Past, present and future of genetic improvement in salmon aquaculture. ICES J Mar Sci 54, 1009-10014.

Gonzales J, Brown P. 2006. Nile tilapia Oreochromis niloticus as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. Advances in Space Research 38, 1132–1137

Gregory TR. 2005. Animal Genome Size Database. (http://www.genomesize.com)

Gross A, Boyd CE, Wood CW. 2000. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. Aquac. Eng. 24:1– 14.

Giualdoni G. 2010. Perspectivas de la acuicultura a nivel global. Tendencia mundial en sistemas y nutrición en acuicultura. Jornada Nacional de Acuicultura - 29 de junio- Avellaneda, Argentina. 39p. http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/agoindustrializacion/JornadaNacionalAcuicultura2010/Gualdoni_PerspectivasAcuiculturaNivelGlobal.pdf

Haard N. 1995. Composition and nutritive value of fish proteins and othernitrogen Compounds. In: Ruiter, A. (Ed.), Fish and Fishery Products:Composition, Nutritive Properties and Stability. CABI, Oxford, pp.77–116

Hayes B, Laerdahl JK, Lien S, Moen T, Berg P, Hindar K, Davidson WS, Koop BF, Adzhubei A, Høyheim B. 2007. An extensive resource of single nucleotide polymorphism markers associated with Atlantic salmon (Salmo salar) expressed sequences. Aquaculture. 265: 82-90.

Jhaveri S, Karakoltsidis P, Montecalvo J, Constantinides S. 1984. Chemicalcomposition and protein quality of some southern New Englandmarine species. J. Food Sci.49. 110–113.

Jordal AE, Torstensen BE, Tsoi S, Tocher DR, Lall SP, Douglas SE. 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (Salmo *salar* L.). Journal of Nutrition. 135:2355–2361.

Jump D B. 2004. Fatty acid regulation of gene transcription. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.,41: 41–78.

Kocher TD, Lee W-J, Sobolewska H, Penman D, McAndrew B. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (Oreochromis niloticus). Genetics 148: 1225-1232.

Kore KB, Pathak AK, Gadekar YP. 2008. Nutrigenomics: Emerging face of molecular nutrition to improve animal health and production. Veterinary World. Vol. 1: 285-286.

Kristofersson D, Anderson JL. 2006. Is there a relationship between fisheries and farming? interdependence of fisheries, animal production and aquaculture. Marine Policy 30, 721–725.

Langefors A, J Lohm, M Grahn, O Andersen, T von Schantz. 2001. Association between major histocompatibility complex class IIB. Alleles and resistance to Aeromonas salmonicida in Atlantic salmon. Proc R Soc Lond B Biol Sci 268, 479-485

Leal J, Woywood D. 2007. Piscirickettsiosis en Chile: Avances y perspectivas para su control. SalmoCiencia. 2, 34-42.

Leaver MJ, Bautista JM, Björnsson B T, Jönsson E, Krey G, Tocher DR, Torstensen BE. 2008. Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-FishAquaculture, Reviews in Fisheries Science,16:S1, 73-94.

Leung KMY, Dudgeon D. 2008. Ecological risk assessment and management of exotic organisms with aquaculture activities. In: Bonda- Reantaso, M.G., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.), Understanding and Applying Risk Analysis in Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture TP 519, pp. 67–100.

Liu ZL, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238: 1-37.

Lohm J, M Grahn, Å Langefors, Ø Andersen, A Storset, T von Schantz. 2002. Experimental evidence for major histocompatibility complexallele-specific resistance to a bacterial infection. Proc R Soc Lond. B Biol Sci 269, 2029-2033.

López M, Mallorquín P, Vega M. 2003. Genómica de especies piscícolas – Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España – Sector

Agroalimentario. Fundación española para el desarrollo de la investigación en Genómica y proteomica, fundación general de la Universidad Autónoma De Madrid. Madrid, España. 104 p.

Lyons M. 2008. "Queremos fomentar la innovación tanto a nivel local como global". Articulo publicado en: http://www.aqua.cl/entrevistas/imprimir_entrevista.php?doc=195.

Martínez V. 2007. Marker-assisted selection in fish and shellfish breeding schemes. In: Marker-Assisted selection - Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. FAO, Rome, Italy, Pp 329-362.

Masojc P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. Cel. Mol. Biol. Lett. 7: 499-509.

Meuwissen THE. 2003. Genomic selection the future of marker-assisted selection and animal breeding. In: Marker-assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? FAO, Rome, Italy.

Leaver M, Bautista JM, RnThrandur B, Rnsson B, Elisabeth Jo¨ Nsson, GrigoriosKrey, Douglas r. Tocher, Bente E. Torstensen. 2008. Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish Aquaculture. Reviews in Fisheries Science, 16(S1):73–94.

Moen T, Agresti JJ, Cnaani A, Moses H, Famula TR, Hulata G, Gall GAE, May B. 2004. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on link-age group 23. Aquacult. Res. 35: 893-904.

Mojica J I, Usma J S, Álvarez-León R, Lasso C A (Eds). 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales. Bogotá, D. C., Colombia, 301 pp.

Montaño-Perez K, Villalpando- Canchola E, Vargas-Albores F. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en Acuicultura. Caracas – Venezuela. *Interciencia,* Vol 31: 8. 563-569.

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. 2000. Effects of aquaculture on world fish supplies. Nature 405, 1017–1024.

Overturf K, 2009. Molecular research in aquaculture. 1st edition. Willey-Blackwell Publishing, USA. 407 p.

Peralvo D. 2010. La Nutrigenómica el futuro de la nutrición animal. AGRYTEC. Agrytec.com.

Phillips RB, KA Keatley, MR Morasch, AB Ventura, KP Lubieniecki, BF Koop, RG Danzmann, WS Davidson. 2009. Assignment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) linkage groups to specific chromosomes: conservation of large syntenic blocks corresponding to whole chromosome arms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). BMC Genet 10, 46.

Phillips MJ, Subasinghe RP. 2008. Application of risk analysis to environmental issues in aquaculture. In: Bonda-Reantaso, M.G., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.), Understanding and Applying Risk Analysis in Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture TP 519, pp. 101–119.

Pomp D, MF Allan MF, Wesolowski SR. 2004. Quantitative genomics: exploring the genetic architecture of complex trait predisposition. J. Anim Sci 82, 300-312.

Qureshi ST, Skamene E, Malo D. 1999. Comparative genomics and host resistance against infectious diseases. Emerging Infect Dis, 5, 36-47.

Rise ML, von Schalburg KR, Brown GD, Mawer MA, Devlin RH, Kuipers N, Busby M, Beetz-Sargent M, Alberto R, Gibbs AR, Hunt P, Shukin R, Zeznik JA, Nelson C, Jones SRM, Smailus DE, Jones SJM, Schein

JE, Marra MA, Butterfield YSN, Stott JM, Ng SHS, Davidson WS, Koop BF. 2004. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: Data mining and interspecific hybridization characteristics. Genome Research. 14:478–490.

Roberfroid M. 1999. What is beneficial for health? The concept of functional food. Food and Chemical Toxicology, 37(9-10), 1039–1041.

Ronnback P, Bryceson I, Kautsky N. 2002. Coastal aquaculture development in Eastern Africa and the Western Indian Ocean: Prospects and problems for food security and local economies. Ambio 31, 537–542.

Rothschild MF, Soller M. 1997. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. Probe 8, 13-20.

Shum BP, Mason PM, Magor KE, Flodin LR, Stet RJ, Parham P. 2002. Structures of two major histocompatibility complex class I genes of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Immunogenetics 54, 193-199.

Smith P, Larenas J, Vera P, Contreras J, Venegas C, Rojas ME, Guajardo A. 2001. Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria 21, 3-19.

Snook J. 1984. Nutrition, A Guide to Decision Making. Prentice-Hall, UpperSaddle River, 551 pp.

Stear MJ, Bishop SC, Mallard BA, Raadsma H. 2001. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res Vet Sci* 71, 1-7.

Stickney KI, McVey JP. (Eds.). 2002, Responsible Marine Aquaculture, New York, CABI Publishing.

Sukmanomon S, Kamonrat W, Poompuang S, Nguyen TT., Bartley DM, May B, Na-Nakorn U. 2012. Genetic changes, intra-and inter-

specific introgression in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. *Aquaculture.* 324-325: 44-54

Svasand T, Crosetti D, Garcia-Vasquez E, Verspoor E. (Eds.). 2007. Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report , EU contract n◦ RICA-CT-2005-022802, http://genimpact.imr.no/.

Tacon AGJ, Metian M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285, 146–158.

Tacon AGJ, Metian M, Turchini GM, De Silva SS. 2010, Responsible aquaculture and trophic level implications to global fish supply. Rev. Fish. Sci. 18, 94–105.

Tett P. 2008. Fish farm wastes in the ecosystem. In: Holmer M., Black K., Duarte C.M., Marba N., Karakasis I. (Eds.) Aquaculture in the ecosystem, Doordrecht, Springer.

Tidwell J. 2012. Aquaculture production systems. 1st edition. Willey-Blackwell Publishing, USA. 421 p.

Viswanathan K, Genio E, 2001. Socioeconomics of responsible aquaculture in Asia, In: Garcia L.M.B. (Ed.) Proceedings of the Seminar-Workshop on Responsible Aquaculture Development in Southeast Asia. SEAFDEC Aquaculture Department, 12–14 October 1999, Iloilo City, Philippines, Southeast Asian Fisheries Development Centre (SEAFDEC), pp. 89–97.

Walsh B, Henderson D. 2004. Microarrays and beyond: what potential do current and future genomics tools have for breeders? *J Anim Sci*. 82:292-299.

Yáñez JM, Martínez V. 2010. Factores genéticos que inciden en la resistencia a enfermedades infecciosas en salmónidos y su aplicación en programas de mejoramiento. Arch Med Vet 42, 1-13.

Yossa MI, Hernández-Arévalo G, Vásquez-Torres W. 2009. Efecto del "coporo" *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prohilodontidae), sobre la calidad del agua en sistema de policultivo. Actual. Biol. 31(supl, 1) 199.

CAPÍTULO 6

Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos

Néstor Javier Mancera-Rodríguez[1],
Edna Judith Marquez[2],
Julio Cesar Hurtado-Alarcón[3]

[1] Biol, PhD. Grupo Ecología y Conservación de Fauna Silvestre. Posgrado en Bosques y Conservación Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
[2] Biol, PhD. Departamento de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
[3] Zoot, MSc, PhD(c). Laboratorio de Biología Molecular y Celular Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

La información de la estructura genética en especies de peces es útil para optimizar la identificación y el manejo de stocks pesqueros, programas de cría en cautiverio, manejo de producción sostenible, y preservación de diversidad genética de las poblaciones naturales, entre otros. Este trabajo ofrece un panorama del uso de la citogenética y las técnicas moleculares en la determinación de la variabilidad genética de poblaciones, las ventajas, limitaciones y potencialidades de su uso, y presenta consideraciones del uso de los peces en investigación genómica y de las perturbaciones en poblaciones por origen antropogénico mediante un análisis de biología molecular en genética de poblaciones y estudios filogenéticos. Se analizó la información secundaria de trabajos de investigación publicados y literatura gris disponible. Se concluye que en Colombia la aplicación de técnicas para el estudio genético de las poblaciones de peces es baja, aunque se observa un mayor desarrollo de estudios genéticos en las dos últimas décadas. En un país como Colombia en el que las especies presentan poblaciones sometidas a procesos de deterioro de su hábitat y fragmentación de ecosistemas con la consecuente pérdida de conectividad que limita el flujo genético, es importante el mantenimiento de la diversidad a

nivel genético para la conservación de la diversidad biológica y se hace necesario tener un mejor conocimiento de este componente que permita disponer de mejores herramientas para la planificación de estrategias de conservación y manejo de las poblaciones de peces.

Palabras clave: conservación, peces tropicales, diversidad, marcadores moleculares.

INTRODUCCIÓN

Los peces son el grupo más diverso de todos los vertebrados, aunque el número exacto de especies aún está por determinar. Cerca de 28.900 especies se enumeraban en FishBase en 2005 (Lévêque *et al.,* 2008), pero Nelson (2006) estima el número total de especies de peces en cerca de 32.500. Para Colombia en el año 2008 se habían estimado 1.435 especies de agua dulce (Maldonado-Ocampo *et al.,* 2008) con la más alta diversidad de especies de peces de montaña dentro de la región Andina, con aproximadamente 220 especies, de las cuales cerca del 37 % es endémica (Jaramillo-Villa *et al.,* 2010), y más de 2000 especies marinas (Mejía y Acero 2002). Sin embargo, los peces sufren unas fuertes amenazas por sobreexplotación, modificación del régimen hídrico, la destrucción de hábitats, la invasión de especies exóticas, la pérdida de la cobertura vegetal de las cuencas, la alta presión sobre recursos hidrobiológicos, la contaminación,

y la sedimentación, entre otras, que actúan disminuyendo sus poblaciones naturales, poniendo en riesgo de extinción a muchas especies.

Debido a que la pérdida de diversidad genética está usualmente asociada a procesos de endogamia y a la reducción total de la reproducción y supervivencia (*fitness*) (Frankham *et al.,* 2004), el principal organismo internacional de conservación, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética a nivel global, para que las poblaciones evolucionen y se adapten a los continuos cambios ambientales. Teniendo en cuenta la alta diversidad biológica del neotrópico, son relativamente pocos los estudios en genética de peces en América del Sur, posiblemente por falta de recursos económicos, motivación o interés en la aplicación de estos conocimientos para un uso sostenible de los recursos pesqueros (Barletta *et al.,* 2010). Sin embargo, diferentes autores han tenido en cuenta aspectos de conservación genética, para analizar la estructura y la ecología en diferentes en poblaciones y comunidades de peces, lo que ha sido de valiosa utilidad para realizar recomendaciones de manejo y consecuentemente, mantener o incrementar su variabilidad genética (Scribner *et al.,* 1998, Artoni y Almeida 2003, Pineda-Santis *et al.,* 2004, 2007, López 2006, Piorski *et al.,* 2008, Hurtado-Alarcón 2009, Hurtado-Alarcón *et al.,* 2011).

La genética de poblaciones naturales de peces y la aplicación de principios y métodos genéticos en el estudio

de la biología y manejo de pesquerías, ha estimulado el interés en factores relacionados con la dinámica y resiliencia de especies explotadas. Temas como la conectividad entre poblaciones de peces (Cowen *et al.,* 2006, Treml *et al.,* 2008), las escalas espaciales y temporales de la diferenciación poblacional (Jørgensen *et al.,* 2005, Ruzzante *et al.,* 2006), el tamaño efectivo poblacional (Hauser *et al.,* 2002, Waples y Yokota 2007), la evolución inducida en las especies de pesquerías (Marshall y Browman 2007), el análisis de la variación adaptativa en poblaciones silvestres de peces (Conover *et al.,* 2006) y la invasión de especies (Blanchet 2012), ayudan a entender los mecanismos de la abundancia y distribución de peces. Así mismo, contribuyen conceptualmente con las teorías ecológicas y evolutivas (Hauser y Carvalho 2008). Mientras que las aproximaciones clásicas se enfocan típicamente en factores que conducen a cambios demográficos en poblaciones de peces en el corto plazo –cambio cuantitativo–, las aproximaciones genéticas evalúan los cambios totales en la composición de las poblaciones cambio cualitativo, lo cual influye tanto alteraciones en el corto plazo como características fenotípicas y la respuesta en el largo plazo hacia perturbaciones naturales y de origen humano (Frankham 2005).

Por otra parte, existen otras aproximaciones dadas por estudios genéticos para llevar a cabo estudios evolutivos y de variabilidad genética de peces en escala de especie. Estas aproximaciones incluyen estudios de citogenética, útiles para evaluar características únicas tales como los genes ribosomales, los cuales pueden mapearse en diferentes

cromosomas mediante técnicas de la citogenética molecular como FISH (*Fluorescence In Situ hybridization,* Hibridización fluorescente in situ), ayudando en la determinación de marcadores útiles en estudios de relaciones filogenéticas entre diferentes especies y poblaciones de peces (Ghigliotti *et al.,* 2010).

En el presente capítulo se aborda el uso de la citogenética y las principales técnicas moleculares para la evaluación de variabilidad genética en peces, presentando las ventajas, limitaciones y potencialidades de su uso y haciendo una revisión de la información secundaria de trabajos de investigación publicados y de literatura gris disponible en Colombia. Igualmente, se presentan consideraciones del uso de los peces en investigación genómica y del efecto de perturbaciones de origen antropogénico en poblaciones de peces mediante un análisis de biología molecular en genética de poblaciones y estudios filogenéticos.

CITOGENÉTICA Y TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA EVALUACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN PECES

El desarrollo y la aplicación de marcadores citogenéticos ha sido importante en la definición de características propias en la escala de especie, así como en estudios filogenéticos (Oliveira *et al.,* 2009, Ghigliotti *et al.,* 2010). Por otra parte, el uso de marcadores moleculares altamente polimórficos en estudios de poblaciones silvestres, ha sido sumamente

valioso especialmente en los campos de la conservación y genética de poblaciones (Haig 1998). La variabilidad genética permite realizar comparaciones entre poblaciones o especies, ayudando a resolver preguntas de importancia evolutiva y puede ser de utilidad en estudios de ecología y sistemática en diferentes áreas (Avise 2004). Las herramientas básicas usadas en estudios de variabilidad genética son los marcadores moleculares, cuyas variaciones pueden ayudar a encontrar similitudes en el nivel taxonómico y entre poblaciones. Existe una gran variedad de marcadores moleculares, los cuales permiten el análisis de regiones de ADN nuclear (RAPDs, microsatélites, etc) y mitocondrial (ADNmt), así como de regiones de ARN (Panarari-Antunes *et al.,* 2008), los cuales poseen la habilidad de hallar secuencias con diferentes patrones de herencia, diferentes modos y tasas de mutación, y diferentes niveles de variación genética (Scribner *et al.,* 1998; Jiménez y Collada 2000), en escala poblacional y de especie.

Estudios citogenéticos en peces

Usualmente los estudios citogenéticos se realizan con el fin de determinar el cariotipo de las especies y un idiograma en donde se consigna el número, clasificación y estructura cromosómica. Sin embargo, en los análisis de variabilidad genética se trata de buscar polimorfismos cromosómicos asociados a poblaciones geográficas que permitan determinar la estructura poblacional y la implicación en procesos reproductivos.

Los estudios citogenéticos usualmente involucran técnicas de bandeo que pueden dividirse en dos grupos: (1)

técnicas que generan bandas distribuidas en toda la longitud del cromosoma como las bandas G útiles para caracterizar el tipo de cromatina (Sumner *et al.,* 1971), rearreglos estructurales y determinación de cromosomas homólogos con exactitud; y (2) técnicas de bandeo que generan bandas en número restringido y localizadas en sitios específicos del cromosoma, como las bandas C centroméricas útiles para determinar heterocromatina constitutiva altamente repetida (Sumner 1972 y Martínez–Lage *et al.,* 1994) y las Regiones Organizadoras del Nucléolo -RON- útiles para determinar localización de regiones nucleolares y variación en la actividad fisiológica de acuerdo al número de RON´s activos (Howell y Black 1980). En el caso de no detectar polimorfismos específicos de poblaciones, se utilizan bandas C pancentroméricas detectadas por hibridación de sondas especificas marcadas fluorescentemente (FISH) (Clabby *et al.,* 1996) y sondas de ADN ribosomal (ADNr) (Zhang *et al.,* 1999, Xu *et al.,* 2001 y Cross *et al.,* 2003).

Los peces tienen un número cromosómico muy estable, es decir, conservado evolutivamente, considerándose que el cariotipo ancestral en los peces es de 24 cromosomas acrocéntricos del cual se derivaron los cariotipos de los peces modernos, cambios que se fijaron después de 100 millones de años de evolución (ver Burbano 2001). Los estudios de citogenética en peces han sido útiles en el análisis de la tendencia evolutiva, filogenia y rearreglos cromosómicos (Thompson 1979, Galetti *et al.,* 1984, Venere y Galetti 1989, Salas y Boza 1991, Feldberg *et al.,* 1992, Nakayama *et al.,* 2002, Feldberg *et al.,* 2003, Corrêa-Benzaquem *et al.,* 2008,

Nakayama *et al.,* 2012), estudios de biodiversidad (Bertollo *et al.,* 2000, Fenocchio *et al.,* 2000), clasificaciones taxonómicas (Uribe-Alcocer *et al.,* 1983, Durán- González *et al.,* 1990), caracterización de polimorfismos sexuales (Bertollo *et al.,* 2000, Sola *et al.,* 1990), determinación de hibridaciones para mejoramiento de la producción y la viabilidad de genotipos (Salas y Boza 1991, Burbano 2001, Porto-Foresti *et al.,* 2004) y en la observación de polimorfismos y especiaciones (Sola *et al.,* 1990, Bertollo *et al.,* 2000, Nakayama *et al.,* 2001, 2012). Los estudios de citogenética también han proporcionado información valiosa sobre las relaciones evolutivas entre especies de peces, la aparición de especies crípticas y complejos de especies, el mecanismo de la determinación del sexo y la evolución de los cromosomas sexuales, la distribución de las regiones organizadoras del nucléolo, los cromosomas supernumerarios, la existencia y la relación del entre poliploidía y la evolución (Oliveira *et al.,* 2009).

Para peces del neotrópico, en el año 2009 Oliveira y colaboradores realizaron un análisis general de los datos disponibles de citogenética, encontrando que la mayoría de las investigaciones se ha concentrado principalmente en especies de aguas continentales. Hallaron información disponible de cerca de 850 especies de peces del superorden Ostariophysi (475 especies de Characiformes, 318 especies de Siluriformes y 48 especies de Gymnotiformes), de 199 especies de otros superórdenes, y sólo 109 especies de peces marinos. Para las especies estudiadas, sólo un 6% presenta cromosomas sexuales y alrededor del 5% tienen cromosomas supernumerarios o cromosomas B (Oliveira *et al.,* 2009).

En *Hoplias malabaricus*, una especie sedentaria y depredadora de aguas continentales que se distribuye por algunas de las principales cuencas en Sur América, se han encontrado diferentes cariomorfismos dentro de la misma cuenca. Esta especie ha sido estudiada a escala citogenética debido a que ha mostrado diversificación cariotípica conspicua, con más de siete cariomorfismos diferentes agrupados en tres clases con números cromosómicos que varían entre 2n=39-42. La falta de híbridos entre cariomorfismos simpátricos de *H. malabaricus* ha sido interpretada como evidencia de la existencia de varias especies diferentes dentro de un taxón nominal (Bertollo *et al.,* 1986, 2000). Sin embargo, Santos y colaboradores en 2009, usando sondas FISH para la subunidad 5S del ADN ribosomal nuclear y evaluando regiones del gen que codifica para el complejo enzimático ATPasa 6, encontraron que los patrones citogenéticos y moleculares de variación genética en esta especie podrían revelar eventos de vicarianza y dispersión involucrados en procesos evolutivos en escalas biogeográficas amplias (Santos *et al.,* 2009).

En Colombia, se destacan trabajos en citogenética de peces como el realizado por De Greiff y Montoya en 1988 para cuatro especies del género *Brycon* (Characidae): *B. henni* (ríos Guatapé y Porce y quebradas de los municipios de Fredonia y Caracolí, Antioquia), *B. fowleri* (estación de Choromandó en Apartadó, Antioquia), *B. moorei* sinuensis (río Sinú y estación Piscícola de la Universidad de Córdoba, Córdoba) y *B. medemi* (río Combia, municipio de Fredonia, Antioquia). En este trabajo, se estableció la posible existencia

de cromosomas sexuales y un número diploide modal para *B. henni* y *B. medemi* de 48 (2n = 48) y para *B. fowleri* y *B. morei sinuensis* de 46 (2n = 46). Estos autores destacan un alto grado de variabilidad en el número y la morfología en escalas inter e intraespecíficas, y en escalas inter e intrapoblacionales para las cuatro especies (De Greiff y Montoya 1988). Otros estudios han logrado la caracterización cromosómica de las especies ícticas nativas guapucha (*Grundulus bogotensis*) y capitán (*Eremophilus mutisii*) del embalse del Neusa en Cundinamarca, Colombia, en la que se observó un número básico de 2n = 50 cromosomas y 2n = 54 para estas dos especies, respectivamente, sin evidencias de dimorfismo sexual cromosómico para ambas especies (González *et al.,* 1989).

Para especies de la familia Pimelodidae se ha reportado un número diploide de 2n=56 cromosomas (Camacho 1999, Camacho y Burbano 1999 y Camacho *et al.,* 2002). Estos últimos autores realizaron trabajos para estandarizar la técnica de cultivo de linfocitos de estas especies, lo cual condujo a la determinación de su número de cromosomas y del tipo de bandeo cromosómico. En ese estudio, se halló fragilidad cromosómica en un cromosoma homólogo del par 10 de las especies *Pseudoplatystoma magdaleniatum* y *P. Tigrinum* en las cuencas de los ríos Magdalena y Orinoco, respectivamente. Para el capitán enano, *Trichomycterus bogotense*, el cual es un pequeño bagre del río Bogotá, Bohórquez (2000) encontró un número cromosómico de 2n=54, así como la presencia de un rearreglo cromosómico posiblemente asociado a un mecanismo de adaptación

relacionado con la disminución del número de individuos de la población por endogamia (Bohórquez 2000).

Se han detectado además diferencias en rearreglos cromosómicos en los procesos de especiación en blanquillo (*Sorubim sp*.), entre *Sorubim lima* y *S. cuspicaudus* en el río Sinú, presentándose una inversión en una región organizadora del nucleolo del cromosoma 11, lo cual se ha pensado permitió que una región heterocromática terminal en el brazo del cromosoma 11 de *S. lima* pasara a una posición media en el brazo largo en el cromosoma 12 de la especie *S. cuspicaudus*. Estos hallazgos han revelando diferencias importantes entre los ejemplares del blanquillo de distribución transandina y los de las cuencas del Amazonas y Paraná, apoyando las diferencias morfológicas, morfométricas y merísticas que sustentan su descripción como especies diferentes (Valenzuela 2001).

Silva (2001) encontró para el bocachico, *Prochidolus magdalenae,* en la madrevieja del río Guarinó en la cuenca del Magdalena, un número diploide de 2n=54 cromosomas y la presencia de un par grande de cromosomas metacéntricos como posible mecanismo de determinación sexual que encaja en un sistema ZZ/ZW. Parada *et al.,* (2003) estudió el cariotipo de *Brycon Amazonicus*, encontrando que el primer par de cromosomas metacéntricos es de tamaño superior al del resto de los cromosomas del cariotipo, característica común para las especies del género *Brycon* por lo que se ha considerado como marcador cromosómico en los bricónidos. Así mismo en 2008, David-López *et al.,* no encontraron

dimorfismo sexual en cariotipos de B. henni, mostrando en los análisis de las metafases mitóticas un número diploide de 2n=50 cromosomas, difiriendo de esta forma de lo hallado por De Greiff y Montoya en el año 1988 (David-López *et al.,* 2008).

Estudios de variabilidad genética usando marcadores bioquímicos y moleculares en peces

Estudios de Electroforesis de Aloenzimas e Isoenzimas

El análisis de propiedades electroforéticas de aloenzimas (enzimas con función idéntica pero distintos patrones de migración electroforéticos codificados por diferentes alelos del mismo locus) e isoenzimas han sido aplicados al estudio de peces en el neotrópico por diferentes autores como Levy *et al.,* (1998), Beheregaray y Levy (2000) quienes lo usaron para establecer variaciones a nivel poblacional en peces marinos, y Freitas *et al.,* (2003) para verificar posible estructuración genética usando polimorfismos de isoenzimas en peces de arrecifes coralinos. También los polimorfismos de isoenzimas han sido útiles para revelar la presencia de especies cripticas (Solé-Cava *et al.,* 1983, Solé-Cava y Levy 1987), evaluar diferenciación intraespecifica separando poblaciones que divergen por separación geográfica (Renno *et al.,* 1990), investigar aspectos evolutivos (Avise y Selander 1972, Powers y Schulte 1998), taxonómicos (Chiari y Sodre

1999, Zawadzki *et al.,* 2000), filogenéticos (Mamuris *et al.,* 1999) y a la delimitar las poblaciones de especies explotadas comercialmente (Revaldaves *et al.,* 1997).

El uso de aloenzimas e isoenzimas en especies de peces en Colombia destaca los trabajos realizados por Gallo (2000), Gallo y Díaz-Sarmiento (2003) quienes estudiaron la variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* a través del análisis de 15 loci codificadores de proteínas en muestras de tejido hepático tomadas en tres localidades del río Magdalena, estableciendo valores promedio de heterocigocidad muy bajos y la ausencia de polimorfismos en los sistemas enzimáticos evaluados. Ramírez Gil (2001) utilizó las isoenzimas para evaluar la variabilidad entre las poblaciones de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum,* dos especies de pimelódidos en las cuencas del Orinoco y del Amazonas sin encontrar variaciones en el nivel de la enzima.

Montaño-Arias (2001, 2003) estudió la variabilidad genética de estas mismas especies en ocho poblaciones de los ríos Orinoco, Magdalena y Caquetá, encontrando que las dos especies tienen valores cercanos al de poblaciones conespecíficas y que intrapoblacionalmente hay una amplia diversidad genética en ambas especies. Igualmente, Montaño-Arias *et al.,* (2002) y Montaño-Arias y Gallo (2003) estudiaron la genética de las poblaciones de *P. fasciatum* de diferentes zonas del río Magdalena por medio de electroforesis de alozimas en 20 loci encontrando que hay una reducción drástica de la variabilidad genética en cerca de un 80 por ciento, Montaño-Arias (2008) analizó la variabilidad genética

de esta misma especie en los sectores del alto río Meta y el bajo Guaviare en Inírida, con quince sistemas isoenzimáticos y Montaño-Arias *et al.,* (2010) para esta misma especie en las localidades de La Dorada (cuenca del Magdalena) y Leticia (cuenca del Amazonas), observaron ciertas diferencias estructurales a partir del patrón electroforético de 10 locus, reconociendo algunos alelos privativos y otros de baja frecuencia, y encontrando relativa heterogeneidad basada en el aislamiento reproductivo por las condiciones geográficas de las cuencas, en donde la variabilidad debe ser evaluada a nivel intrapoblacional para tener una idea más clara de la dinámica actual de cada cuenca. Estos autores señalan que los individuos sufren procesos dispersivos (mutación, deriva, selección) o sistemáticos que explicarían la coexistencia de genes deletéreos. Otros estudios desarrollados con isoenzimas se han realizado para las especies cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en la Amazonía colombiana (Montaño-Arias y Forero 2003).

Estudios con marcadores moleculares de ADN

Estudios con marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente)

La técnica de marcadores RAPD´s (*Random Amplifyed Polimorphic DNA* – Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente) (Williams *et al.,* 1990), permite obtener

información de una forma más sencilla sobre especies de las cuales no se tiene una información previa de sus secuencias, generando datos con mayor variación que la electroforesis de aloenzimas, pero con la desventaja de que la contaminación, la preparación de muestra y las mismas condiciones de PCR pueden reducir su confiabilidad y reproducibilidad debido al uso de cebadores aleatorios (Black 1993). Este marcador molecular es una herramienta útil para evaluar polimorfismo genético en las poblaciones estudiadas y obtener información sobre su diversidad genética, sin tener un conocimiento previo de la genética de la especie en cuestión (Barman *et al.,* 2002, Barfai *et al.,* 2003), como lo exigen marcadores moleculares como los microsatélites y RFLP's (Hartl y Clark 1997, Kang *et al.,* 2006, Moreira *et al.,* 2007). Sin embargo, el alineamiento de cebadores al azar, no garantiza que las bandas que co-migran sean homólogas (homoplasia), y con la desventaja para los estudios de genética poblacional en donde se prueban las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, de que los RAPDs son marcadores dominantes, por lo que no es posible detectar los heterocigotos a menos que se cuente con el cebador que amplifique el otro alelo (Black 1993, Loxdale y Lushai 1998).

En Sur América los marcadores RAPD´s han sido usados para determinar el nivel de diferenciación genética intre e interpoblacional de *Hoplias malabaricus* en Brasil encontrándose alta diversidad genética entre los ríos Paraná y Tibagi y sugiriendo la presencia de especies no descritas (Dergam *et al.,* 1998) y han presentado aportes importantes para conocer aspectos de eventos filogeográficos de la especie

(Dergam *et al.,* 2002). Igualmente, se han usado ampliamente en varias especies de peces del género *Brycon* - (*B. lundii*, Wasko y Galetti 2002; B. cephalus, Wasko *et al.,* 2004; *B. henni*, Pineda-Santis *et al.,* 2004, 2007, Hurtado-Alarcón 2009, Hurtado-Alarcón *et al.,* 2011; *B. hilarii*, Sanches y Galetti, 2007; B. orbignyanus, Lopera-Barrero *et al.,* 2006, 2008), así como en otras especies de peces de la familia *Characidae* (Pineda-Santis *et al.,* 2004) y en *Oreochromis niloticus* (Povh *et al.,* 2005, Vieira *et al.,* 2005).

En Colombia, Ramírez Gil (2001) establece diferencias entre las poblaciones de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* de las cuencas del Orinoco y del Amazonas sobre la base de los resultados de RAPD para ambas especies. Para la Cuenca del Magdalena se ha realizado la caracterización genotípica así como la evaluación de su estructura poblacional con marcadores moleculares RAPD para *Brycon henni* (Pineda-Santis *et al.,* 2004, 2007, Hurtado-Alarcón 2009, Hurtado-Alarcón *et al.,* 2011, Mancera-Rodríguez *et al.,* 2012). Pareja (2002), estudió la variación genética de cinco poblaciones naturales y una en cautiverio de *Brycon henni* en el departamento de Antioquia, encontrando dos grandes grupos según la zona geográfica de procedencia de los individuos, diferenciándose las poblaciones pertenecientes a la cuenca del río Cauca de aquellas pertenecientes a la cuenca del río Magdalena (Pareja 2002). Igualmente, se han realizado análisis de marcadores RAPD con diferentes juegos de cebadores, los cuales permitieron estimar variabilidad genética y estructura poblacional de la especie (Pineda Santis *et al.,* 2004, 2007). Hurtado-Alarcón (2009),

Hurtado-Alarcón *et al.,* (2011) encontraron diferenciación genética entre las poblaciones de *Brycon henni* muestreadas en las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, en Antioquia, explicada por los movimientos de migración que realiza esta especie (laterales cauce principal-quebradas-cauce principal y movimientos río arriba), y aumentada por el efecto de los embalses manteniendo un bajo flujo genético entre las poblaciones.

Estudios con AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados de ADN)

La técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y versatilidad de detección de polimorfismos mediante PCR (López-Macías *et al.,* 2009). Esta técnica se basa en la amplificación selectiva de fragmentos genómicos previamente digeridos con enzimas de restricción a los cuales se les ha ligado adaptadores de ADN. Esta técnica puede utilizarse sin el conocimiento previo de la secuencia nucleotídica del organismo bajo estudio, genera información sobre un gran número de loci, lo que permite hacer una exploración rápida de todo el genoma y en comparación con RAPD, exhibe un alto grado de reproducibilidad. Sin embargo, como todo marcador dominante no permite identificar heterocigotos, los sitios de corte suelen ubicarse en los centrómeros y telómeros de los cromosomas, y metodológicamente es una técnica dispendiosa, de difícil

estandarización debido a que requiere ADN de excelente calidad y la separación de los fragmentos se hace usualmente en grandes geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Sin embargo, algunos de estos problemas técnicos se podrían mejorar si se utilizan cebadores marcados fluorescentemente y la separación de fragmentos se hace un secuenciador de ADN automatizado.

Los análisis de AFLP se han aplicado en varias especies de peces como Tilapia (*Oreochomis spp*) por Agresti *et al.,* (2000); en trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) por Young *et al.,* (1998) y en *Ictalurus spp.* por Liu *et al.,* (1998). Para Colombia, Guerrero (2003), Guerrero y Burbano (2004) evaluaron la estructura genética de las poblaciones del blanquillo *Sorubim cuspicaudus* en la cuenca del rio Sinú a partir de marcadores moleculares AFLP's encontrando 55 loci polimórficos en la población estudiada con un alto grado de endogamia y una subestructuración entre baja a moderada, y Lamprea *et al.,* (2004a) presentan las modificaciones realizadas para extracción de ADN y los protocolos para la obtención de marcadores AFLP para *Sorubim cuspicaudus*.

López-Macías *et al.,* (2009) estudiaron la estructura genética de las poblaciones de bocachico *Prochilodus magdalenae* en estaciones de captura del río Cauca mediante el marcador molecular AFLP, con el propósito de evaluar la variabilidad y tasas de migración, y de esta manera establecer el efecto de las barreras fisiográficas y contaminantes del río Cauca sobre el genoma de esta especie íctica, encontrando cinco subpoblaciones de bocachico y

una separación poblacional estadísticamente significativa entre tres subpoblaciones con la mayor heterocigosidad promedio esperada, en la población de La Balsa (0.365) y la menor en Riofrío (0.039) y valores FST, y Nm que indican una estructura genética con moderado intercambio de genes y constituida por poblaciones separadas por barreras contaminantes y fisio-hidrográficas.

Estudios con secuenciación de regiones del ADN mitocondrial en peces

El ADN mitocondrial es una molécula circular, presente en múltiples copias (102-104 por célula), presenta herencia materna, se replica sin recombinación y presenta una tasa de evolución mayor que la del genoma nuclear (Avise 2004, Saccone *et al.,* 2000). Los genes mitocondriales son ampliamente usados en genética de poblaciones y estudios evolutivos a diferentes niveles de divergencia. Los polimorfismos de secuencias de nucleótidos de genes con rápida evolución se utilizan para evaluar relaciones entre taxas recientemente divergentes (Avise 2004, Simon *et al.,* 1994, Page y Holmes 1998). Por su herencia uniparental, uno de los cuidados que deben tenerse con el uso de secuencias de ADN mitocondrial, es la posibilidad de que ocurran fenómenos de hibridación o introgresión génica en la especie bajo estudio, los cuales no puede ser discriminados por esta técnica.

En peces, el ADN mitocondrial ha sido útil en la evaluación de peces reintroducidos de una línea genética específica (Danzmann *et al.,* 1991). Esto debe mencionarse puesto que usualmente las empresas generadoras de energía llevan a cabo programas de repoblamiento de peces (Daley 1993), y son pocas las compañías que realizan análisis de variabilidad genética de poblaciones naturales. Sin embargo, un programa exitoso de rehabilitación debe mantener o incrementar la diversidad genética de las especies silvestres afectadas, debido a que la variabilidad genética es primordial para mantener la capacidad de los peces reintroducidos para adaptarse a condiciones ambientales fluctuantes (Avise 2004).

La región control, la principal secuencia no codificante del ADN mitocondrial, constituye una de las regiones más variables en peces. Ésta región se caracteriza por un desplazamiento de bucle, conocido como D-loop, el cual es un segmento de ADN que marca el comienzo de la duplicación de la molécula de ADN. Esta región control contiene secuencias altamente polimórficas, y su tasa de sustitución nucleotídica es entre 2-5 veces más rápida que la observada en genes que codifican para proteínas. Debido a que las mutaciones sea acumulan más rápidamente en la región control, ésta es la secuencia de ADN mitocondrial más elegida para realizar estudios genéticos poblacionales y evolutivos, entre especies muy relacionadas y entre diferentes poblaciones de una misma especie, incluyendo peces (Aboim *et al.,* 2005, Kang *et al.,* 2005).

Hrbek *et al.,* (2005, 2007) en Sur América, usaron secuencias de ADN mitocondrial para evaluar la hipótesis nula de no diferenciación genética basado en un modelo de aislamiento por distancia que permiten plantear estrategias de conservación en la especie Arapaima gigas. Evaluaron dos regiones discontínuas de los genes NADH1 y ATPasa, en 139 indivíduos de A. gigas de ocho sitios diferentes de la cuenca del río Amazonas en Perú y Brasil, encontrabndo 34 haplotipos diferentes separados por 44 sitios segregantes (Hrbek *et al.,* 2005, 2007).

Igualmente, se han realizado análisis genéticos y filogenéticos de poblaciones del género *Prochilodus* basados en secuencias de ADN mitocondrial (Sivasundar *et al.,* 2001, Turner *et al.,* 2004, Ortí *et al.,* 2005). Sivasundar *et al.,* (2001), utilizaron secuencias de las subunidades 6 y 8 del gen que codifica para ATPasa, para inferir las relaciones filogenéticas de especies de *Prochilodus* en 21 especímenes de este género en las cuencas de los ríos Paraná, Amazonas, Orinoco y Magdalena. Encontraron que cada cuenca hidrográfica contiene un grupo monofilético de linajes de ADN mitocondrial, y en el orden de ramificación los ejemplares de la cuenca del Magdalena tienen una posición basal con posterior derivación del Orinoco, Amazonas y Paraná. Los haplotipos de *P. magdalenae* (cuenca del Magdalena) se separaron de todos los demás haplotipos de ADNmt de *Prochilodus* por al menos 4%. Las distancias genéticas entre peces en las cuencas de los ríos Paraná, Amazonas y Orinoco fue menor, entre 0,8% y 2,5% (Sivasundar *et al.,* 2001). Por su parte, Turner *et al.,* (2004), realizó un análisis flogeográfico

con ADN mitocondrial para el género *Prochilodus* en el que incluyó muestras de *P. magdalenae* para estimar las tasas de mutación para los genes de ADN(mt) estudiados, encontrando para el gen ND4 que la especie divergía en un 10.39% con relación a otras especies del género. De manera similar, *P. magdalenae* se diferenció del resto de especies evaluadas en un 5,39%, con relación al gen que codifica para el complejo citocromo oxidasa I –COI. Tomando ambos loci juntos, *P. magdalenae* fue 7.12% divergente de otras especies de *Prochilodus*. La divergencia de nucleótidos entre *P. magdalenae* y el resto de especies de *Prochilodus* implica que el promedio del sitio por las tasas de mutación (m) de estos genes que codifican la proteína es $0{,}52 \times 10^{-8}$ para la región ND4, $0{,}27 \times 10^{-8}$ para la región COI, y $0{,}36 \times 10^{-8}$ para ambos genes (Turner *et al.,* 2004).

Estos dos trabajos apoyan la idea de que el aislamiento geográfico de linajes a través de los drenajes principales es una parte importante del proceso de especiación en el género, ya que las hipótesis basadas en ADN mitocondrial de relaciones de las especies de *Prochilodus* son consistentes con evidencia geológica documentada del surgimiento de la Cordillera Oriental 10 millones de años atrás (Lundberg *et al.,* 1998) como un evento de temprana separación vicariante que aisló las poblaciones de peces en el sistema de la cuenca del río Magdalena. Por su parte, Ortí *et al.,* (2005) estudió 5 de las 13 especies incluidas en el género *Prochilodus (lineatus, nigricans, rubrotaeniatus, mariae, y magdalenae*) con base en secuencias de la región control del ADN mitocondrial y del tercer intrón de un gen nuclear, encontrando 87 haplotipos

únicos diferentes y separando claramente las cinco especies en grupos monofiléticos relacionados con su distribución geográfica (Ortí *et al.,* 2005). De forma similar, Ochoa-Orrego *et al.,* (2009), discriminaron 14 especies de peces migratorios en la cuenca del río Magdalena usando el código de barras genético, el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad1 (*cox1*) (Ochoa-Orrego *et al.,* 2009).

Mancera-Rodríguez *et al.,* (2012) realizaron el análisis de secuencias de la región control de ADN mitocondrial para ejemplares de sabaleta *Brycon henni* en las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, Colombia, encontrando diferencias genéticas entre ambas cuencas (Mancera-Rodríguez *et al.,* 2012). Para la Orinoquia, Oliveira *et al.,* (2010) estudió la genética poblacional mediante la secuenciación del gen mitrocondrial citocromo b y genotipificación de cuatro loci microsatélites para 51 individuos de arawana azul (*Osteoglossum ferreirai*), encontrando que los resultados del citocromo b indicaron ausencia de sitios variables y los microsatélites mostraron heterocigosidad observada significativamente menor a la esperada, indicando pérdida de diversidad genética. Estos autores, compararon los resultados obtenidos con un estudio previo en Brasil, realizado en la arawana plateada (*Osteoglossum bicirrhosum*) concluyendo que el tener regulación en la pesca puede favorecer la diversidad genética de la población, ya que la pesca parece ser el factor que más contribuye a la pérdida de diversidad en esta especie.

En especies marinas del neotrópico, Rocha-Olivares y Sandoval-Castillo (2003), evaluaron la diversidad

mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas de *Lutjanus peru*. Rocha-Olivares *et al.,* (2006), detectaron estructura genética en la especie pelágica *Coryphaena hippurus* usando RFLPs del gen mitocondrial NADH1 para poblaciones del pacífico. Por su parte, Olivares *et al.,* (2010) realizaron la identificación de las especies *Mugil lisa, Mugil curema* y *Mugil cephalus* usando RFLPs del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) encontrando que los patrones de restricción generados empleando la endonucleasa *Hae III* permitieron la obtención de un perfil único para cada especie y Sotero-Caio y Baker (2010) evaluaron la filogeografía de siete especies de la familia Mugilidae en Brasil, buscando esclarecer el status taxonómico de *M. liza* y *M. platanus* empleando los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) de 650pb y 16S rRNA de 600pb mostrando claramente la existencia de seis clados correspondientes a las especies analizadas con excepción de *M. liza* y *M. platanus* que formaron un sólo clado con una distancia genética de 0,025 sugiriendo que ambas constituyen una sola especie.

Estudios con regiones de ADN microsatélite

Los microsatélites son una serie de motivos de repeticiones cortas (2-13 pb) en el ADN nuclear, constituyen uno de los marcadores genéticos neutros más ampliamente utilizados en estudios evolutivos y ecológicos. Su popularidad radica en su cercana ubiquidad, generalmente alto nivel de polimorfismo, facilidad relativa para rastreo una vez se han aislado y exhiben herencia mendeliana y codominancia (Jarne y Lagoda 1996). Debido a que solo unas pocas copias

son suficientes para la amplificación por PCR, son de invaluable valor en estudios de conservación de poblaciones contemporáneas, así como el análisis genético temporal a largo tiempo utilizando ADN antiguo (Hutchinson et al . 2003). Se recomiendan cuando otros marcadores no muestran un adecuado grado de polimorfismo.

Sin embargo, las ventajas potenciales de los microsatélites también pueden aumentar la incidencia de errores de genotipificación que conllevan a una deficiencia de heterocigotos (Shaw *et al.,* 1999), los cuales sesgan potencialmente el análisis genético de la población porque causan desviaciones de las proporciones HW de una manera similar a los ocasionados por procesos biológicos tales como endogamia, apareamiento asociativo o efecto Wahlund. Varios factores parecen influenciar los errores en la genotipificación: *(i) Concentraciones pequeñas del ADN molde* (Wandeler *et al.,* 2003), que puede resultar en fallas de amplificación debido al error de muestreo estocástico (allelic dropout, Miller y Waits 2003), (*ii) Amplificación preferencial de alelos pequeños* donde el alelo más grande falla específicamente para amplificar (por ejemplo alelo grande marginado o dominancia del alelo pequeño, Wattier *et al.,* 1998), *(iii) Alelos nulos* que no pueden ser amplificados debido a mutaciones que ocurren en los sitios de alineamiento del primer, produciendo patrones de falsos homocigotos (Shaw *et al.,* 1999), *(iv) Homoplasia* en el que no es posible discriminar si dos fragmentos de igual tamaño realmente corresponden a dos secuencias diferentes, *(v) Artefactos de amplificación*, se producen por deslizamiento de la ADN polimerasa durante

la amplificación PCR lo cual genera productos "tartamudos" que difieren del molde original por múltiplos de la longitud de la unidad de repetición (Shinde *et al.,* 2003). Son comunes en loci de dinucleótidos, haciendo difícil discriminar entre homocigotos y heterocigotos. Otro artefacto es el conocido como bandas sombra (Litt *et al.,* 1993) o "Pico +A", el cual se forma por el deslizamiento de la Taq polimerasa durante PCR y por la habilidad de esta polimerasa para adicionar una base extra al extremo de los fragmentos amplificados en una manera dependiente del molde (Hu 1993). Aun cuando este último artefacto puede ser reconocido por un ojo experimentado, puede conducir a malas interpretaciones cuando el software determina automáticamente los alelos de la muestra. Por lo anterior, el operador debe chequear visualmente todas las trazas y la asignación que el software hace del alelo, lo cual consume tiempo y promueve errores humanos después de unos pocos chequeos, y *(vi) Artefactos de electroforesis* (Prithiviraj *et al.,* 2001) que se producen cuando se utilizan altas concentraciones de productos PCR en secuenciadores automatizados (Ej. ABI 377). Su ocurrencia está relacionada con la sensibilidad del primer y optimización de las condiciones de amplificación y pueden causar dos clases de errores de genotipificación, uno es la falsa identificación de homocigotos ciertos como heterocigotos y el otro, la asignación incorrecta del alelo en los heterocigotos ciertos, siendo el primero el más común.

A la fecha se han propuesto varias alternativas para solucionar los problemas de genotipificación de microsatélites, entre las que se destacan:

1. Hacer seguimiento de los errores de genotipificación e identificar sus causas para aclarar los datos y validar los resultados finales de acuerdo a la precisión requerida (Bonin *et al.,* 2004). Específicamente se recomienda: (i) tomar precauciones eficientes para prevenir contaminaciones y artefactos técnicos, (ii) usar sistemáticamente muestras ciegas y automatización, (iii) experiencia y rigor en el trabajo del laboratorio y registro y (iv) reporte sistemático de la tasa de error en los estudios de genética de poblaciones.

2. Procurar la escogencia de tetranucleótido y trinucleótidos, en lugar de dinucleótidos, para eliminar efectos que confunden los alelos falsos (Taberlet y Luikart 1999).

3. Control de la concentración de ADN y número de ciclos de PCR. La eliminación de artefactos de electroforesis manipulando la concentración del molde de ADN o el número de ciclos PCR, requiere optimización específica de locus y posiblemente específica de muestra, lo cual constituye una opción ineficiente en estudios a gran escala. La optimización de la pre-PCR de las concentraciones del molde tampoco es posible donde las cantidades del ADN molde varían entre las muestras y en la presencia de ADN no blanco, como con fuentes de ADN subóptimas tales como heces.

4. Diluciones de productos PCR en corridas posteriores. Aun cuando esta alternativa podría ser usada para solucionar los artefactos de electroforesis, el requerimiento de pre-corridos es una opción ineficiente en estudios a gran escala.

5. Precorrer los geles a 3KV por una hora antes de que la muestra se cargue cuando se genotipifica con secuenciadores ABI 377, para evitar artefactos de electroforesis.

6. Uso de la ADN polimerasa *Pfu* durante o después de PCR para eliminar el pico sombra (Ginot *et al.,* 1996). Se ha encontrado que en algunos casos la enzima Pfu no es capaz de remover estos extremos probablemente por competencia entre su actividad exonucleasa y la extendasa de la Taq polimerasa, ya que ambas enzimas son activas a 72ºC. La utilización de la polimerasa *Pfu* sola durante PCR, evita los problemas de adición de base extra (Hu 1993) y se ha usado exitosamente en genotipificación fluorescente (Pritchard *et al.,* 1995), pero su eficiencia es más baja que la de la *Taq* polimerasa, lo que hace necesario precipitar las muestras durante análisis múltiple.

7. Uso de la ADN polimerasa T4 después de PCR para eliminar el pico sombra (Ginot *et al.,* 1996). Se pensaba que la T4 actuaba solamente sobre fragmentos de doble cadena y que era capaz de remover eficazmente la base extra, pero se ha encontrado que en algunas ocasiones la remoción depende de la muestra y que el error del 5% del Genotyper se reduce solo en un 0.25% (Ginot *et al.,* 1996). Estos autores encontraron que la T4 también actúa sobre fragmentos de cadena sencilla lo cual significa que su concentración debe ajustarse dependiendo de la concentración del cebador usado.

8. Uso de programas que permitan detectar errores en la genotipificación (Valière 2002, Ewen et al . 2000, Marshall *et al.,* 1998, Oosterhout *et al.,* 2004, Matsumoto *et al.,* 2004).

En el caso de peces suramericanos han sido publicados marcadores microsatélite para un número limitado de especies como *Piaractus mesopotamicus* (Calcagnotto *et al.,* 2001), *Astyanax fasciatus* (Strecker, 2003), *Arapaima gigas* (Farias

et al., 2003), *Brycon opalinus* (Barroso *et al.,* 2003, 2005), *Eigenmannia sp.* (Moysés *et al.,* 2005), *Pseudoplatystoma corruscans* (Revaldaves *et al.,* 2005), *Brycon hilarii* (Sanches y Galetti, 2006) y *Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et al.,* 2006), *Prochilodus argenteus* (Barbosa *et al.,* 2006, 2008), *Zungaro jahu* (Carrillo-Avila *et al.,* 2009), *Salminus hilarii* (Viana-Silva y Silva-Hilsdorf 2011), *Prochilodus lineatus* (Rueda *et al.,* 2011). Otros trabajos se han implementado con el fin de obtener datos de diversidad genética a través de técnica de marcadores microsatelitales como los desarrollados para *Piaractus mesopotamicus* (Povh *et al.,* 2008), *Brycon insignis* (Kayoko-Matsumoto y Silva-Hilsdorf 2009); *Colossoma macropomum* (Santos *et al.,* 2009) y para plantear estrategias de conservación en *Arapaima gigas* (Hrbek *et al.,* 2007).

Para Colombia, Rueda *et al.,* (2011) evaluó la diversidad alélica de 13 nuevos *loci microsatellite* en cinco especies del genero *Prochilodus* de Suramérica, incluyendo ejemplares de *P.magdalenae* del río magdalena encontrando que al menos nueve de los *loci* se puede aplicar de forma segura para estudiar la diversidad genética y estructura de la población en diferentes especies de *Prochilodus* y determinó **n** número de alelos por locus entre 4 y 11 (n = 8 individuos), y valores de heterocigocidad para de *P.magdalenae* observada entre 0.0 y 1.0 (Rueda *et al.,* 2011). Por su parte, Bayona-Vásquez y Burbano (2007), Bayona (2008) han desarrollado primers de regiones microsatélites para la *pacora Plagioscion magdalenae*, especie en estado de vulnerabilidad en las cuencas colombianas. En este trabajo, se obtuvo ADN para

amplificaciones a partir de muestras de músculo colectadas en cuatro puntos de la cuenca del río San Jorge y se aislaron primers microsatelitales especie-específicos para P. magdalenae mediante amplificación cruzada con primers de otras especies de peces lejanas (*Pseudoplatystoma corruscans, Pimelodella chagressi, Prochilodus argenteus* y *Prochilodus costatus*).

En la cuenca del Sinú, Castiblanco (2003) realizó estudios de diversidad genética de Oreochromis niloticus. En la misma cuenca, López (2006) estudió la variabilidad genética y estructura poblacional de *Brycon moorei sinuensis* con el uso de marcadores microsatélites en individuos colectados en ambientes naturales y en cuatro criaderos de peces, encontrando una baja variabilidad genética y haciendo recomendaciones para la utilización de parentales silvestres en las salas de incubación con fines de repoblamiento. Otros estudios para esta cuenca han evaluado la variabilidad genética y estructura poblacional utilizando estos marcadores en la dorada *Brycon morei sinuensis*, (López 2003 y López *et al.,* 2004), el bocachico *Prochidolus magdalenae* (Santacruz 2003 y Santacruz *et al.,* 2004) y en mojarra amarilla *Caquetaia krausii* (Lamprea 2003 y Lamprea *et al.,* 2004b). Lamprea *et al.,* (2004a) presentan las modificaciones realizadas para extracción de ADN a partir de tejidos de *Caquetaia kraussii, Brycon moorei sinuensis* y *Prochilodus magdalenae* así como los protocolos para la obtención de marcadores microsatélites para estas especies.

Para el río San Jorge, se han realizado trabajos de variabilidad y estructura genética con marcadores

microsatélitales como los realizados por Cabarcas (2008) y Cabarcas y Burbano (2008) quienes evaluaron la variabilidad y estructura genética de *Sorubim cuspicaudus* en las localidades de Montelíbano, Ayapel, San Marcos y San Benito, con cebadores heterólogos de especies cercanas, encontrando que las heterocigosidades observadas son menores que lo esperado en una población panmíctica con un alto grado de endogamia y una subestructuración moderada, en donde la diferenciación genética entre los individuos en cada localidad es menor a la que presentan en la población total. Los análisis de similitudes revelados por el flujo génico, la identidad y distancia genética y el Análisis de Correspondencia Factorial, determinaron dos grupos genéticamente diferentes, en el primero se agrupan las localidades de Montelíbano y Ayapel, mientras que en el segundo se encuentran San Marcos y San Benito. Sin embargo, existen diferencias genéticas evidentes entre las localidades de cada uno de los grupos. Las pruebas realizadas de cuello de botella indican que la población sufrió una reducción reciente del tamaño efectivo, lo que indujo a la endogamia dentro de cada una de las localidades y por efecto de deriva, aumentó la diferenciación genética de los individuos.

Gallo (2008) y Gallo y Burbano (2008) evaluaron la variabilidad y estructura genética de *Ageneiosus caucanus* en dos poblaciones del río San Jorge, mediante loci microsatélitales heterólogos encontrando que las poblaciones mostraron desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg principalmente por deficiencia de heterocigotos consecuencia especialmente de una diferenciación genética

moderada, endogamia, presencia de alelos nulos y altos niveles de flujo génico que confirman la homogeneidad de la población y no detectaron cuellos de botella recientes en la población. Por su parte, Useche (2010) realizó la caracterización genética de la población de *Hoplias malabaricus* en el río San Jorge, usando la amplificación de seis loci microsatelitales heterólogos, encontrando una alta variabilidad genética y definiendo que no se presentan cuellos de botella recientes, a pesar de la existencia de tres subpoblaciones bien diferenciadas ubicadas en las ciénagas de Ayapel, San Marcos y San Benito. Perdomo (2008) estudió la variabilidad y estructura genética de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* para las cuencas del San Jorge, Cauca y Magdalena, encontrando baja diferenciación genética entre los individuos de las tres cuencas cuyos ríos confluyen en la región de La Mojana, y Perdomo *et al.,* (2009) encontraron diferencias genéticas que confirman tres nuevas especies del genero *Pseudoplatystoma* (*P. magdaleniatum, P. punctifer* y *P. orinocoense*).

Se han realizado trabajos en *Prochilodus magdalenae* en la cuenca de los ríos San Jorge y Magdalena (Cuartas 2008, Builes *et al.,* 2008, Hernández-Escobar *et al.,* 2008, Fernández-García *et al.,* 2009). Builes *et al.,* (2008), utilizaron siete microsatélites inter-específicos del género *Prochilodus* para el estudio genético-poblacional del bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en 19 localidades ubicadas en las zonas representativas de la cuenca del río Cauca y una en Puerto Berrío, Antioquia (Cuenca del río Magdalena). Por su parte, Hernández-Escobar *et al.,* (2008) analizaron 4 loci

microsatélites descritos para la especie *Prochilodus costatus* (Pcos 03, Pcos 14, Pcos 17 y Pcos 20), mediante amplificación heteróloga por PCR y electroforesis capilar en secuenciador automático, en individuos de dos sitios de colecta en la zona de Betania, cuenca alta del río Magdalena El tamaño de alelos del *P. magdalenae* correspondió al rango en tamaño observado en *P. costatus*. La eficiencia de la amplificación de heterólogos está en un 80% en *P magdalenae* y los autores sugieren que la habilidad de estos marcadores microsatélites para utilizarse en amplificación de loci ortólogos en esta especie filogenéticamente relacionada, proporcionan una herramienta adecuada para ser usada en estudios de estructura genética poblacional en este grupo de peces y en futuros estudios de mapeos genéticos dirigidos al manejo y conservación del *P. magdalenae*.

Pineda-Santís *et al.,* (2006) evaluó el polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* mostrando un promedio de cuatro alelos por locus, reportando seis alelos nuevos no descritos en la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus* y definiendo que el grupo de individuos no estuvo afectado por fenómenos genéticos de poblaciones como entrada o salida de individuos, mutación o selección artificial. Briñez *et al.,* (2011) evaluó la diversidad genética en seis poblaciones de tilapia roja híbrida con fines de mejoramiento genético, usando microsatélites fluorescentes encontrando que todas las poblaciones mostraron desviaciones significativas de equilibrio de Hardy-Weinberg, debido principalmente a la falta de heterocigotos y observando que la distancia *Fst* evidenció que las muestras

están diferenciadas genéticamente y es posible usar esas poblaciones para el programa de mejoramiento genético, siendo recomendable introducir otros individuos.

Para especies marinas del neotrópico el uso de marcadores microsatélites es escaso. Ospina-Guerrero *et al.,* (2008) estudiaron la conectividad genética de la damisela bicolor *Stegastes partitus* en individuos de cuatro zonas del mar Caribe en Colombia (Santa Marta, Islas del Rosario, Capurganá y San Andrés) utilizando 11 loci microsatélites polimórficos, encontrando evidencia de flujo genético entra las poblaciones geográficas y escenarios oceanográficos analizados y ausencia de correlación entre la distancia genética y la geográfica. Por su parte, Landínez-García (2007) y Landínez-García *et al.,* (2009) estudiaron la estructuración genética del pargo rayado *Lutjanus synagris* en tres poblaciones del Caribe colombiano (Santa Marta, Islas del Rosario y Capurganá) evaluando 14 cebadores reportados para dos especies filogenéticamente cercanas de los cuales 8 fueron polimórficos para esta especie. Estos autores encontraron una marcada deficiencia de heterocigotos en todas las poblaciones estudiadas y una leve estructuración poblacional que separó la población de Capurganá de las demás regiones sin evidencia de aislamiento por distancia.

Bermúdez *et al.,* (2010) realizaron la caracterización genética del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del pacífico mediante la utilización de cinco loci microsatélites para lo que fueron genotipificados 664 individuos provenientes de 13 localidades distribuidas en el Pacífico, que presentaron

índices de diversidad altos para la especie y una leve pero significativa diferenciación entre individuos provenientes de diferentes localidades dentro del Golfo de California, al igual que una leve diferenciación entre individuos provenientes del Pacifico Oriental Norte y el Sur, y entre los individuos provenientes del Pacifico Oriental y el Pacifico Occidental, que debe ser considerada para la definición de los stocks de pesca.

Estudios de Genómica en peces

Debido a su amplia diversidad, muchas especies de peces han sido utilizadas como modelos en diferentes disciplinas de la biología. Dichas disciplinas incluyen la genética molecular y la investigación genómica, las cuales poseen características altamente notables para realizar investigación en peces (Roest Crollius y Weissenbach 2005).

En los últimos 30 años a partir de estudios con el pez zebra (*Danio rerio*), se han realizado estudios fundamentales para el entendimiento del desarrollo en vertebrados y el estudio de enfermedades humanas. Así mismo, gracias a la genómica, desde el año 1993 los peces se convirtieron en un importante modelo para el estudio de genomas con el estudio del *fugu (Takifugu rubripes*) (Brenner *et al.,* 1993). Además de su status como exquisitez gastronómica en Japón y China, este pez posee uno de los genomas más pequeños de todos los vertebrados. Por ello, su estudio permitió obtener con mayor rapidez información de un alto número de genes con un costo muy inferior si se compara con el análisis de genomas

de mamíferos. No obstante, esto tiende a cambiar, debido a la emergencia de redes de científicos y al surgimiento de redes de estudio de diversas disciplinas relacionadas con la bioinformática. En la actualidad, se puede preveer cómo la combinación de la genómica con disciplinas más tradicionales, podría abrir el camino de obtener un gran impacto sobre la biología (Roest Crollius y Weissenbach 2005).

Existen razones fundamentales para obtener secuencias completas de genomas de peces: (1) los primeros estudios han mostrado la utilidad del secuenciamiento comparativo al construir modelos genéticos del genoma humano; (2) el inicio de proyectos de mutagénesis a gran escala sobre el pez zebra (*Danio rerio*), fue llevado a cabo como un esfuerzo en la preparación para la construcción de mapas genéticos y mapas de radiación de híbridos (Geisler *et al.,* 1999, Hukriede *et al.,* 2001). El futuro de la genómica de peces es claro, predicción soportada por aplicaciones en donde sus características específicas han sido explotadas exitosamente. En primer lugar, como un grupo altamente diversificado, experimentan un rango sorprendente de condiciones ambientales a las cuales se han adaptado. Sin embargo, dado su hábitat acuático, son potencialmente sensibles a parámetros ambientales del agua. Por ello, los peces pueden ser tomados como modelos para el estudio de genómica ambiental (Cossins y Crawford 2005). En segundo lugar, la investigación genómica en peces es ampliamente reconocida por las agencias internacionales de financiación. Como ejemplo, existen programas de la Unión Europea (UE) en investigación con pez cebra, para estudios del desarrollo y las enfermedades humanas (Bradbury 2004).

Los peces también representan una fuente importante de alimento para el hombre. La UE ha reconocido la necesidad de mejorar la investigación acuícola, al fundar el consorcio AQUAFIRST, el cual se creó para identificar genes asociados con estrés y resistencia a enfermedades en varias especies, para proveer bases genéticas y fisiológicas para cría selectiva asistida por marcadores. Las técnicas genómicas y la comparación de secuencias con modelos genómicos son primordiales en proyectos de este tipo, lo cual ilustra cómo la genómica en peces puede crecer en los años venideros (Roest Crollius y Weissenbach 2005).

Una última aplicación del estudio de los genomas, se relaciona con la posición filogenética de las especies de peces en comparación con los mamíferos. En la actualidad, la mayor parte de la atención se ha puesto en los genomas de eucariotas que no codifican para proteínas pero que son funcionales. Estos elementos incluyen genes de ARN no codificantes, así como las regiones de control de la regulación. Una de las técnicas más informativas para identificar tales elementos es el alineamiento de secuencias genómicas de organismos alejados taxonómicamente. Este alineamiento busca regiones que permanezcan similares durante la evolución, sugiriendo que una restricción funcional está actuando para preservar estas secuencias de mutaciones (Roest-Crollius *et al.,* 2000).

Para estudios realizados en Colombia, Acosta (2001) utilizó 1a PCR como herramienta de búsqueda de microsatélites (AC/GT)n en una librería genómica parcial de la especie no nativa *Xiphophorus maculatus*, cuyo genoma

se ha convertido en un modelo apropiado para el estudio del cáncer en vertebrados (Acosta (2001).

PERTURBACIONES EN POBLACIONES DE PECES POR ORIGEN ANTROPOGÉNICO

Diferentes eventos naturales y de origen humano pueden conducir a desequilibrios en los ecosistemas, así como disminución y pérdida de poblaciones de peces: introducciones de peces en cuencas foráneas, alteraciones del hábitat, competencia y depredación por parte de peces no nativos, sobrepesca e introgresión genética debida a hibridización (Muhlfeld *et al.,* 2009, Shepard *et al.,* 2005).

Se han realizado estudios que buscan detectar posibles hibridaciones de peces en aguas continentales, así como detección de translocaciones y aislamiento de poblaciones de especies no nativas. En Norteamérica, algunas especies de pequeñas carpas de tienen la capacidad de hibridizarse aunque no tengan relaciones taxonómicas cercanas (*Relictus solitarius* –nativo, *Rhinichthys osculus* –introducido), pudiendo ocasionar introgresión genética. La evaluación de marcadores moleculares evaluados en genes mitocondriales (cyt b) y nucleares (intron S7), pudo detectar hibridización intergenérica en peces de cuencas cercanas pero aisladas. Tales evaluaciones de la biología molecular han apoyado la realización de recomendaciones para el manejo de diferentes poblaciones de importancia ecológica (Houston *et al.,* 2012).

Es necesario comprender cómo se distribuye la variación genética en poblaciones de peces de sitios fragmentados

y/o aislados. La identificación de las poblaciones con bajos niveles de diversidad genética así como la identificación de los principales linajes evolutivos, es un tema de alta relevancia ecológica, pues se podría afectar la persistencia futura de algunas poblaciones de peces. Los datos hallados pueden ser útiles en la selección de poblaciones para translocaciones, asegurando así que los principales linajes evolutivos dentro del taxón sean protegidos, localizando así barreras locales para evitar la dispersión de especies no nativas (Fausch *et al.,* 2009). Asimismo, estimar niveles de diferenciación genética de poblaciones de peces mediante el análisis de regiones de ADN como los microsatélites, es una tarea común que puede generar información importante para el manejo de poblaciones naturales. Se pueden obtener estimaciones de la cantidad de diversidad genética dentro de poblaciones, así como de cuanta diferenciación genética existe entre poblaciones (Drinan *et al.,* 2011).

Respecto a los ecosistemas costeros, el incremento en la presión de pesca ha conllevado a la sobreexplotación (Roberts 1997, Roberts *et al.,* 2001), llevando a problemas tales como: disminuciones de la abundancia total de poblaciones de peces y de los tamaños promedio de captura; selección genética en contra, la cual puede conducir a pérdidas de la fecundidad potencial; tamaño promedio reducido en el tamaño de desove; cambios en la proporción de sexos y en el equilibrio interespecífico; y pérdidas de diversidad genética (Wilson y Clarke 1996). Luego de las fallas en las medidas de manejo tradicionales, las reservas marinas han sido acogidas positivamente como una herramienta ideal para el manejo de las pesquerías costeras (Gerber *et al.,* 2002).

En las últimas décadas, se han establecido un gran número de áreas marinas protegidas (*Marine Protected Areas* -MPAs) en una escala mundial (Lubchenco *et al.,* 2003), ofreciendo protección para las comunidades naturales, en un intento de evitar el posterior deterioro de los hábitat sensibles, sirviendo a su vez como herramientas de manejo de pesquerías (Jones 2002). Por ello, las reservas marinas de pesquerías han sido creadas para proteger poblaciones de peces en etapas de desove, así como la diversidad genética intraespecífica, la estructura poblacional y el balance ecosistémico, a la vez que soportan pesquerías (Plan Development Team 1990). De esta forma, aunque se ha encontrado que en el caso de los recursos genéticos, las MPAs han sido consideradas un medio eficiente y lógico de mantener dichas pesquerías, también se cuenta con datos del efecto de la protección de áreas sobre la estructura genética de poblaciones de peces, así como de los mecanismos involucrados (Pérez-Ruzafa *et al.,* 2006). Los datos obtenidos de genética de poblaciones a través de marcadores microsatélite incluyen evaluaciones de variabilidad genética en forma de heterocigosidad observada *(Ho)* y esperada *(He)*, heterocigosidad media por locus como una proporción de loci polimórficos a un criterio del 5 %, así como el número promedio de alelos por locus. También se calculan los estadísticos F, para determinar apareamiento no aleatorio dentro de poblaciones (FIS) usando el método descrito por Weir y Cockerham (1984). Se pueden calcular distancias genéticas entre pares de poblaciones, para luego obtener matrices de distancias usando distancias euclidianas y algoritmos de agrupación). Por otra parte, también puede estimarse la diversidad genética usando el índice de Shannon,

así como la variación espacial de la estructura genética de poblaciones usando herramientas como los análisis de componentes principales (*Principal Components Analyses* -PCA) (Pérez-Ruzafa *et al.,* 2006).

CONCLUSIONES

El desarrollo y la aplicación de la citogenética, así como de marcadores moleculares altamente polimórficos en estudios de poblaciones silvestres ha sido usado especialmente con fines de conservación y genética de poblaciones realizando comparaciones entre poblaciones o especies, ayudando en la resolución de dudas taxonómicas y haciendo aportes en el diseño de estrategias de conservación. Teniendo en cuenta la alta diversidad de especies de peces en Colombia, el uso de la citogenética y las técnicas moleculares en estudios de diversidad genética de sus poblaciones es bajo, aunque se observa un mayor desarrollo de estos estudios en las dos últimas décadas. El enfoque principal ha sido la identificación de la estructura genética de poblaciones de especies de interés comercial, para la formulación de programas de cría en cautiverio y para generar pautas de manejo sostenible, y conservación de diversidad genética de las poblaciones naturales como estrategia de conservación de diversidad biológica, siendo los marcadores más usados para el estudio de peces el análisis de regiones de ADN nuclear (RAPDs, microsatélites, etc) y mitocondrial (ADNmt).

La citogenética en los peces permite el análisis de la tendencia evolutiva, filogenia y rearreglos cromosómicos,

para caracterizar polimorfismos sexuales, clasificaciones taxonómicas, determinación de hibridaciones para mejoramiento de la producción y la viabilidad de genotipos entre otros. En Colombia se destacan estudios que han sido realizados con el fin de determinar el cariotipo de un número aún bajo de especies nativas principalmente en especies de agua dulce y la existencia de cromosomas sexuales, supernumerarios y rearreglos. Por su parte, el análisis de propiedades electroforéticas de aloenzimas e isoenzimas han sido aplicados al estudio de peces para establecer variaciones a nivel poblacional en peces marinos, para verificar posible estructuración genética, revelar la presencia de especies cripticas, evaluar diferenciación intraespecifica separando poblaciones que divergen por separación geográfica, y se han aplicado a aspectos evolutivos, taxonómicos y filogenéticos. Para especies de peces en Colombia son pocos los estudios realizados con esta técnica como el estudio de la variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* en el río Magdalena, y para evaluar la variabilidad entre las poblaciones de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum,* en las cuencas del Orinoco y del Amazonas y de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en la Amazonía colombiana.

Los marcadores RAPD´s han sido usados para determinar el nivel de diferenciación genética intra e interpoblacional y el entendimiento de eventos filogeográficos. En Colombia, se han estudiado las poblaciones de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* de las cuencas del Orinoco y del Amazonas y para la cuenca del Magdalena se ha realizado la caracterización genotípica de la sabaleta *Brycon henni*.

Los análisis de AFLP se han aplicado en varias especies de peces exóticos como tilapia (*Oreochomis spp*) y trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) y para especies de peces nativos colombianos se ha evaluado la estructura genética de las poblaciones del blanquillo *Sorubim cuspicaudus* en la cuenca del rio Sinú y de bocachico *Prochilodus magdalenae* en el río Cauca. Así mismo, en peces el ADN mitocondrial se han usado para plantear estrategias de conservación en la especie Arapaima gigas, y en análisis genéticos y filogenéticos de poblaciones del género Prochilodus en las cuencas de los ríos Paraná, Amazonas, Orinoco y Magdalena. Para la Orinoquia, se ha estudiado la genética poblacional de arawana azul *Osteoglossum ferreirai,* mediante la secuenciación del gen citocromo b encontrando un heterocigosidad observada significativamente menor a la esperada, indicando pérdida de diversidad genética. Para especies marinas neotropicales se ha evaluado la diversidad y estructura genética en poblaciones alopátricas de *Lutjanus peru* y de *Coryphaena hippurus* usando RFLPs del gen mitocondrial NADH1 para poblaciones del pacífico, se ha realizado la identificación de las especies *Mugil lisa, Mugil curema* y *Mugil cephalus* usando RFLPs del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) y se ha evaluado la filogeografía de siete especies de la familia *Mugilidae* en Brasil.

En el caso de marcadores microsatélite para Colombia, se ha evaluado la diversidad alélica en especies del genero *Prochilodus* incluyendo ejemplares de *P.magdalenae* del río magdalena y se han desarrollado primers de regiones microsatélites para la pacora *Plagioscion magdalenae*, especie

en estado de vulnerabilidad en las cuencas colombianas. Para la cuenca del Sinú, se han realizado estudios de diversidad genética y estructura poblacional de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*, dorada *Brycon moorei sinuensis*, bocachico *Prochidolus magdalenae* y mojarra amarilla *Caquetaia krausii*. Para el río San Jorge, se han realizado trabajos de variabilidad y estructura genética de *Sorubim cuspicaudus* determinando dos grupos genéticamente diferentes, de *Ageneiosus caucanus* encontrando una diferenciación genética moderada, endogamia, presencia de alelos nulos y altos niveles de flujo génico que confirman la homogeneidad de la población, sin cuellos de botella recientes en la población, de *Hoplias malabaricus* encontrando una alta variabilidad genética y definiendo que no se presentan cuellos de botella recientes, a pesar de la existencia de tres subpoblaciones bien diferenciadas. Igualmente se han realizado estudios de variabilidad y estructura genética de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* para las cuencas del San Jorge, Cauca y Magdalena, encontrando baja diferenciación genética entre los individuos de las tres cuencas cuyos ríos confluyen en la región de La Mojana. Se ha evaluado el polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* y la diversidad genética en seis poblaciones de tilapia roja híbrida con fines de mejoramiento genético. Para especies marinas, se ha estudiado la conectividad genética de *Stegastes partitus* y la estructuración genética del pargo rayado *Lutjanus synagris* en el Caribe colombiano y se realizó la caracterización genética del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del pacífico.

Muchas especies de peces han sido utilizadas en investigación genómica, como el pez zebra *Danio rerio*, para el entendimiento del desarrollo en vertebrados y el estudio de enfermedades humanas, y dado que los peces son potencialmente sensibles a parámetros ambientales del agua, pueden ser tomados como modelos para el estudio de genómica ambiental. Para Colombia, se ha utilizado 1a PCR como herramienta de búsqueda de microsatélites (AC/GT) n en una librería genómica parcial de la especie no nativa *Xiphophorus maculatus*, cuyo genoma se ha convertido en un modelo apropiado para el estudio del cáncer en vertebrados.

En un país como Colombia en el que las especies presentan poblaciones sometidas a procesos de sobreexplotación, entrada de especies exóticas deterioro de su hábitat, fragmentación de ecosistemas, con la consecuente pérdida de conectividad que limita el flujo genético, es importante el mantenimiento de la diversidad a nivel genético para la conservación de la diversidad biológica y se hace necesario tener un mejor conocimiento de este componente que permita disponer de mejores herramientas para la planificación de estrategias de conservación y manejo de las poblaciones de peces. Es necesario comprender cómo se distribuye la variación genética en poblaciones de peces de sitios fragmentados y/o aislados. La identificación de las poblaciones con bajos niveles de diversidad genética así como la identificación de los principales linajes evolutivos, es un tema de alta relevancia ecológica, pues se podría afectar la persistencia futura de algunas poblaciones de peces. Asimismo, estimar niveles de diferenciación genética de poblaciones de peces mediante el

análisis de regiones de ADN como los microsatélites, es una tarea que puede generar información importante para el manejo de poblaciones naturales.

REFERENCIAS

Aboim, M.A., G.M. Menezes, T. Schlitt y A.D. Rogers. 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish Helicolenus dactylopterus (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. Molecular Ecology. 14: 1343-1354.

Acosta, D. F. 2001. Construcción de una librería genómica parcial del pez Xiphophorus maculatus (Teleostei: Poeciliidae) para la búsqueda de microsatélites (AC/GT)n por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Resumen tesis de pregrado en Biología de la U de los Andes. Acta Biológica Colombiana, Vol. 6 No.2, 93-94.

Agresti J.J., S. Seki, A. Cnaani, S. Poompuang, E.M. Hallerman, N. Umiel, G. Hulata y G. Gae. 2000. Breeding new strains of tilapia: Development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture, 185: 43-56.

Artoni R.F. y M.C. Almeida. 2003. Genética de peixes neotropicais. I. aspectos da conservação genética dos peixes no parque estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa 9 (2): 7-15.

Avise, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 2nd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. 684 pp.

Avise, J. C. y R.K. Selander. 1972. Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus Astyanax. Evolution 26:1–19.

Barbosa, A.C.D.R., F. Galzerani, T.C. Corrêa, P.M. Galetti-Junior y T. Hatanaka. 2008. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish Prochilodus argenteus and cross-amplification in P. costatus and P. lineatus. Genetics and Molecular Biology 31: 357-360.

Barbosa, A.C.D.R., T.C. Corrêa, F. Galzerani, P.M. Galetti Jr. y T. Hatanaka. 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish Prochilodus argenteus (Characiformes, Prochilodontidae). Molecular Ecology Notes 6: 936-938.

Barfai, R., S. Egedi, G.H. Yue, B. Kovacs, B. Urbanyi, G. Tamas, L. Horvath y L. Orban. 2003. Genetic analysis of two commom carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. Aquaculture 219: 157-167.

Barletta, M., A.J. Jaureguizar, C. Baigun, N.F. Fontoura, A.A. Agostinho, V.M.F. Almeida-Val, A.L. Val, R.A. Torres, L.F. Jimenez-Segura, T. Giarrizzo, N.N. Fabré, V.S. Batista, C. Lasso, D.C. Taphorn, M.F. Costa, P.T. Chaves, J.P. Vieira y M.F.M. Correa. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. Journal of Fish Biology 76: 2118–2176.

Barman, H.K., A. Barat, B.M. Yadav, S. Banerjee, P.K. Meher, P.V. Reddy y R.K. Jana. 2002. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. Aquaculture 202: 1-9.

Barroso R.M., A.W.S. Hilsdorf, H.L.M. Moreira, A.M. Mello, E.F. Gimaräes, P.H. Cabello y Y.M. Traub-Cseko. 2003. Identification and characterization of microsatellites loci in Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae). Molecular Ecology Notes 3: 297–298.

Barroso R.M., A.W.S. Hilsdorf, H.L.M. Moreira, P.H. Cabello y Y.M. Traub-Cseko. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. Aquaculture 247: 51– 65.

Bayona-Vásquez, N.J. y M. Burbano. 2007. Obtención de secuencias microsatelitales específicas para Plasgioscion magdalenae (Pisces: Sciaenidae). Acta biológica Colombiana 12S: 122-123.

Bayona-Vásquez, N.J. 2008. Desarrollo de primers especie-específicos para Plagioscion magdalenae (Pisces: Sciaenidae). Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Beheregaray, L.B. y J.A. Levy. 2000. Population genetics of the silverside Odontheses argentinensis (Teleostei, Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. Copeia 2: 441–447.

Bermúdez, A., G. Navas y N.H. Campos. 2010. Caracterización genética del dorado Coryphaena hippurus en poblaciones del pacífico mediante microsatélites. Memorias del III Congreso Colombiano de Zoología. Noviembre 21 al 26 de 2010 Medellín, Colombia. P. 21.

Bertollo, L., G.G. Born, J.A. Dergam, A.S. Fenocchio y O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, Hoplias malabaricus. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chromosome Research 8: 603-613.

Birky, C.W., T. Maruyama y P. Fuerst. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplast and some results. Genetics 103: 513-527.

Black, W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. Insect Molecular Biology 2: 1-6.

Blanchet S. 2012. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. Fisheries Management and Ecology, 19, 120–132.

Bohórquez, C. 2000. Caracterización cromosómica y aspectos biológicos del capitán enano Trichomycterus bogotense (Eigenmann 1912), especie íctica nativa de la sabana de Bogotá. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Bonin, A., E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann y P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Molecular Ecology 13: 3261–3273.

Bradbury, J. 2004. Small fish, big science. PLoS Biol. 2: E148.

Brenner, S., G. Elgar, R. Sandford, A. Macrae, B. Venkatesh y S. Aparicio. 1993. Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. Nature 366: 265–268.

Briñez B., X. Caraballo y M. Salazar. 2011. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. Rev. MVZ Córdoba 16(2): 2491-2498.

Builes J.J., A. Arango, A. Manrique, Y. Puerto, L.F. Jiménez, D. Aguirre. 2008. Utilización de microsatélites inter-específicos para el estudio genético-poblacional del bocachico (Prochilodus magdalenae) en la cuenca del río Cauca, Colombia. En: Memorias I Congreso Latinoamericano de Genética Humana/IX Congreso Colombiano de Genética. Cartagena de Indias, Colombia. Acta Biológica Colombiana 13(3): 127.

Burbano, C. 2001. Citogenética aplicada a peces, p 219- 232. En: H. Rodríguez, P.V. Daza y, M. Carrillo (eds). Fundamentos de Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. 2ed. Grafiimpresos Quintero. Bogotá, Colombia. 437 p.

Cabarcas, M.P. 2008. Variabilidad y estructura genética de Sorubim cuspicaudus (orden siluriformes) en el río San Jorge Colombia. Un paso hacia la conservación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Cabarcas, M.P. y C. Burbano. 2008. "Variabilidad y estructura genética de Sorubim cuspicaudus (Orden: Siluriformes) en el Río San Jorge, Colombia: Un paso hacia la conservación" En: Memorias I Congreso latinoamericano de Genética Humana y IX Congreso Colombiano de Genética. Acta Biológica Colombiana 13 (3) 131-132.

Calcagnotto, D., M. Russello y R. DeSalle. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in Piaractus mesopotamicus and their applicability in other Serrasalminae fish. Molecular Ecology Notes 1: 245-247.

Camacho, J. 1999. Caracterización citogenética y relaciones biogeográficas en poblaciones colombianas de Pseudoplatystoma fasciatum y Pseudoplatystoma tigrinum (Pisces: Siluriformes: Pimelodidae). Trabajo de grado, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Camacho, J., A.D. Montaño, A.C. Forero, E.P. Sandoval y C. Vergara. 2002. Estudios de la biodiversidad y del recurso genético en Bagre rayado (Pseudoplatystoma fasciatum) y Cachama blanca (Piaractus brachypomus) mediante técnicas electroforéticas y citogenética. UNAD. www.unad.edu.co/estudiogenético/unad.pdf. 10 p.

Camacho, J. y C. Burbano. 1999. Técnica para el cultivo in vitro de linfocitos de peces. Dalia (Revista Asociación Colombiana de Ictiólogos) 3: 69-79.

Carrillo-Avila, M., E.K. Resende, D.K.S. Marques y P.M. Galetti. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jahú, (Zungaro jahu) (Siluriformes, Pimelodidae). Conservation Genetics 10: 1597–1599.

Carvalho-Costa, L.F., T. Hatanaka y P.M. Galetti Jr. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory fish Prochilodus costatus. Molecular Ecology Notes 6: 818-819.

Castiblanco, J. 2003. Caracterización genética de dos poblaciones de tilapia Oreochromis niloticus en la cuenca del río Sinú 2003). Departamento de Biología, Universidad de los Andes. Bogotá Colombia. 180 p.

Chen, T.R. y A.W. Ebeling. 1971. Chromosomes of the goby fishes in the genus Gillchthus. Copeia 1: 171-174.

Chiari, L., y L.M.K. Sodré. 1999. Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi—Characiformes). Genetics and Molecular Biology 22: 517–523.

Clabby, C., U. Goswami, F. Flavin, N.P. Wilkins, J.A. Houghton y R. Powell. 1996. Cloning, characterization and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Gene 168: 205–209.

Conover, D.O., L.M. Clarke, S.B. Munch y G.N. Wagner. 2006. Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. Journal of Fish Biology 69: 21–47.

Corrêa-Benzaquem, D., E. Feldberg, J.I. Rebelo Porto, M.C. Gross y J. A. Sampaio Zuanon. 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus Crenicichla (Perciformes, Cichlidae). Genetics and Molecular Biology 31(1S): 250-255.

Cossins, A.R. y D.L. Crawford. 2005. Fish as models for environmental genomics. Nature Reviews Genetics. 6: 324–333.

Cowen, R.K., C.B. Paris y A. Srinivasan. 2006. Scaling of connectivity in marine populations. Science 311: 522–527.

Cross, I., L. Vega y L. Rebordinos. 2003. Nucleolar organizing regions in Crassostrea angulata: chromosomal location and polymorphism. Genetica 119: 65–74.

Cuartas, D.M. 2008. Caracterización genética de Prochilodus magdalenae (pisces: prochilodontidae), en la cuenca del río San Jorge, utilizando marcadores microsatélites. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Daley, W.J. 1993. The use of fish hatcheries: polarizing the issue. Fisheries 3: 4-5.

Danzmann, R.G., P.E. Ihssen y P.D.N Herbert. 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, Salvelinus fontinalis (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. Journal of Fish Biology 39: 69–77.

David-López, D., G. Vásquez-Palacio, T. Ruiz-Cortés y M. Olivera-Angel. 2008. Caracterización citogenética del pez neotropical Brycon henni (Pisces: Characidae). Revista de Biología Tropical 56(4): 1619-1628.

De Greiff, S. y F. Montoya. 1988. Estudio genético y bioquímico de cuatro especies del genero Brycon de origen Colombiano. Trabajo de promoción, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 85 p.

Dergam, J.A., H.I. Suzuki, O. Shibatta, L.F. Duboc, H.F. Júlio-Jr. y W.C. Giuliano-Caetano. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fish Hoplias malabaricus (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguacu, Tibagi and Paraná rivers. Genet Mol Biol 21: 493–496. doi:10.1590/S1415-47571998000400015

Dergam, J.A., S.R. Paiva, C.E. Schaeffer, A.L. Godinho y F. Vieira. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. Genetics and Molecular Biology 25: 379–387. doi:10.1590/S1415-47572002000400005

Drinan, D., S. Kalinowski, N. Vu, B. Shepard, C. Muhlfeld y M. Campbell. 2011. Genetic variation in westslope cutthroat trout Oncorhynchus clarkii lewisi: implications for conservation. Conservation Genetics 12: 1513–1523.

Durán-González, A., C.E. García-Rucias y A. Laguarda-Figueras. 1990. The karyotype and "G" bands of Haemulon aurolineatum CLUVIER, 1829 (Pisces: Haemulidae). Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 17: 299-307.

Ewen, K.R., M. Bahlo, S.A. Treloar, D.F. Levinson, B. Mowry, J.W. Barlow y S.J. Foote. 2000. Identification and analysis of error types in high-throughput genotyping. American Journal of Human Genetics 67: 727–736.

Farias, I.P., T. Hrbek, H. Brinkmann, I. Sampaio y A. Meyer. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for Arapaima gigas, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. Molecular Ecology Notes 3: 128-130.

Fausch, K.D., B.E. Rieman, J.B. Dunham, M.K. Young y D.P. Peterson. 2009. Invasion versus isolation: trade-offs in managing native salmonids with barriers to upstream movement. Conservation Biology 23: 859–870.

Feldberg, E., J.I.R. Porto y L.A.C. Bertollo. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val AL and Kapoor BG (eds) Fish Adaptation. IBH, Oxford, New Dehli y New York, pp 287-310.

Feldberg, E., J.I.R. Porto y L.A.C. Bertollo. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera Curimata, Psectrogaster, Steindachnerina and Curimatella. Brazilian Journal of Genetics 15: 369-383.

Fenocchio, A.S., L.A. Bertollo, C.S. Takahashi y J.P. Camacho. 2000. B chromosomes in two fish species, Genus Rhamdia (Siluriformes, Pimelodidae). Folia Biologica 48: 105-109.

Fernández-García G., J. Builes, G.A. Arango-Rojas y L.F. Jiménez. 2009. Evaluación de la variabilidad genética y estructura poblacional de Prochilodus magdalenae (Characiformes: Prochilodontidae), en la cuenca del río Cauca, Colombia. Memorias X Simposio Colombiano de Ictiología. Revista Actualidades Biológicas 31 (Supl.1): 114-115.

Frankham, R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. First published. Pp.220.

Frankham, R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. Journal of Evolutionary Biology 18: 750–755.

Freitas, F.E., M.E. Araujo y A.M. Solé-Cava. 2003. Estruturação genética das populações de duas espécies de peixes recifais do atol das rocas e da costa do Ceará. Tropical Oceanography, Recife 31: 171–180.

Galetti Jr., P. M., F. Foresti, L.A.C. Bertollo y O. Moreira-Filho. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae (Characiformes) fish on the basis of the nucleolar organizer region. Caryologia 37: 401-406.

Gallo, C. 2008. Diversidad y estructura genética de Ageneiosus caucanus (Siluriforme: Ageneiosidae) en dos poblaciones del río San Jorge, Colombia mediante loci microsatelitales heterólogos. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Gallo, C. y C. Burbano. 2008. Diversidad genética de Ageneiosus caucanus (Siluriforme: Ageneiosidae) en dos poblaciones del río San Jorge, Colombia mediante loci microsatelitales heterólogos. En:

Memorias I Congreso latinoamericano de Genética Humana y IX Congreso Colombiano de Genética. Acta Biológica Colombiana 13(3): 55-56.

Gallo, H. y J. Díaz-Sarmiento. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado Pseudoplatystoma fasciatum, (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 27(105): 599-605.

Gallo, H.M. 2000. Variabilidad genética del bagre rayado Pseudoplatystoma fasciatum (Linnaeus, 1766), en el río Magdalena. Tesis de Pregrado, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Biología Marina, Bogotá, Colombia.

Geisler, R., G.J. Rauch, H. Baier, F. van Bebber, L. Bross, M.P. Dekens, K. Finger, C. Fricke, M.A. Gates, H. Geiger, H., *et al.,* 1999. A radiation hybrid map of the zebrafish genome. Nature Genetics 23: 86–89.

Gerber, L.R., P.M. Kareiva y J. Bascompte. 2002. The influence of life history attributes and fishing pressure on the efficacy of marine reserves. Biological Conservation 106: 11–18.

Ghigliotti, L., T.J. Near, S. Ferrando, M. Vacchi y E. Pisano. 2010. Cytogenetic diversity in the Antarctic plunderfishes (Notothenioidei: Artedidraconidae). Antarctic Science 22(6): 805–814. doi:10.1017/S0954102010000660

Ginot, F., I. Bordelais, S. Nguyen y G. Gyapay. 1996. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. Nucleic Acids Research 24(3): 540–541.

González, J.A., M.L. Bueno y J.E. Forero. 1989. Caracterización cromosómica de dos especies ícticas nativas: Guapucha (Grundulus bogotensis) y Capitán (Eremophilus mutisii). Acta Biológica Colombiana 7-8: 45-54.

Guerrero J. y C. Burbano. 2004. Estructura genética a partir de marcadores moleculares AFLP's en poblaciones del blanquillo Sorubim cuspicaudus en la cuenca del rio Sinú. En: II Congreso Colombiano de Acuicultura, v. fasc. p.103 – 105.

Guerrero, J. 2003. Caracterización de la población de blanquillo (Sorubim lima) mediante marcadores moleculares AFLPs en la cuenca del rio Sinú. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. Ecology 79(2): 413–425.

Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachussets, EEUU.

Hauser, L. y G.R. Carvalho. 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. Fish and Fisheries 9: 333–362.

Hauser, L., G.J. Adcock, P.J. Smith, J.H.B. Ramirez y G.R. Carvalho. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (Pagrus auratus). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 11742–11747.

Hernández-Escobar, C.A., C.M. Rivera, H. Ostos Alfonso y M. Olivera-Ángel. 2008. Análisis de loci microsatélites de la especie neotropical Prochilodus costatus por amplificación cruzada en Prochilodus magdalenae (characiforme: Prochilondontidae) en la cuenca alta del río Magdalena. En: Memorias I Congreso Latinoamericano de Genética Humana/IX Congreso Colombiano de Genética. Cartagena de Indias, Colombia. Acta Biológica Colombiana. 13(3): 12.

Houston, D., R.P. Evans y D. Shiozawa. 2012. Evaluating the genetic status of a Great Basin endemic minnow: the relict dace (Relictus solitarius). Conservation Genetics 13:727–742

Howell, W.M. y D.A. Black, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.

Hrbek, T., I.P. Farias, M. Crossa, I. Sampaio, J.I.R. Porto y A. Meyer. 2005. Population genetic analysis of Arapaima gigas, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. Animal Conservation 8: 1–12.

Hrbek, T., M. Crossa y I.P. Farias. 2007. Conservation strategies for Arapaima gigas (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. Brazilian Journal of Biology 67(S4): 909–917.

Hu, G. 1993. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucle- otides to the 3' end of a DNA fragment. DNA Cell Biology. 12: 763-770.

Hukriede, N., D. Fisher, J. Epstein, L. Joly, P. Tellis, Y. Zhou, B. Barbazuk, K. Cox, L. Fenton-Noriega, C. Hersey, *et al.,* 2001. The LN54 radiation hybrid map of zebrafish expressed sequences. Genome Research. 11: 2127–2132.

Hurtado-Alarcón, J.C. 2009. Variabilidad genética y estructura poblacional en Brycon henni E. (Characiformes: Characidae) en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé, Antioquia. Tesis de Maestría. Posgrado en Bosques y Conservación Ambiental. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 47 p.

Hurtado-Alarcón, J.C., N.J. Mancera-Rodríguez y C.I. Saldamando-Benjumea. 2011. Variabilidad genética en Brycon henni (Characiformes: Characidae) en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé, sistema Río Magdalena, Colombia. Revista de Biología Tropical. 59(1): 269-282.

Hutchinson, W.F., C. van Oosterhout, S.I. Rogers y G.R. Carvalho. 2003. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (Gadus morhua). Proceedings of the Royal Society London B 270: 2125–2132.

Jaramillo-Villa, U., J.A. Maldonado-Ocampo y F. Escobar. 2010. Altitudinal variation in fish assemblage diversity in streams of the Central Andes of Colombia. Journal of fish biology 76: 2401-2417.

Jarne, P. y P.J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11: 424–429.

Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales. Fuera de Serie No. 2.

Jones, P.J.S. 2002. Marine protected area strategies: issues, divergences and the search for middle ground. Reviews in Fish Biology and Fisheries 11: 197–216.

Jørgensen, H.B.H., M.M. Hansen, D. Bekkevold, D.E. Ruzzante y V. Loeschcke. 2005. Marine land- scapes and population genetic structure of herring (Clupea harengus L.) in the Baltic Sea. Molecular Ecology 14: 3219–3234.

Kang, J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim y K.K. Kim. 2006. Genetic relationship between broodstocks of Olive flounder, Paralichthys olivaceus (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. Aquaculture Research 37: 701-707.

Kang, T.W., E.H. Lee, M.S. Kim, y S.G. Paik. 2005. Molecular phylogeny and geography of Korean medaka fish (Oryzias latipes). Molecules and Cells 20: 151-156.

Kayoko-Matsumoto, C. y A.W. Silva-Hilsdorf. 2009. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species Brycon insignis Steindachner, 1877:

implications for its conservation and sustainable management. Neotropical Ichthyology 7(3): 395-402.

Lamprea, N. 2003. Caracterización genética de Caquetaia krausii (Steindachner,1878) (pisces:Cichlidae) en la cuenca del río Sinú, mediante loci microsatélites. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Lamprea, N., L. López., D. Santacruz, J. Guerrero, y C. Burbano. 2004a. Modificaciones técnicas en el uso de microsatélites y AFLP para el estudio poblacional de diversas especies de peces en el río Sinú, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 6(1): 72 – 78.

Lamprea N., W. Usaquen y C Burbano. 2004b. Caracterización genética de Caquetaia krausii (Steindachner, 1878) (Pisces:Cichlidae) en la cuenca del río Sinú, mediante loci microsatélites. En: Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, p.37–38.

Landínez-García, R.M., S.P. Ospina-Guerrero, D.J. Rodríguez-Castro, R. Arango y E. Márquez. 2009. Genetic analysis of Lutjanus synagris populations in the Colombian Caribbean. Ciencias Marinas 35(4): 321–331.

Landínez-García, R. 2007. Análisis genético de Lutjanus synagris en poblaciones del Caribe colombiano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Lévêque C, T. Oberdorff, D. Paugy, M.L.J. Stiassny y P.A. Tedesco. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. Freshwater Animal Diversity Assessment - Developments in Hydrobiology 198: 545-567.

Levy, J.A, R. Maggioni y M.B. Conceiçao M.B. 1998. Close genetic similarity among populations of the white croaker (Micropogo-

nias furnieri) in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies. Fisheries Research 39: 87–94.

Litt, M., X. Hauge y V. Sharma. 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. BioTechniques 15: 280-284.

Liu, Z., A. Li, P. Nichols y R.A. Dunham. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (Ictalurus punctatus), blue catfish (I. furcatus), and their F1, F2, and backcross hybrids. Molecular Genetics and Genomics. 258: 260-268.

Lopera-Barrero, N., R. Ribeiro, S. Sirol, J. Povh, P. Gomes, L. Vargas y C. Mangolin. 2008. Variabilidad genética de lotes de Brycon orbignyanus utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. Acta Biológica Colombiana 13: 107-118.

Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, S.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas y D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (Brycon orbignyanus) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. Journal of Animal Science 84: 170-170.

López, L. 2003. Caracterización genética de dos poblaciones silvestres y cuatro poblaciones de granjas piscícolas de Dorada, Brycon moorei sinuensis (Dahl 1955) (Characidae, Bryconinae), del rio Sinú mediante loci microsatélites. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

López, L. 2006. Genetic variability and population structure of dorada (Brycon moorei sinuensis Dahl) in the Sinú River, Córdoba, Colombia. Lakes and Reservoirs: Research and Management 11: 1-7.

López, L., W. Usaquén y C. Burbano. 2004. Variabilidad y estructura poblacional de la dorada (Brycon morei sinuensis, Dahl) en el río

Sinú (Córdoba, Colombia). En: II Congreso Colombiano de Acuicultura, v. fasc. p.47 – 49

López-Macías, J.N., F. García Vallejo, E. Rubio Rincón, A. Castillo Giraldo y F. Cerón. 2009. Diversidad Genética del Bocachico (Prochilodus reticulatus) de la Cuenca Alta del Río Cauca (Colombia). Acta Biológica Paranaense 38(3-4): 113-138.

Loxdale, H.D. y G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. Bulletin of Entomological Research 88: 577–600.

Lubchenco, J., S.R. Palumbi, S.D. Gaines y S. Andelman. 2003. Plugging a hole in the ocean: The emerging science of marine reserves. Ecological Applications 13(S1): S3–S7.

Lundberg, J.G., L.G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M.C.S.L. Malabarba y F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena (eds.). pp. 13–48. Edipucrs, Porto Alegre.

Mamuris, Z., C. Stamatis, M. Bani y C. Triantaphyllidis. 1999. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: Allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. Journal of Fish Biology 55: 572–587.

Mancera-Rodríguez N.J., E.J. Márquez, J.C. Hurtado-Alarcón y J.D. Rangel-Medrano. 2012. Estudio genético en sabaleta Brycon henni (Pisces: Characidae) y Saccodon dariensis (Pisces: Parodontidae) en el oriente de Antioquia, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomia, Medellín. Volumen 65 (Supl I): 57-59.

Marshall, T.C., J. Slate, L.E.B. Kruuk y J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7: 639–655.

Marshall, C.T. y H.I. Browman. 2007. Disentangling the causes of maturation trends in exploited fish populations. Marine Ecology Progress Series 335: 249–251.

Martínez-Lage, A., A. González-Tizón y J. Méndez. 1994. Characterization of different chromatin types in Mytilus galloprovincialis L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. Heredity 72: 242-249.

Matsumoto, T., W. Yukawa, Y. Nozaki, R. Nakashige, M. Shinya, S. Makino, M. Yagura, T. Ikuta, T. Imanishi, H. Inoko, G. Tamiya y T. Gojobori. 2004. Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. Nucleic Acids Research 32(20): 6069–6077.

Mejía, L.S. y A. Acero. (Eds.). 2002. Libro rojo de peces marinos de Colombia. INVEMAR, Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Medio Ambiente. La serie Libros rojo de especies amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. 174 p.

Miller, C.R. y L.P. Waits. 2003. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (Ursus arctos): Implications for conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 4334–4339.

Montaño-Arias, D.A., G. Forero y P. Sandoval. 2010. Análisis de la variabilidad genética del bagre rayado Pseudoplatystoma fasciatum, de dos localidades de los ríos Magdalena y Amazonas en Colombia. Revista de Investigaciones UNAD 9(2): 519-525.

Montaño-Arias, D.A. 2008.Variabilidad Genética en Pseudoplatystoma fasciatum en ambientes acuáticos del Orinoco Colombiano. Revista Cientifica de Unincca 13(1): 153-162.

Montaño-Arias, D.A. y H. Gallo. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado P. fasciatum (Linnaeus, 1766) en el río Magdalena. Revista de investigaciones UNAD 2: 55-71.

Montaño-Arias, D.A. y G. Forero. 2003. Estructura genética de cuatro poblaciones de cachama blanca (Piaractus brachypomus) de la Amazonía colombiana. Revista de investigaciones UNAD 2: 71-83.

Montaño-Arias, D.A. 2003. Genetic variability in two species of Pimelodidae (Siluriformes). Revista de investigaciones UNAD 2 (2): 48-56.

Montaño-Arias, D.A., H. Gallo y J. Díaz. 2002. Variabilidad genética en el bagre (Pseudoplatystoma fasciatum) en la cuenca del río Magdalena. Expedición Científica y Cultural UNAD Colombia 8: 1-10.

Montaño-Arias, D.A. 2001. Variabilidad Genética en Pseudoplatystoma fasciatum y P. tigrinum en ambientes acuáticos de la amazonía y Orinoquia Colombiana. Memorias VI Simposio Colombiano de Ictiología. ACICTIOS - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 38.

Moreira, A.A., A.W.S. Hilsdorf, J.V. Silva y D.A. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira 42: 521-526.

Moysés, C.B., S. Mockford, L.F. Almeida-Toledo y J.M. Wright. 2005. Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel Eigenmannia (Teleostei, Gymnotiformes). Molecular Ecology Notes 5: 7-9.

Muhlfeld, C.C., S.T. Kalinowski, T.E. McMahon, S. Painter, R.F. Leary, M.L. y F.W. Allendorf. 2009. Hybridization reduces fitness of cutthroat trout in the wild. Biology Letters 5: 328–331.

Nakayama, C.M., E. Feldberg y L.A.C. Bertollo. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalmidae (Characiformes) from the Amazon basin. Neotropical Ichthyology 10(1): 53-58.

Nakayama, C., M. Jégu, J.I.R. Porto y E. Feldberg. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within Serrasalmus rhombeus (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. Copeia: 3: 866-869.

Nakayama, C.M., J.I. Rebelo y E. Feldberg. 2002. A comparative cytogenetic study of five piranha species (Serrasalmus, Serrasalminae) from the Amazon basin. Genetica: 114: 231-236.

Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World, 4th edn. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, 601 p.

Ochoa-Orrego, L., G. Fernández-García, L.F. Jiménez, J. Macrander y G. Orti. 2009. Identificación genética de algunas especies de peces migratorias de la cuenca del río Magdalena, Colombia. Memorias X Simposio Colombiano de Ictiología. Revista Actualidades biológicas 31 (Supl.1): 113-114.

Olivares, A., S. Caballero y P. Falla. 2010. Identificación de algunas especies del género Mugil por análisis de RFLP del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI). Memorias del III Congreso Colombiano de Zoología. Noviembre 21 al 26 de 2010 Medellín, Colombia. P. 25.

Oliveira, C, F. Foresti y A. W. S. Hilsdorf. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. Fish Physiology and Biochemistry (35):81–100. DOI 10.1007/s10695-008-9250-1

Oliveira, C., L.H.G. Pereira y F. Foresti. 2010. Determinación de la diversidad genética de la arawana azul (Osteoglossum ferreirai) para su manejo y conservación en la Orinoquia colombiana. Memorias del III Congreso Colombiano de Zoología. Noviembre 21 al 26 de 2010 Medellín, Colombia. P. 25.

Oosterhout, C.V., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting geno-

typing errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535–538.

Ortí, G., C. Li y I. Farias. 2005. Filogenia, filogeografía y estructura poblacional de las especies de Prochilodus (Prochilodontidae, Characiformes) en las principales cuencas fluviales de Sudamérica. p. 116-122. En: Renno, J.-F., C. García-Davila, F. Duponchelle y J. Nuñez (eds.). Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y piscicultura. Comunicaciones del primer coloquio de la Red de Investigaciones sobre la Ictiofauna Amazónica, Iquitos, Perú. 259 p.

Ospina-Guerrero, S.P., R.M. Landinez-García, D.J. Rodríguez-Castro, R Arango y E. Márquez. 2008. Genetic connectivity of Stegastes partitus in the South Caribbean evidenced by microsatellite analysis. Ciencias Marinas 34 (2): 155-163.

Page, R.D.M. y E.C. Holmes. 1998. Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science Ltd., NY. pp. 138-144.

Panarari-Antunes, R.S., A.J. Prioli, S.M.A.P. Prioli, H.F. Júlio Jr., C.S. Agostinho y L.M. Prioli. 2008. Molecular variability in Brycon cf pesu Müller and Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) from the Araguaia-Tocantins Basin. Genetics and molecular Research 7(1): 95-106.

Parada, S., J.A. Arias y P.E. Cruz. 2003. Caracterización cariotípica del yamú (Brycon siebenthalae). Rev. Orinoquia. 7: 42-46.

Pareja Molina, A.D. 2002. Estudio de la variación genética de Brycon henni del Departamento de Antioquia mediante RAPD-PCR. Trabajo de grado. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. 34p.

Perdomo, A., V. Cobos y C. Burbano. 2009. Molecular markers confirm three species taxonomically described as new for the genus

Pseudoplatystoma (Siluriformes: Pimelodidae). Memorias X Simposio Colombiano de Ictiología. Revista Actualidades biológicas 31 (Supl.1): 115.

Perdomo, A. 2008. Caracterización genética de Pseudoplatystoma magdaleniatum (siluriformes: pimelodidae) en Colombia, utilizando marcadores microsatelitales: implicaciones en conservación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Pérez-Ruzafa, A., M. González, P. Lenfant, C. Marcos y J. García-Charton. 2006. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. Biological Conservation 129: 244–255.

Pineda-Santis, H., L. Arboleda, A. Echeverry, S. Urcuqui, D. Pareja, M. Olivera y J. Builes. 2007. Caracterización de la diversidad genética en el pez Brycon henni (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. Revista de Biología Tropical 55(3-4): 1025-1035.

Pineda-Santis, H. R., M. Olivera-Ángel, S. Urcuqui, E.Trujillo y J. Builes-Gómez. 2006. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de Piaractus brachypomus (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 19(1): 66-69.

Pineda-Santis, H., D. Pareja-Molina, M. Olivera-Ángel y J. Builes-Gómez. 2004. Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17(S): 30-37.

Piorski, N.M., A. Sanches, L.F. Carvalho-Costa, T. Hatanaka, M. Carrillo-Avila, P.D. Freitas y P.M. Galetti Jr. 2008. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. Brazilian Journal of Biology 68 (4S): 1039-1050.

Plan Development Team. 1990. The potential of marine fishery reserves for reef fish management in the US southern Atlantic. NOAA Technical Memorandum, NMFS-SEFC 261, Miami.

Porto-Foresti, F., C. Oliveira, E. Gomes, Y.A. Tabata, M.G. Rigolino y F. Foresti. 2004. A lethal effect associated with polymorphism of the NOR- bearing chromosomes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Genetics and Molecular Biology 27(1): 51-54.

Povh, J.A., H.L.M. Moreira, R.P. Ribeiro, A.P. Prioli, L. Vargas y D.V. Blanck. 2005. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) com a técnica de RAPD. Acta Scientiarum. Animal Sciences 27: 1-10.

Povh, J.A., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol y J.D.P. Streit. 2008. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43: 201-206.

Powers, A.D. y P.M. Schulte. 1998. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: A multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish. Journal of Experimental Zoology 282: 71–94.

Pritchard, L.I., A.R. Gould, W.C. Wilson, L. Thompson, P.P.C. Mertens y A.M. Wade-Evans. 1995. Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. Virus Research 35: 247–261.

Prithiviraj, F., B.J. Evans, J.C. Morales y D.J. Melnick. 2001. Electrophoresis artefacts: a previously unrecognized cause of error in microsatellite analysis. Molecular Ecology Notes 1: 325-328.

Ramírez-Gil, H. 2001. Diferenciacao genética de populacoes de Surubin (Pseudoplatystoma fasciatum) e de caparari (P. tigrinum) nas

bacias Magdalena, Orinoco e Amazonas. Tese de Doutorado. Programa de Posgraduacao INPA/FUA. Manaus (AM), Brasil. 2001.

Renno, J-F, P. Berrebi, T. Boujard y R. Guyomard. 1990. Intraspecific genetic differentiation of Leporinus friderici (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. Journal of Fish Biology 36: 83–95.

Revaldaves, E., L.H.G. Pereira, F. Foresti y C. Oliveira. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in Pseudoplatystoma corruscans (Siluriformes, Pimelodidae) and cross-species amplification. Molecular Ecology Notes 5: 464-465.

Revaldaves, E., E. Renesto y M.F.P.S. Machado. 1997. Genetic variability of Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. Brazilian Journal of Genetics 20: 381–388.

Roberts, C.M. 1997. Ecological advice for the global fisheries crisis. Trends in Ecology and Evolution 12: 35–38.

Roberts, C.M., J.A. Bohnsack, F. Gell, J.P. Hawkins y R. Goodridge. 2001. Effects of marine reserves on adjacent fisheries. Science 294: 1920–1923.

Rocha-Olivares, A., M. Bobadilla, S. Ortega, S. Saavedra y J.R. Sandoval. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado Coryphaena hippurus en poblaciones del pacífico. Ciencias Marinas 32: 569-578.

Rocha-Olivares, A. y J.R. Sandoval-Castillo. 2003. Mitochondrial diversity and genetic structure in allopatric populations of the Pacific red snapper Lutjanus peru. Ciencias Marinas 29: 197–209.

Roest-Crollius, H. y J. Weissenbach. 2005. Fish genomics and biology. Genome Research 15: 1675-1682.

Roest-Crollius, H., O. Jaillon, A. Bernot, C. Dasilva, L. Bouneau, C.

Fizames, P. Wincker, P. Brottier, F. Quetier, W. Saurin, *et al.,* 2000. Human gene number estimate provided by genome wide analysis using Tetraodon nigroviridis genomic DNA. Nature Genetics 25: 235–238.

Rueda, E.C., P. Amavet, P.A. Scarabotti y G. Ortí. 2011. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish Prochilodus lineatus (Characiformes: Prochilodontidae). Conservation Genetics Resources 3: 381-684.

Ruzzante, D.E., S. Mariani, D. Bekkevold, C. André, H. Mosegaard, L.A.W. Clausen, T.G. Dahlgren, W.F. Hutchinson, E.M.C Hatfield, E. Torstensen, J. Brigham *et al.,* 2006. Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 273: 1459–1464.

Saccone, C., C. Gissi, C. Lanave, A. Larizza, G. Pesole y A. Reyes. 2000. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. Gene 261: 153-159.

Salas, E. y J. Boza. 1991. Citotaxonomía comparativa de tres especies de Cichlasoma (Pisces: Cichidae) nativas de Costa Rica. Revista de Biología Tropical 39: 219-224.

Sanches, A. y P.M. Galetti Jr. 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish Brycon hilarii. Molecular Ecology Notes 6: 1045-1046.

Sanches, A. y P.M. Galetti Jr. 2007. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish Brycon hilarii (Valenciennes, 1850). Brazilian Journal of Genetics 67(4S): 889–895. doi:10.1590/S1519-69842007000500012

Santacruz, D. 2003. Evaluación de la variabilidad genética con mar-

cadores microsatélites del bocachico, Prochilodus magdalenae (Steindachner 1878), en el río Sinú, Colombia. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Santacruz, D., W. Usaquen y C. Burbano. 2004. Evaluación de la variabilidad genética con marcadores microsatélites del bocachico, Prochilodus magdalenae (Steindachner 1878) en el río Sinú, Colombia. En: Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura. p.39 – 41.

Santos, M. da C.F., T. Herbek y I.P. Farias. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (Colossoma macropomum, Serrasalmidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. Molecular Ecology Resources 9: 874-876.

Santos, U., C.M. Völcker, F.A. Belei, M.B. Cioffi, L.A.C. Bertollo, S.R. Paiva y J.A. Dergam. 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical Hoplias malabaricus (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. Journal of Fish Biology 75: 2326–2343.

Scribner, K.M., P.A. Crane, W.J. Spearman y L.W. Seeb. 1998. DNA and allozyme markers provide concordant estimates of population differentiation: analyses of US and Canadian populations of Yukon River fall-run salmon (Oncorhyncus keta). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic 55: 1748–58

Shaw, P.W., G.J. Pierce y P.R. Boyle. 1999. Subtle population structur- ing within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid Loligo forbesi, demonstrated with microsatellite DNA markers. Molecular Ecology 8: 407– 417.

Shepard, B.B., B.E. May y W. Urie. 2005. Status and conservation of westslope cutthroat trout within the western United States. North American Journal of Fisheries Management 25: 1426–1440.

Shinde, D., Y.L. Lai, F.Z. Sun y N. Arnheim. 2003. Taq DNA polyme-

rase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. Nucleic Acid Research 31: 974–980.

Silva, A. 2001. Caracterización citogenética de bocachico Prochilodus reticulatus de la cuenca del rio Magdalena. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu y P. Flook. 1994 Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochon- drial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction "primers". Annals of the Entomological Society of America 87: 651–701.

Sivasundar A., E. Bermingham y G. Ortí. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. Molecular Ecology 10: 407-418.

Sola, L., P.J. Monaco y E.M. Rasch. 1990. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of Poecilia. I. C-bands, Ag-Nobn R polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of Poecilia latipinna. Cytogenet. Cell Genetics. 53: 148-54.

Solé-Cava, A.M. y A.J. Levy. 1987. Biochemical evidences for a third species of angel shark off the east coast of South America. Biochemical Systematics and Ecology 15: 139–144.

Solé-Cava, A.M., C.M. Vorren y A.J. Levy. 1983. Isozymic differentiation of two sibling species of Squatina (Chondrychthyes) in South Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology 75b: 355–358.

Sotero-Caio, C. G. y R.J. Baker. 2010. Filogeografía de Mugil liza y Mugil platanus (Teleostei: Mugiliformes) empleando dos genes mitocondriales. Memorias del III Congreso Colombiano de Zoología. Noviembre 21 al 26 de 2010 Medellín, Colombia. P. 26.

Strecker, U. 2003. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish Astyanax fasciatus. Molecular Ecology Notes 3: 150-151.

Sumner, A.T., H.J. Evans y R.A. Buckland. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature: New Biology 232: 31–32.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304-306.

Taberlet, P. y G. Luikart. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. Biology Journal of the Linnean Society 68: 41–55.

Thompson, K. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. Copeia 4: 679-691.

Treml, E.A., P.N. Halpin, D.L. Urban y L.F. Pratson. 2008. Modeling population connectivity by ocean currents, a graph-theoretic approach for marine con- servation. Landscape Ecology 23: 19–36.

Turner, T.F., M.V. Mcphee, P. Campbell y K.O. Winemiller. 2004. Phylogeography andintraspecific genetic variation of Prochilodontid fishes endemic to rivers of northernSouth America. Journal of Fish Biology 64: 186–201.

Uribe-Alcocer, M., J. Arreguín-Espinosa, A. Torres-Padilla y A. Castro-Pérez. 1983. Los cromosomas de Dormitador latifrons (Pisces: Gobiidae). Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México 10: 23-30.

Useche, Y.M. 2010. Caracterización genética de Hoplias malabaricus (Characiformes) en el rio San Jorge, Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Valenzuela, E. 2001. Caracterización citogenética del blanquillo Sorubim cuspicaudus (Siluriformes: Pimelodidae) de una población

colombiana del río Sinú. Tesis de Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Valière, N. 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. Molecular Ecology Notes, 2: 377–379.

Venere, P.C. y P.M. Galetti Jr. 1989. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. Brazilian Journal of Genetics 12: 17-25.

Viana-Silva, J. y A.W. Silva-Hilsdorf. 2011. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from Salminus hilarii (Characiformes: Characidae). Conservation Genetics Resources 3: 437–439.

Vieira, V., R. Ribeiro, L. Vargas, H. Marques, J. Povh y N. Lopera. 2005. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) com o uso do marcador de RAPD. Revista Académica Curitiba 3: 41-49.

Wandeler, P., S. Smith, P.A. Morin, R.A. Pettifor y S.M. Funk. 2003. Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. Molecular Ecology 12: 1087–1093.

Waples, R.S. y M. Yokota. 2007. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. Genetics 175: 219–233.

Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira, J.A. Senhorini y F. Foresti. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (Brycon cephalus) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. Journal of Applied Ichthyology 20: 48-52.

Wasko, A.P. y P.M. Galetti Jr. 2002. RAPD analysis in the neotropical fish Brycon lundii: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. Hydrobiologia 474, 131-137.

Wattier, R., C.R. Engel, P. Saumitou-Laprade y M. Valero. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in Gracilaria gracilis (Rhodophyta). Molecular Ecology 7: 1569-1573.

Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38(6): 1358–1370.

Williams, J.G.K., M.K. Kubelik, K.J. Licak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Wilson, D.S. y A.B. Clarke. 1996. The shy and the bold. Natural History 9: 26–28.

Xu, Z., X. Guo, P.M. Gaffney y J.C. Pierce. 2001. Chromosomal location of the major ribosomal RNA genes in Crassostrea virginica and Crassostrea gigas. Veliger 44: 79–83.

Zawadzki, C.H., R.E. Reis y E. Renesto. 2000. Allozyme descrimination of three species of Loricariichthys (Siluriformes: Loricariidae) from the Southern Brazil. Rev. Suisse de Zool. 107: 663–674.

Young, W.P., P.A. Wheeler, V.H. Coryell, P. Keim y G.H. Thorgaard. 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. Genetics. 148: 439-850.

Zhang, Q., G. Yu, R.K. Cooper y T.R. Tiersch. 1999. Chromosomal location by fluorescence in situ hybridization of the 28S ribosomal RNA gene of the Eastern oyster. Journal of Shellfish Research 18: 431-435.

CAPÍTULO 7

Uso de técnicas moleculares como herramienta para conservar la diversidad biológica

J. Gastón Zamora-Abrego[1],
Norma L. Manríquez-Morán[2],
Carlos E. Ortíz-Yusty[3],
y Ángela M. Ortega-León[4].

[1] Lic Ecología, M. en C. Grupo de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Medellín.

[2] M. en C., Dra. Laboratorio de Sistemática Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

[3] Biol, MSc. Grupo de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Medellín

[4] Biol, MSc., Dra. Grupo de Biodiversidad, Departamento de Biología, Universidad de Córdoba – Montería.

Existe una armonía interior de movimiento y equilibrio en todos los ecosistemas adaptados al hombre; su función es simple: crear y mantener esquemas coordinados más y más diversificados. Es la propia vida la que aumenta la capacidad de un sistema cerrado para sustentar la vida. La vida se halla al servicio de la vida. Los alimentos necesarios para la vida, son creados *por* la vida cada vez en mayor abundancia a medida que se incrementa la diversificación de esta vida…

… pero más allá de un punto crítico, los grados de libertad, en un espacio finito, disminuyen a medida que se incrementa el número. Esto resulta válido tanto para los hombres en el espacio finito de un ecosistema, como para las moléculas de gas en una redoma sellada. La cuestión para los seres humanos no es saber cuántos de ellos podrán sobrevivir dentro del sistema, sino qué tipo de existencia será posible para aquellos que sobrevivan.

Pardot Kynes, 1er Planetólogo de Arrakis (Herbert, 2003).

INTRODUCCIÓN

La biología molecular es un área de la biología que busca explicaciones a las células y organismos en términos de la estructura y función de las moléculas (Maddison, 1996; Becerra y Paredes, 2000; Weaver, 2011). Las moléculas más frecuentemente analizadas son las macromoléculas del tipo proteínas y ácidos nucleícos (Slater, 1988; Hillis *et al.,* 1996), y la aplicación de marcadores genéticos moleculares a problemas de evolución, ecología y conservación se le ha denominado como "Ecología Molecular" (Frankham, 2003; Freeland, 2005; Eguiarte *et al.,* 2007). La ecología molecular es un área pluridisciplinar de la ecología, donde el principal objetivo es la aplicación de marcadores genéticos de tipos estables, discretos y heredables, a fin de identificar individuos, poblaciones o especies, para estudiar las relaciones que se establecen entre éstos (Maddison, 1996; Avise, 2004; Rach *et al.,* 2008; Arif y Khan, 2009).

En la actualidad, los marcadores moleculares son una herramienta indispensable en muchas áreas de acción de la biología, como en evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses, estudios de diversidad y conservación (Frankham *et al.,* 2002; Rentería-Alcántara, 2007; Rach *et al.,* 2008). Por ejemplo, diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Hughes y Queller, 1993; Kashi y Soller, 1999; Arif y Khan, 2009). Desde hace varias décadas, se han venido desarrollando diferentes técnicas moleculares, que permiten identificar o determinar cómo se encuentran las diferentes proporciones

de genes al interior de las poblaciones naturales, ya sea de manera indirecta, con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de DNA (Hedrick, 1999; Groombridge *et al.,* 2000; Frankham *et al.,* 2002; Avise, 2004).

La elección de marcadores apropiados para tratar de resolver cuestiones particulares, se basa en el poder de resolución necesario para determinar las diferencias genéticas entre individuos, poblaciones y otras unidades taxonómicas de interés (Becerra y Paredes, 2000; Sunnucks, 2000; Arif y Khan, 2009). Además, la calidad y cantidad de fuentes de DNA así como el tamaño requerido de la muestra, ha sido tomado en consideración cómo el factor que afecta la aplicabilidad y el costo-beneficio de una particular técnica molecular (Bruford y Wayne, 1993; Frankham, 2003; Avise, 2004; Freeland, 2005). Por ejemplo, la caracterización genética de poblaciones naturales se realizó en primera instancia, a través del estudio de polimorfismos genéticos de isoenzimas, que permiten detectar una caída en la heterocigosis poblacional (Allendorf y Leary, 1986; Hughes y Queller, 1993; Hedrick, 1999; Russello y Amato; 2004). Posteriormente se comenzaron a utilizar marcadores moleculares del DNA, tales como RFLP (Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPD (Análisis de polimorfismos del DNA amplificado al azar), huellas digitales del DNA (*DNA fingerprinting*) y secuenciación del DNA nuclear y mitocondrial (Soltis *et al.,* 1998; Moxon y Wills, 1999; Neff y Gross, 2001; Zhang y Hewitt, 2003), para identificar diferencias genéticas entre individuos y poblaciones que provee información sobre la

identidad individual, la determinación de la paternidad y el aislamiento genético intraespecífico entre poblaciones. Otros marcadores genéticos con moderada tasa de evolución, como las alozimas y la región control del DNA mitocondrial (mtDNA), han sido empleados para resolver las distancias genéticas a niveles taxonómicos intermedios (Zardoya y Meyer, 1996; Gemmell *et al.,* 2004; Rach *et al.,* 2008; Arif y Khan, 2009).

UNA BREVE INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y SU UTILIDAD EN LA CONSERVACIÓN BIOLÓGICA

Uno de los grandes retos de la biología de la conservación, ha sido detectar entidades taxonómicas de singular importancia para la ciencia y la conservación de especies, así como para establecer prioridades para administrar los esfuerzos de conservación. Tradicionalmente, los biólogos de la conservación han ignorado el uso de métodos filogenéticos para identificar aquellos procesos ecológicos, biogeografícos o evolutivos, que están ligados a las especies en riesgo o a su posible extinción (Ornelas, 1998; Fisher y Owen, 2004; Gittleman *et al.,* 2004; Eguiarte *et al.,* 2007).

En ecología molecular, el conocimiento de la diversidad y estructura genética es de fundamental importancia para la conservación biológica, ya que son la base de la variación organísmica y tienen una estrecha correlación con la habilidad que tienen los organismos para evolucionar en respuesta a los cambios ambientales (Crandall *et al.,* 2000; Purvis *et*

al., 2000; Kotze y O'Hara, 2003; Thomas *et al.,* 2004). Sin embargo, la información filogenética es usualmente ignorada por los biólogos de la conservación, debido a que los procesos ecológicos y evolutivos son considerados en diferentes escalas de tiempo (Harvey, 1996; Bjorklund, 1997; Blomberg y Garland, 2002; Kraft *et al.,* 2007); es decir, cuando los biólogos de la conservación intentan entender que carácter o grupo de características que posee una especie en particular, le permite ser exitoso bajo diferentes circunstancias ecológicas, la información filogenética puede ser de mucha utilidad para identificar la trayectoria evolutiva de dicho carácter o de dicha especie (Crandall *et al.,* 2000; Schluter, 2000; Wiens, 2004). En este sentido, los análisis filogenéticos pueden ayudar a la conservación de especies revelando la estructura genética de una población, la historia evolutiva de los organismos de interés y el potencial evolutivo de los taxones (Harvey, 1996; Ferson y Burgman, 2000). Esta información puede servir para detectar el pasado, el presente y posiblemente la disminución futura de las poblaciones naturales, además de establecer la singularidad del potencial evolutivo de cada población o especie amenazada o en peligro de desaparecer (Faith, 1992; Avise y Hamrick, 1996; Purvis *et al.,* 2005; Thomsen *et al.,* 2011). En la actualidad, poblaciones naturales de especies amenazadas están siendo manejadas para conservar su diversidad y estructura genética, a partir del incremento de la adecuación individual, y el mantenimiento del potencial evolutivo para futuras adaptaciones (Ferson y Burgman, 2000; Frankham, 2003; Eguiarte *et al.,* 2007; Banhos *et al.,* 2008). Además, la proliferación de estudios moleculares en los últimos años, ha facilitado las estimaciones fiables

de algunas formas de diversidad genética y análisis filogenéticos en varios niveles taxonómicos, con lo cual ha sido posible detectar *Unidades Evolutivas Significativas* (*por sus siglas en inglés* ESU's: Crandall *et al.,* 2000; Avise, 2004; Arif y Khan, 2009), que son unidades intraespecíficas con suficiente variación ecológica y divergencia evolutiva de importancia para el proceso de adaptación y/o con evolución potencial independiente (Vogler y DeSalle, 1994), como para requerir esfuerzos de conservación independiente (Moritz, 1994), o incluso para ser designadas como especies distintas (*ver* Godoy, 2009).

En este trabajo, se hará una breve revisión del uso de algunos métodos de análisis filogenéticos aplicados a la conservación de la diversidad biológica y se presentarán las evidencias que los apoyan, particularmente los estudios que expliquen la validez de incorporar la información filogenética en establecer criterios para la evaluación de especies en riesgo y prioridades en los esfuerzo de conservación, así como identificar especies en riesgo.

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

Filogeografía

En 1987, Avise y colaboradores acuñaron el concepto de filogeografía para hacer referencia a la disciplina que estudia el arreglo espacial de los linajes genéticos, dentro y entre especies estrechamente relacionadas (Avise, 2009).

Una década antes de la propuesta de Avise *et al.* (1987), los científicos habían comenzado a utilizar al DNA mitocondrial (mtDNA) para evaluar las genealogías de individuos de la misma especie y gracias a ello descubrieron que dichas genealogías estaban relacionadas con la geografía (Arbogast y Kenagy, 2001; Beheregaray, 2008; Avise, 2009).

La filogeografía implica el estudio de los aspectos históricos de la distribución actual de los linajes génicos, por ello se considera una subdisciplina de la biogeografía histórica, la cual integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática y paleontología (Avise, 2000; Hewitt, 2001; Beheregaray, 2008; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). También ha sido considerada como una rama de la biología evolutiva, que sirve de puente entre la microevolución y la macroevolución (Losos, 2008; Hickerson *et al.,* 2010; Beck *et al.,* 2012).

Gracias a la filogeografía, se aplicó por vez primera el análisis de genealogías de genes al estudio de la evolución de las poblaciones, lo que permitió hacer conclusiones acerca de las secuencias de colonización, diversificación y extinción de los linajes génicos en ciertas áreas (Schneide *et al.,* 1998; Hewitt, 2001; Lanteri y Confalonieri, 2003; Alter *et al.,* 2007). Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas, permite establecer los componentes demográfico e histórico de la evolución intraespecífica y plantear hipótesis sobre eventos comunes de vicarianza o dispersión, así como identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron

haber influido en ellos (Arbogast y Kenagy, 2001; Lanteri y Confalonieri, 2003; Araújo y Guisan, 2006; Alter *et al.,* 2007).

Aunque la filogeografía se ha utilizado para conocer los patrones históricos de poblaciones que pertenecen a la misma especie, los estudios en ésta área también pueden ser utilizados para inferir procesos demográficos históricos, como flujo génico, tamaño efectivo de la población, cuellos de botella y secuencias de colonización (Templeton, 1998; Irwin, 2002; Carstens *et al.,* 2005, Rissler y Apodaca, 2007). Además, los estudios filogeográficos son cada vez más utilizados en la delimitación de especies y en el reconocimiento de unidades más precisas de conservación (Avise *et al.,* 1987; Moritz y Faith, 1998; Avise, 2000; 2009; Wiens y Penkrot, 2002; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

El surgimiento de la filogeografía no hubiera sido posible sin el avance de dos aspectos de la biología evolutiva. Por un lado, el aspecto conceptual, que impulsó la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de procesos microevolutivos; y por el otro, el tecnológico, que permitió disponer de datos sobre la variabilidad intraespecífica en forma de secuencias de DNA (Lanteri y Confalonieri, 2003; Carstens *et al.,* 2005; Beheregaray *et al.,* 2008; Avise, 2009; Hickerson *et al.,* 2010).

La Teoría de Coalescencia

La teoría de la coalescencia proporciona un marco conceptual para el estudio de los procesos históricos que influyeron en las poblaciones y que dieron lugar a

la distribución actual de los linajes génicos (Lanteri y Confalonieri, 2003), fue concebida como un modelo de separación de linajes y deriva génica, para analizar la variación genética como un proceso estocástico que describe la forma en que los eventos genéticos poblaciones van hacia atrás en el tiempo, hasta un ancestro común (Hudson, 1990; Harding, 1996; Cruzan y Templeton, 2000; Nordborg, 2000; Hein *et al.,* 2005).

La coalescencia se basa en la teoría matemática propuesta por Kingman (1982) para describir una genealogía de genes hacia atrás en el tiempo. Esta teoría se distingue de la genética de poblaciones tradicional, debido a que se basa en la teoría neutral[1] (Kimura, 1980), y considera que las mutaciones neutras se acumulan a lo largo de las ramas de los árboles, que representan las genealogías de genes (Hudson, 1990; Nordborg, 2000; Hein *et al.,* 2005). Si se considera la neutralidad, en una población de tamaño constante, a lo largo de varias generaciones y de manera continua, surgirán alelos nuevos a través de la mutación y otros se perderán gracias a la deriva génica. Por lo que sin importar cuantos linajes distintos existan en cierto momento o generación en una población, todos ellos se remontaran (o coalescerán) a un alelo ancestral único (Hudson, 1998; Lanteri y Confalonieri, 2003; Avise, 2009; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009) (Fig. 1). Si la coalescencia se aplica a las secuencias de diversos alelos de un determinado locus, se

[1] La teoría neutral de la evolución molecular señala que la mayor parte de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados por la deriva génica de mutantes selectivamente neutros (Kimura, 1980)

puede describir la historia evolutiva de esos alelos si se rastrea hacia atrás, el punto en el que se unen o coalescen (Fig. 1; Cruzan y Templeton, 2000; Eizirik *et al.,* 2001; Beheregaray *et al.,* 2003; Vázquez-Domínguez *et al.,* 2009). Los tiempos de coalescencia pueden ser influenciados por diversos procesos que ocurren a nivel poblacional, tales como fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, existencia de selección natural o variaciones en el flujo génico (Harding, 1996; Lanteri y Confalonieri, 2003; Vázquez-Domínguez *et al.,* 2009). Por ejemplo, una población que ha tenido un crecimiento exponencial reciente coalescerá más rápidamente que una población que ha estado en una estasis demográfica o que ha disminuido de tamaño (Cuenca *et al.,* 2003; Carstens *et al.,* 2005; DeChaine y Martin, 2006; Hickerson *et al.,* 2010).

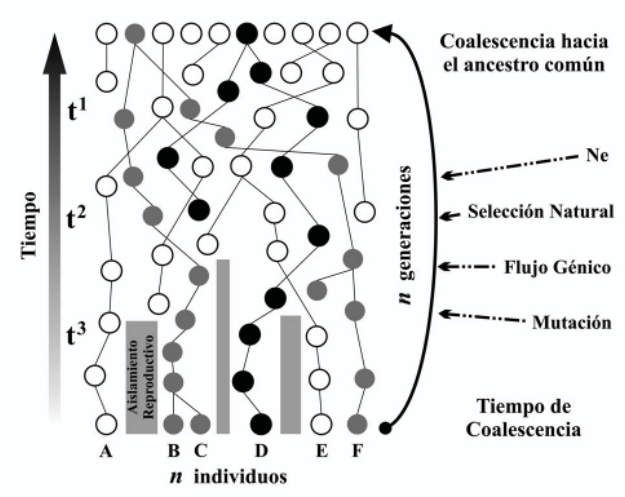

Figura 1. Relación genealógica poblacional entre diez individuos (haplotipos). Los linajes individuales pueden rastrearse en el tiempo (t^1, t^2 & t^3) para identificar diferentes eventos coalescentes. Se muestran potenciales aislamientos reproductivos (barras grises), así como diferentes fuerzas microevolutivas (*p.e.*, tamaño efectivo de la población, selección natural, mutación) que podrían eventualmente determinar diferentes patrones coalescentes.

La teoría de coalescencia ha permitido la unión conceptual y analítica de la genética de poblaciones (*p.e.*, selección, deriva génica, mutación, recombinación, migración), la filogeografía, la demografía histórica y la evolución, haciendo que el foco de estudio de estas áreas sea el árbol de genes (Hudson, 1990; 1998; Templeton, 2001; Hein *et al.,* 2005; Nielsen y Beaumont, 2009). La capacidad de generar secuencias de DNA en forma más rápida y confiable ha permitido también, generar genealogías de haplotipos que han mostrado tener la capacidad de hacer inferencias en diferentes campos de la evolución (Cruzan y Templeton, 2000; Hewitt, 2001; Zink, 2002): distribución geográfica y vicarianza (Ferrier, 2002; Hardy *et al.,* 2002; Irwin, 2002; Beheregaray *et al.,* 2003; Carstens *et al.,* 2005, Rissler y Apodaca, 2007), fragmentación de hábitats (Eizirik *et al.,* 2001, Manel *et al.,* 2003, Storfer *et al.,* 2007), expansión del rango de distribución de especies y poblaciones (Hewitt, 2001; Irwin, 2002; Hey y Machado, 2003; Rissler y Apodaca, 2007), eventos de migración (Schneider *et al.,* 1998, Eizirik *et al.,* 2001; Irwin, 2002), extinción de linajes génicos (Cruzan y Templeton, 2000; Carstens *et al.,* 2005; Hull *et al.,* 2008), o conservación (Moritz, 1995, Moritz y Faith, 1998; Eizirik *et al.,* 2001; Ferrier, 2002; Beheregaray *et al.,* 2003); así como, otros procesos que afectan la estructura de las poblaciones o que causan especiación en un contexto espacial y temporal (Arbogast *et al.,* 2002; Hardy *et al.,* 2002; Hey y Machado, 2003; Storfer *et al.,* 2007; Losos, 2008).

Marcadores Utilizados en Análisis Filogeográfico

Como se mencionó anteriormente, la historia de la filogeografía está relacionada con el desarrollo de las técnicas moleculares, pero también con los avances en el conocimiento de la molécula del DNA mitocondrial (mtDNA). Avise y colaboradores (1987), mencionaron las características que debería tener la molécula ideal para los análisis filogeográficos, y señalaron que el mtDNA presentaba propiedades que lo acercaban mucho a dicha molécula (Vázquez-Domínguez, 2007).

El mtDNA de los eucariontes fue adquirido simbióticamente y en el grupo de los animales, se compone por sólo 37 genes ligados entre sí, en una molécula circular de aproximadamente 17.000 pares de bases (Avise, 2009). Dos de los genes codifican para RNA's ribosomales, 22 para diferentes tipos de RNA de transferencia y 13 codifican para diversas subunidades de proteínas involucradas en el proceso de respiración celular (Avise, 2000; 2009).

Una de las características más importantes del mtDNA, es su elevada tasa de mutación; los primeros estudios de la molécula realizados en animales (Brown *et al.,* 1979), revelaron que el mtDNA evoluciona a tasas varias veces más altas que el DNA nuclear (nDNA) de una sola copia. Además, tanto células somáticas, cómo células germinales, presentan varias copias (a veces miles de ellas) prácticamente idénticas de mtDNA. Otra peculiaridad de esta molécula, es su transmisión por vía materna casi de manera exclusiva (Avise, 2009). Debido a esto, los primeros

estudios filogeográficos mostraron la historia matrilineal de individuos y poblaciones.

En las plantas, el mtDNA es una molécula altamente variable en tamaño (20-2500 kb), es dinámica en cuanto al reordenamiento de los genes, pero de evolución lenta si se considera la sustitución de nucleótidos. Se ha calculado que el mtDNA de las plantas evoluciona hasta 100 veces más lentamente que el de los animales (Avise, 2009). Por ello, el DNA del cloroplasto (cpDNA) ha sido la molécula utilizada más ampliamente en los estudios filogeográficos de plantas. La molécula del cpDNA varía moderadamente de tamaño entre las especies (120-217 kb en plantas terrestres), presenta alrededor de 120 genes que codifican para RNA's ribosomales y de transferencia, además de varios polipeptídos involucrados en la síntesis de proteínas y en la fotosíntesis. La transmisión de esta molécula puede ser materna, biparental o incluso paterna. El cpDNA es de evolución más rápida que el mtDNA de las plantas, aunque sigue siendo de evolución lenta si se le compara con el mtDNA de los animales. Por ello, el DNA del cloroplasto ha sido de mayor utilidad en análisis que involucran taxones de niveles taxonómicamente altos de plantas (Avise, 2009).

Aunque el DNA nuclear parecía tener varias desventajas para su aplicación en filogeografía (*p.e.,* evolución lenta, recombinación intragénica y la existencia de dos alelos en organismos diploides), actualmente se considera que la historia evolutiva de los organismos, es incompleta si se toma en cuenta la información de sólo un tipo de marcador.

Por ello, la utilización del DNA nuclear en conjunto con los citoplásmicos es cada vez más común en los estudios filogeográficos (Vázquez-Domínguez, 2007; Avise, 2009).

La Filogeografía en la Conservación

Originalmente, la filogeografía fue utilizada como una herramienta para determinar los distintos patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie (Avise *et al.,* 1987; Morando *et al.,* 2008), basándose en el principio de que las especies presentan cierto grado estructura filogeográfica, es decir, estructura genética asociada con la geografía.

La estructura filogeográfica es el resultado de la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos, en conjunto con los procesos geológicos y climáticos (Avise, 2000), lo que permite que dicha *estructura* tenga distintos niveles de complejidad, especies con vagilidad alta, con tasas altas de migración o con separación reciente, presentan una estructura filogeográfica débil, mientras que las especies con vagilidad baja, o que habitan en áreas con una geología compleja, presentan una estructura mayor (Avise, 2000; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

Aunque la especie ha sido utilizada como la unidad básica dentro de la biología de la conservación, la idea de proponer políticas de conservación en unidades por debajo del nivel de especie cobró importancia con la aparición de la filogeografía (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Los trabajos basados en el estudio del DNA a nivel poblacional, han sido utilizados para: *i*) medir la variación

genética al interior de las poblaciones; *ii*) identificar grupos de poblaciones evolutivamente divergentes; y, *iii*) evaluar poblaciones o áreas para su conservación, desde el punto de vista evolutivo (Moritz, 1994).

Evaluar la variación en el DNA dentro de las poblaciones, permite apreciar la pérdida de variabilidad genética, como consecuencia de la reducción en el tamaño poblacional debida a diversos factores (Gastón, 2010). Por otra parte, el caracterizar genéticamente a diversas poblaciones, permite identificar a aquellos grupos con historias evolutivas diferentes y establecer unidades más precisas para el manejo de la biodiversidad (Moritz, 1994). Taxonómicamente estos grupos han sido identificados como especies o subespecies, lo cual complica su manejo dentro de la legislación. Por ello, en años recientes se acuñó el concepto de ESU's (*unidades evolutivas significativas*), para hacer referencia a poblaciones genéticamente divergentes, que pueden ser utilizadas como unidades de conservación, independientemente de su categoría taxonómica (Moritz, 1994).

Utilizar ESU's puede contribuir a conservar un alto porcentaje de la variabilidad detectada a nivel genético, sin embargo las unidades pueden ser difíciles de delimitar, y es en este punto donde los estudios filogeográficos se vuelven trascendentales, pues el emplear la historia evolutiva en conjunto con la distribución geográfica de los alelos puede conducir al establecimiento de límites más precisos entre los linajes (Moritz, 1994; Bos y Sites, 2001; Avise, 2009).

Por ejemplo, el análisis filogeográfico realizado con el venado *Cervus eldi* (Balakrishnan *et al.,* 2003), distribuido en el sur de Asia e Indochina, permitió diferenciar genéticamente a las tres subespecies tradicionalmente descritas y a las poblaciones que integran cada una de ellas. La diversidad haplotípica encontrada en dos de las subespecies (*C. e. thamin* y *C. e. siamensis*) es relativamente alta y contrasta con la falta de variabilidad en los haplotipos de *C. e. eldi* y algunas poblaciones de *C. e. siamensis*. Con base en las diferencias genéticas encontradas en este ciervo, los autores sugieren medidas de conservación que consideren a cada subespecie como una unidad evolutivamente significativa. Por su parte, Ge y colaboradores (2011) estudiaron ocho diferentes poblaciones de *Tetraena mongolica*, que es una especie de arbusto amenazada y endémica de Mongolia y encontraron una estructura filogeográfica alta entre las poblaciones analizadas. Los autores señalaron que dados los altos niveles de diferenciación genética y la monofilia recíproca entre las poblaciones estudiadas, cada una de ellas representa una unidad evolutivamente significativa que debe ser tomada en cuenta para su conservación. En el caso del pez de agua dulce *Mogurnda adspersa*, que es un habitante común del sureste de Australia, actualmente enfrenta una reducción importante de sus poblaciones, debido a la alteración y destrucción de su hábitat, a la reciente introducción de especies y al manejo de las aguas donde habitan (Hurwood y Hughes, 1998; Boxall *et al.,* 2002). Faulks y colaboradores (2008) identificaron a las poblaciones de la costa y las del interior como ESU's, gracias a la monofilia recíproca, su segregación geográfica y su independencia evolutiva.

Por otro lado, los análisis filogeográficos que involucran a varias especies, permiten establecer áreas o regiones dentro de las que diversas especies presentan poblaciones genéticamente únicas (Moritz, 1994; Bermingham y Moritz, 1998). Por la falta de diferenciación morfológica, los estudios a nivel de especie suelen enmascarar poblaciones marcadamente divergentes que pueden ser importantes para la definición de áreas prioritarias para la conservación, por su alto porcentaje de ESU's (Moritz, 1994; Rissler *et al.,* 2006). El establecimiento de unidades filogeográficas, permite hacer una evaluación de la biodiversidad sin precedentes, pues gracias a ello, se han detectado áreas de endemismos nuevas, que no hubieran podido ser descubiertas si se hubiera utilizado a la especie como unidad de análisis (Rissler *et al.,* 2006). En el estudio realizado por Rissler y colaboradores (2006) en California, los autores utilizaron especies de anfibios y reptiles y detectaron diversas áreas con composiciones de linajes únicas. La diferenciación de dichas áreas, se llevó a cabo por la presencia de linajes endémicos o característicos en algunas de ellas, por lo que cada una de éstas fue considerada importante para su conservación. Por otra parte, la revisión de la variación genética y los patrones filogeográficos de la mastofauna europea, mostró patrones de riqueza y endemismo que no habían sido detectadas tomando en cuenta la diversidad de especies, definidas con el concepto biológico. Además los autores revelaron que es en las montañas del centro, donde se localiza la zona de mayor diversidad y endemismos, detectados genéticamente (Amori *et al.,* 2009).

Método Comparativo Filogenético

Uno de las principales maneras de estudiar los patrones y los procesos de evolución biológica, ha sido por medio del método comparado (Pagel y Harvey, 1988; Martins y Garland, 1991; Björklund, 1997; Martins, 2000). La comparación entre especies es una de las metodologías más ampliamente utilizadas en biología y ecología evolutiva (Harvey y Keymer, 1991; Harvey y Pagel, 1991; Larson y Losos, 1994; Morales, 2000), ya que nos permite entender *cómo* funciona la selección natural y *qué* adaptaciones produce; y en conjunto con la herencia ancestral, *cómo* han formado los rasgos que observamos en las especies actuales (Diniz-Filho, 2000; Morales, 2000; Blomberg y Garland, 2002; Rezende y Garland, 2003).

Los métodos comparativos filogenéticos (MCF), son métodos estadísticos que permiten analizar cualquier cantidad de información (*p.e.*, caracteres morfológicos, fisiológicos, ecológicos), incorporando las relaciones filogenéticas del grupo de interés, de tal forma que se puede evaluar *en qué* proporción la variación de un carácter dentro de un grupo se debe a la historia evolutiva compartida y *en qué* proporción la variación de ese mismo carácter, corresponde a las respuestas a presiones de selección experimentadas de manera independientes (Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000; Rezende y Garland, 2003). Por lo tanto, los MCF nos permiten identificar y cuantificar los efectos provocados por la historia evolutiva de un grupo (*p.e.*, inercia filogenética[2]

[2] La cantidad de variación explicada por la similitud filogenética (Cheverud *et al.,* 1985; Diniz-Filho *et al.,* 1998; Lynch, 1991; Morales, 2000).

o restricción filogenética[3]) y por la evolución independiente (*adaptación*) (Martins y Garland, 1991; Martins, 1993; 1996; Diniz-Filho, 2000). La comparación entre especies o entre categorías mayores (*p.e.*, géneros, familias u órdenes), actualmente es una de las herramientas metodológicas utilizadas más ampliamente, para identificar proceso evolutivos tan variados como las historias de vida (Harvey y Clutton-Brock, 1985; Bauwens y Díaz-Uriarte, 1997), abundancia y distribución de los organismos (Damuth, 1987; Polo y Carrascal, 1999), ecomorfología (Losos, 1990; Diniz-Filho *et al.,* 2000), ecofisiología (Garland y Adolph, 1994; Garland y Carter, 1994), etología (Martins, 1993; Martins *et al.,* 2004), así como en el ámbito de la biología de la conservación (Purvis *et al.,* 2000; Fisher y Owens, 2004; Bielby *et al.,* 2006; Cardillo y Meijaard, 2012).

En este sentido, los MCF pueden ser empleados para probar la variación de un grupo de especies a una variable respuesta (*p.e.*, riesgo de extinción) y las posibles variables explicativas (*p.e.*, tamaño corporal); así como, identificar características particulares de las especies a cambios globales (*p.e.*, incremento en la temperatura ambiental); o determinar fenotipos ancestrales y aquellos derivados recientemente, susceptibles a extinguirse debido a la conservación del nicho filogenético[4], ya que estos pueden estar imposibilitados para

[3] La propiedad que puede poseer un carácter (posiblemente adaptativa en el ambiente en el que surgió) que limita el surgimiento de un nuevo estado de carácter (Blomberg y Garland, 2002).

[4] La tendencia de las especies de retener sus característica ecológica ancestrales (Wiens y Graham, 2005)

adaptarse a nuevas presiones de selección, o a ocupar nichos diferentes (Desdevises *et al.,* 2003; Wiens, 2004).

Al emplear los MCF, es fundamental considerar los supuestos de estos análisis: *i*) la adaptación por selección natural no debe ser inferida causalmente basándose en estudios comparativos; *ii*) el conocimiento del filogenia aumenta no sólo la calidad, sino también los tipos de inferencia que pueden hacerse a partir de datos comparativos (*p.e.*, estimación de caracteres en ancestros hipotéticos); *iii*) estadísticamente los datos inter específicos no pueden ser considerados como muestras independientes y distribuidos en forma homogénea en una "*población*"; *iv*) los supuestos sobre cómo evolucionan los caracteres en el tiempo (*p.e.*, movimiento Browniano[5], proceso Ornstein-Uhlenbeck[6], etc.) son necesarios para cualquier inferencia estadística; *v*) la selección de especies para un estudio comparativo debe tomar en cuenta las relaciones filogenéticas entre esas especies y, *vi*) la mayoría de los estudios comparativos se basan únicamente en correlaciones (Harvey y Pagel, 1991; Harvey y Purvis, 1991; Martins, 1994; Rohlf, 2001).

El primer paso para realizar un análisis utilizando los MCF, es obtener toda la información disponible sobre las relaciones filogenéticas del grupo de interés. Las filogenias

[5] Modelo nulo de evolución fenotípica, que describe cómo los cambios de caracteres continuos se vuelve más impredecible y se incremente linealmente con el tiempo, provocado por deriva genética, selección direccional o equilibrio mutación-deriva (Edwards y Cavalli-Sforza,1964; Felsenstein, 1985; Diniz-Filho, 2001)

[6] Proceso oscilador estocástico cuántico, que limita la variación fenotípica de caracteres continuos debido a que se encuentran bajo una fuerte selección estabilizadora (Felsenstein,1988; Hansen y Martin, 1996; Diniz-Filho, 2001)

nos permiten observar eventos evolutivos independientes y comprender si la historia evolutiva de los organismos influye sobre las respuestas proximales de los organismos (Harvey y Pagel, 1991; Harvey, 1996; Martins y Hansen, 1997). En este sentido, las reconstrucciones filogenéticas tienen como objetivo final definir las relaciones entre especies, de tal forma que está refleje la historia evolutiva de una manera precisa (Dobson, 1985; Diniz-Filho, 2000; Rezende y Garland, 2003). Una vez obtenida una hipótesis filogenética, se debe determinar si los datos (*p.e.*, las características de las especies) están estructurados o no a lo largo de la filogenia; es decir, evaluar si existe correlación filogenética en la variable de interés. Sí existe tal correlación, el análisis comparativo puede evaluar el grado de inercia filogenética (estimada como la proporción de la variación que es explicada por la similitud filogenética) mediante la descomposición de la variación fenotípica en sus componentes específicos y filogenéticos. Finalmente, se debe analizar la evolución correlacionada entre los componentes específicos, libres del efecto filogenético, interpretándola en términos de procesos adaptativos (Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000; Morales, 2000). Bajo este contexto, a continuación se dará una breve descripción de los métodos más comúnmente empleados y su aplicación en términos de la conservación biológica.

Contrastes Filogenéticamente Independientes

Este método fue desarrollo originalmente por Felsenstein (1985), para analizar la evolución correlacionada de caracteres, evitando el problema de la no independencia

estadística cuando se realizan comparaciones entre especies cercanamente relacionadas. El método propone que cada especie integrante de un árbol filogenético ha tenido sus tiempos y eventos evolutivos independientes; es decir, que los cambios que ocurren entre un par de especies hermanas después de su respectivo evento de especiación, es independiente de los cambios ocurridos entre otro par de especies hermanas después de su correspondiente especiación; y a su vez, el comportamiento y las relaciones entre los caracteres puede ser distinto en cada una de ellas, aunque ambos grupos de especies hermanas compartan un ancestro común. Estas diferencias se denominan "*contrastes filogenéticamente independientes*" y pueden ser calculados para cada uno de los nodos de una filogenia. Los valores para los nodos correspondientes a los ancestros se estiman como el promedio de los valores de los descendientes (Harvey y Pagel, 1991; Garland y Ives, 2000; Diniz-Filho, 2000; Morales, 2000).

Este método permite la suposición de que la evolución de los caracteres pueden describirse empleando un modelo de movimiento Browniano, el cual es un proceso aleatorio modelado en la Física por el movimiento de las moléculas afectadas por la variación térmica en un líquido. Sí se mide la posición de cada molécula a lo largo de un eje, se aprecia que los movimientos sucesivos son independientes. Aplicado a un modelo evolutivo (Fig. 2), este efecto de desplazamiento después de un tiempo (t_1) es la suma de un gran número de pequeños desplazamientos atribuidos a fuerzas evolutivas como la selección, deriva génica o variaciones ambientales.

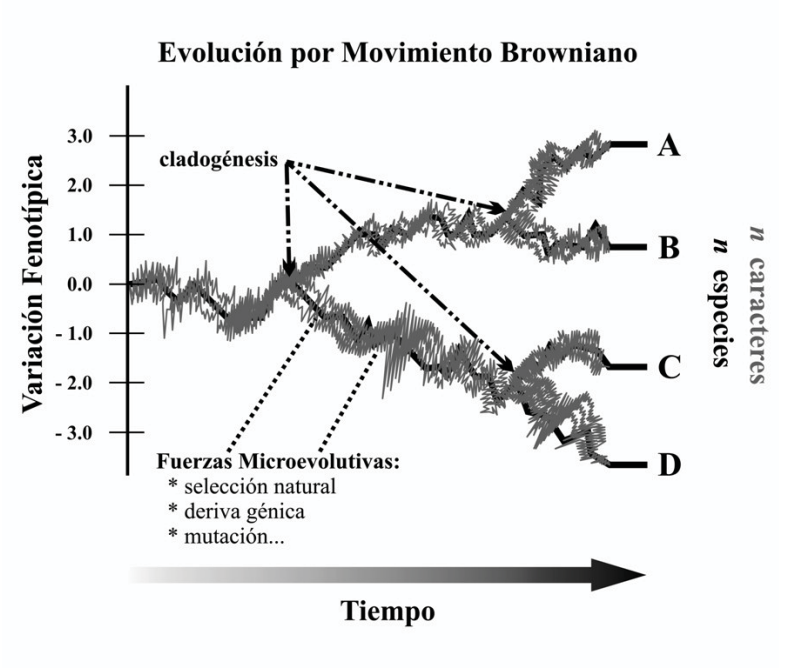

Figura 2. Filogenia hipotética para cuatro linajes (A, B, C, D) y para n caracteres, donde se muestra que a partir de un estado ancestral evolucionaron los linajes y caracteres actuales por medio de procesos aleatorios. El ancestro presenta valores de tiempo y varianza iguales a cero, de tal forma que el valor de cada paso evolutivo está dado por la suma de todos los pasos previos.

El resultado del total de esos movimientos tendrá una distribución normal con una media igual a cero y varianza proporcional a t_1 (Martins, 1996; Nunn, 2011). De tal forma, que los *contrastes* pueden considerarse como valores independientes y por lo tanto pueden ser utilizados en análisis estadísticos que prueben hipótesis adaptativas (Felsenstein, 1985; Burt, 1989). Debido a que los *contrastes* son calculados a diferentes niveles jerárquicos, los resultados comparativos pueden ser evaluados en todos los niveles filogenéticos.

Del mismo modo, este modelo supone que cada carácter ha evolucionado con diferentes tasas de cambio en el tiempo. Así, mientras la varianza acumulada en un carácter **A** es $\mathbf{s^2_A}$, la varianza en otro carácter **B** (con el cual puede estar correlacionado) es $\mathbf{s^2_B}$ (Felsenstein, 1985). De tal forma que los procesos de diversificación suceden a causa de la acumulación de la variación a lo largo de su evolución, y pueden verse reflejado en la longitud de las ramas de una filogenia. Con base en lo anterior, el modelo de CFI examina de forma no direccional la covariación filogenética entre los valores de diferentes caracteres (Felsenstein, 1985; Harvey y Pagel, 1991).

Los supuestos de este modelo son:

1. La evolución del carácter puede ser descrito usando un modelo de movimiento Browniano de evolución fenotípica.
2. Las relaciones filogenéticas del grupo de interés está resuelta y se conoce cuál es la longitud de sus ramas, que es proporcional al cambio entre caracteres.
3. La variación dentro de cada especie es insignificante en comparación con la variación entre las especies.

En términos generales, los CFI se han convertido en un procedimiento estándar para analizar de manera no dirección la comparación entre pares de especies hermanas contemporáneas y también entre los estados ancestrales de diferentes grupos de especies, así como para estimar el coeficiente de correlación o la regresión evolutiva entre caracteres fenotípicos, a partir de información filogenética,

con la cual transformar las observaciones originales en un sistema de puntuación de $n - 1$ diferencias estandarizadas llamadas "*contrastes*". Estos *contrastes* independientes están teóricamente libres del efecto de la filogenia, y pueden ser utilizados para analizar filogenias poblacionales, proporcionando información acerca de procesos microevolutivos en las ramas superiores de la filogenia y de procesos macroevolutivos en los nodos inferiores de las misma (Burt, 1989; Garland *et al.,* 1992; Diniz-Filho, 2000).

En el campo de la biología de la conservación, este método ha sido empleado para determinar la susceptibilidad de las especies a extinguirse o probar hipótesis de probabilidad de extinción de las mismas, tomando en consideración los factores intrínsecos como el tamaño corporal (Cardillo y Bromham, 2001; Cardillo *et al.,* 2008), la capacidad de reproducción (Harcourt, 1998; Amano y Yamaura, 2007), la especialización ecológica (Safi y Kerth, 2004; Jones *et al.,* 2009; Garcia *et al.,* 2008) y las historias de vida (Gaston y Blackburn, 1997; Murray y Hose, 2005; Jones *et al.,* 2009); así como factores extrínsecos, como el clima (Blackburn y Gaston, 2002; Cardillo *et al.,* 2008), la relación entre la distribución-abundancia (Bennett y Owens, 1997; Johnson, 1998; Collen *et al.,* 2006; May-Collado y Agnarsson, 2011), la zona geográfica (Johnson *et al.,* 2002; Fritz *et al.,* 2009; Jones *et al.,* 2009) e introducción de especies (Owens y Bennett, 2000; Fisher *et al.,* 2003).

Por ejemplo, Safi y Kerth (2004) analizaron 35 especies de murciélagos insectívoros de Norteamérica y Europa, e

identificaron que la especialización de estas especies para ocupar hábitats específicos, influye considerablemente en el riesgo de extinción de las mismas; de la misma forma Forero-Medina *et al.,* (2009), identificaron que el tamaño corporal y la relación entre éste y el tamaño de la camada y la longevidad de 25 especies de mamíferos brasileños, son las principales características que hacen que las especies sean más vulnerables a la extinción. Por su parte Foufopoulos y Ives (1999) evaluaron las características de historia de vida (la masa corporal, la longevidad, la especialización de hábitat, y abundancia de la población) de 35 especies de tortugas y de reptiles escamados (lagartos y serpientes) en 87 islas en el mar Mediterráneo y llegaron a conclusiones similares.

Autocorrelación Filogenética

Este método fue desarrollado originalmente por Cheverud y Dow (1985) y Cheverud *et al.,* (1985), a partir de modelos de autocorrelación lineal aplicada a problemas de patrones espaciales (*ver* Cavalli-Sforza y Edwards, 1967; Sokal y Oden, 1978; Gittleman y Luh, 1992) y posteriormente modificado por Gittleman y Kot (1990), para estimar cuantitativamente la varianza total asociada a un carácter (**T**), y fraccionar el valor de un carácter fenotípico en sus componentes filogenético (**F**) y específico (**E**), permitiendo cuantificar la proporción de la variación de un carácter que puede ser explicada por la inercia filogenética, de aquella proporción que puede ser atribuida a la evolución independiente (Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000; Martins, 2000). Por lo tanto:

$$\mathbf{T = F + E}$$

El modelo básico está representado por la ecuación:

$$\boldsymbol{y} = \boldsymbol{\rho}\mathbf{W}\boldsymbol{y} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

Donde $\boldsymbol{y}$ es un vector de longitud $\boldsymbol{n}$ que contiene los valores observados de los caracteres fenotípicos analizados de cada especie, $\boldsymbol{\rho}$ es el coeficiente de autocorrelación filogenética, que estima la fuerza de la inercia filogenética en el carácter; **W** es una matriz de conectividad **n x n** de similitudes filogenéticas entre pares de especies, la cual se utiliza para especificar las relaciones taxonómicas de las especies (*p.e*, si un par de especies están en el mismo género, su relación es de 1, si comparten la misma familia taxonómica su relación es de 1/2, pero si esta relación es al nivel de Orden es de 1/6) (Fig. 3); y $\boldsymbol{\varepsilon}$ representa el vector de los valores residuales (**E**) del carácter que no pueden ser predichos por $\boldsymbol{\rho}\mathbf{W}\boldsymbol{y}$. En este modelo, $\boldsymbol{\rho}\mathbf{W}\boldsymbol{y}$ es un vector que predice la porción filogenética (**F**) del valor $\boldsymbol{y}$ (**T**), representa al componente filogenético; es decir, la proporción del carácter que corresponde a la historia evolutiva del grupo y el vector $\boldsymbol{\varepsilon}$ corresponde al componente específico; es decir, a la proporción que puede ser considerada como resultado de la evolución independiente del arrastre filogenético.

De esta forma, el producto $\boldsymbol{\rho}\mathbf{W}\boldsymbol{y}$ genera un valor predictivo de $\boldsymbol{y}$ para cada una de las especies, y el vector $\boldsymbol{\varepsilon}$ sólo es el valor residual de la diferencia entre lo observado y el valor predicho por $\boldsymbol{\rho}\mathbf{W}\boldsymbol{y}$. Igualmente, se observa que el valor del carácter en especies relacionadas se explica a través del componente filogenético.

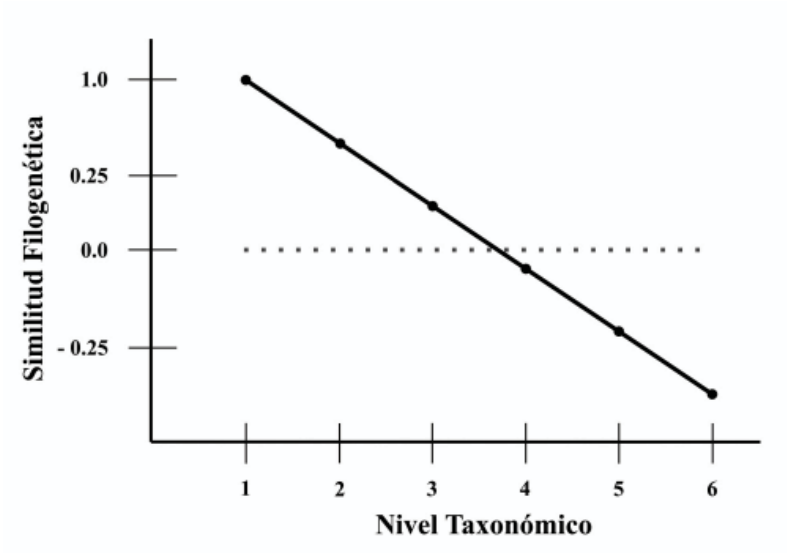

Figura 3. Se muestra la similitud filogenética en función del nivel taxonómico, donde: 1 = género, 2 = familia, 3 = superfamilia, 4 = infraorden, 5 = suborden, 6 = orden. Lo que evidencia la presencia de un patrón filogenético, en el cual los niveles taxonómicos más cercanos son más parecidos. La línea discontinua muestra la ausencia de dicho patrón.

Este modelo presenta dos aspectos relevantes. Por un lado, el coeficiente de autocorrelación (**ρ**) que estima la correlación entre el vector de valores fenotípicos (**ε**) y el vector de valores estrictamente filogenéticos (**ρW*y***), es un componente que mide la *fuerza* del efecto filogenético y representa la constancia de un carácter a lo largo de su historia evolutiva. Este valor puede variar entre –1 y +1. Un valor positivo indica constancia filogenética, mientras que un valor de cero (0) muestra que no hay efecto filogenético en la variación del carácter y un valor negativo indica que las especies relacionadas tienden a ser distintas y con escasa influencia filogenética sobre el carácter (*sensu* Cheverud *et al.,* 1985).

El segundo aspecto del modelo es que el valor estimado de los residuales, **ε**, debe estar libre de los efectos filogenéticos, y por lo tanto, es independiente estadísticamente. En este sentido los valores de **ε** serían análogos a los contrastes propuestos por Felsenstein (1985). La diferencia radica en que mientras los contrastes retienen el 100% de la varianza original de los datos, los residuales del modelo de autocorrelación corresponden sólo a una fracción de la varianza total (Morales, 2000).

En este modelo también puede estimar el coeficiente de determinación (**R^2**), que representa la proporción de varianza del carácter que esta explicada por la historia evolutiva de un grupo (*filogenia*), de la siguiente manera de acuerdo con (Cheverud *et al.,* 1985; Harvey y Pagel, 1991):

$$\mathbf{R^2 = 1 - (\text{varianza de los errores / varianza de } y)}$$

La varianza de los errores representa a la varianza del modelo de auto correlación, mientras que la varianza de ***y*** es la variabilidad natural de la variable ***y*** de interés. Si el valor de **R^2** es alto, se asume que la inercia filogenética también lo es (Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000). La trascendencia de este modelo radica en que además de ser el primero en estimar los efectos filogenéticos sobre los atributos fenotípicos, es el más comúnmente utilizado para responder preguntas de tipo ecológicas y evolutivas (Morales, 2000; Cornillon *et al.,* 2000; Rohlf, 2001). De acuerdo con Hansen y Martins (1996) los supuestos para este modelo son:

1. Las relaciones esperadas entre los fenotipos de las especies debido a las historias compartidas y evolutivas, se pueden describir mediante un modelo autoregresivo y por lo tanto, la variación intra específica es ilegible o está incorporada al análisis.

2. Los análisis con este modelo son mucho más confiables entre mayor sea el número de taxones a considerar.

3. Las relaciones filogenéticas entre las especies están bien resueltas, y las longitudes de las ramas son proporcionales a la cantidad esperada de cambios del carácter, o éstas pueden ser descritas a partir de una matriz de similitud filogenética entre fenotipos inter específicos.

4. Las diferencias en las escalas de tiempo evolutivo y procesos ecológicos, puede ser descrita por diferencias arbitrarias en las longitudes de las ramas entre y dentro de las especies, cuando las variaciones no son definidas en el modelo.

5. Cada fenotipo puede ser descrito como una función lineal de los otros fenotipos de la filogenia y estos pueden ser descritos como la suma de sus componentes filogenético y específico

6. Sólo el componente específico puede ser utilizado para análisis posteriores.

En términos generales, este modelo ha sido empleado como una herramienta diagnóstica para identificar diversos patrones de variación interespecífica (Gittleman y Kot, 1990; Diniz-Filho, 2001; Rohlf, 2001) y para evaluar si el valor residual (**ε**), obtenido con el método autorregresivo y regresión del vector propio filogenético, está libre de un patrón filogenético[7] (Gittleman y Kot, 1990; Edwards y Kot, 1995; Diniz-Filho *et al.,* 1998). Por ejemplo, Diniz-Filho y Mundim (2002), evaluaron la relación entre la distribución y la talla de los carnívoros terrestres. Sus resultados demostraron que sí existe un patrón filogenético en la talla, pero no en la distribución. Estos mismos autores destacaron la importancia de utilizar los MCF para estudiar procesos evolutivos asociados a información macroecológica. En conservación biológica Diniz-Filho y Tôrres (2002), analizaron la relación entre el tamaño del área de distribución y el tamaño corporal de 70 especies de carnívoros terrestres del Nuevo Mundo y encontraron un fuerte patrón filogenético entre ambas variables, sugiriendo que los mecanismos ecológicos podrían ser mucho más importantes a considerar, en las diferentes estrategias de conservación de estos organismos. Por su parte Blackburn (2004), utilizó este método para identificar la relación entre la abundancia y distribución de varias especies en diferentes escalas macroecológicas, identificó evolución potencial y sugirió *cómo* se podría utilizar esta información para identificar cambios no adaptativos o especies vulnerables a

[7] Es la correlación entre la variación fenotípica de un carácter y las relaciones filogenéticas de un grupo de especies, que determina las tendencias evolutivas del mismo (Gittleman y Luh, 1992; Burt, 2001; Hansen y Orzack, 2005).

cambios ambientales recientes o futuros. Del mismo modo, Cooper y colaboradores (2008) probaron el riesgo de extinción de 138 especies de ranas, considerando el tamaño corporal, la fecundidad y el tamaño del área de distribución geográfica; encontrando que el tamaño corporal y la fecundidad sólo afectan el riesgo de extinción indirectamente a través de su efecto sobre el tamaño del área de distribución geográfica, por lo que sugirieron que la mejor estrategia de conservación de estos organismos, sería proteger áreas que contengan una gran diversidad de especies con áreas pequeñas de distribución geográfica. Por su parte, Fritz y colaboradores (2009) determinaron que a nivel regional, el tamaño corporal es la principal característica biológica que los pone a los mamíferos en alguna categoría de riesgo, seguido por la estrecha relación especie-área.

Cómo fue posible observar, utilizando este tipo análisis comparativo filogenético, es posible identificar diversos patrones específicos entre las interacciones de las características biológicas de las especies y las amenazas de tipo antropogénicas, lo cual ofrece una mayor comprensión de los procesos que determinan el riesgo de extinción de las mismas (Fisher y Owens, 2004; Cardillo y Meijaard, 2012). De acuerdo con Ornelas (1998), se podrían establecer al menos tres criterios para priorizar los esfuerzos de conservación e identificar especies susceptibles o en riesgo:

1) Seleccionar aquellos taxones que aparecen en la base de un grupo monofilético, o en la base de las ramas más grandes, ya que pueden ser de gran importancia en la reconstrucción filogenética del grupo.

2) Elegir taxones con muchas autopomorfias, debido a que pueden reflejar eventos evolutivos recientes o relevantes, puesto que han acumulado muchos cambios a lo largo de su historia evolutiva.
3) Seleccionar taxones que tienen una mayor distancia patrística, es decir, una cantidad considerable de cambios en número de caracteres entre grupos monofiléticos sin contar el ancestro común, ya que pueden ser muy informativos para identificar los cambios ocurridos en el pasado y sus probables trayectorias.

Finalmente, en esta sección se analizaron y discutieron dos métodos comparativos filogenéticos, Contrastes Independientes y el Modelo de Autorregresión, que pueden ser empleados para determinar la relación estadística entre dos o más características intrínsecas o extrínsecas de los organismos, y su utilidad para determinar especies potenciales en riesgo de extinción o establecer adecuadas estrategias de conservación, en función de los caracteres específicos de los mismos. Se demostró que los dos enfoques son funcionalmente válidos y que puede ser utilizado para hacer inferencias estadísticas acerca de los valores en los nodos internos de un árbol filogenético (*ancestros hipotéticos*), para estimar las relaciones entre los caracteres y para predecir los valores potenciales de las especies que aún no se conocen, o de las que se tienen poca información. Las predicciones para éste tipo de especies (*incluidas formas extintas*) se pueden hacer cada vez más exactas y precisas, sin embargo, uno de los principales problemas al tratar

de analizar los patrones y procesos de evolución biológica, ha sido que las explicaciones evolutivas no están sujetas a experimentación (Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000; Futuyma, 2005), esto es debido a que es muy difícil o imposible recrear las condiciones que han dado origen o han ocasionado una presión sobre un carácter, para que este posteriormente fuera seleccionado. Por lo que el problema metodológico más recurrente en la biología comparada, ha sido distinguir entre los efectos ocasionados por historia evolutiva y por la evolución independiente (Bell, 1989; Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000). Esto se debe por un lado, a que las escalas de tiempo de los procesos ecológicos y evolutivos son consideradas de manera diferente (Harvey, 1996); y por el otro lado, a que la historia evolutiva de cada carácter es diferente (Westoby *et al.,* 1995). No obstante, todos los organismos forman parte de una escala de relaciones jerárquicas de ancestro-descendiente, por lo que no pueden contemplarse como datos independientes extraídos de una misma distribución, lo que origina un serio problema a la hora de analizar cierta información, con respecto a un contexto evolutivo explícito (Felsenstein, 1985; Harvey y Pagel, 1991; Diniz-Filho, 2000).

De cualquier forma, estos estudios ofrecen un enfoque más predictivo, basado en generalizaciones estadísticas. Así una especie puede ser seleccionada de una lista de prioridades en función de su pertenencia a un grupo, ya que estadísticamente es probable que contenga las especies amenazadas (Fisher y Owens, 2004; Cardillo y Meijaard, 2012). Este grupo puede ser taxonómico (*p.e.*, familia

o género), o puede ser definido morfológicamente (*p.e.*, tamaños corporales de mesocarnívoros) o geográficamente (*p.e.*, grupo de especies confinadas a regiones específicas). De esta manera, las generalizaciones estadísticas pueden ofrecer pruebas adicionales para evaluar el estado actual de las especies, para las que los datos directos sobre las tendencias demográficas o la distribución geográfica, no se conocen, o existe información limitada o nula. Por otra parte, el riesgo de extinción modelado podría ayudar a identificar las especies que actualmente no se encuentran amenazadas, pero que podrían llegar a cambiar de estado de conservación en un futuro próximo, empleando como base el conjunto de características biológicas, ecológicas e incluso evolutivas.

Diversidad Filogenética y Selección de Áreas Prioritarias para la Conservación

Además de brindar gran cantidad de información útil para realizar conservación a nivel poblacional o de especie, como ya se había mencionado (filogeografía, determinación de ESU's, MCF), los análisis moleculares también ofrecen grandes posibilidades para la conservación a nivel de comunidades. A este nivel, una de las estrategias para conservar la diversidad biológica más utilizada alrededor del mundo, es el establecimiento de áreas protegidas como Reservas de la Biosfera, Parques Nacionales, Reservas Naturales, Santuarios de Flora y Fauna, entre otras (Ceballos *et al.,* 1998; Rodrigues y Gaston, 2002; Brooks *et al.,* 2006). Estas áreas de protección idealmente deben cumplir con dos grandes funciones. Por un lado, representar la biodiversidad conocida de la región donde se encuentre situada; por el otro

lado, separar la biodiversidad de los procesos que amenazan su persistencia (Margules *et al.,* 2002). Sin embargo, la designación de estas áreas es un gran reto, debido al poco conocimiento que se tiene sobre los patrones y procesos de la biodiversidad, a los escasos recursos destinados para su conservación, y a las constantes presiones socio-económicas que existen entorno de la misma (Vézquez y Gittleman, 1998). Es claro que no es posible conservar todos los lugares que contribuyen a la biodiversidad, por lo que es necesario utilizar métodos concretos para priorizarlos.

En un principio, se comenzaron a utilizar indicadores de biodiversidad con el fin de establecer áreas con mayor grado de prioridad para la conservación (Pressey *et al.,* 1993), un proceso denominado por Vane-Wright y colaboradores (1991) como la "*agonía de la elección*", ya que básicamente se escogían a partir de criterios simplistas *cuáles* especies se podrían conservan y *cuáles no.* Posteriormente, la riqueza específica de un sitio había sido empleada como indicador para seleccionar áreas de conservación, prestando mucha atención a los llamados *hotspots* de biodiversidad -zonas particularmente con alta riqueza de especies, especies raras o amenazadas- (Myers *et al.,* 2000; Brooks *et al.,* 2006). Sin embargo, recientemente se ha hecho énfasis en la importancia de incluir los procesos evolutivos como prioridades de conservación (Vézquez y Gittleman, 1998; Mace *et al.,* 2003; Pillon *et al.,* 2006), basándose en que para conservar la biodiversidad, no sólo es necesario maximizar el número de especies protegidas actualmente, sino también asegurar altos niveles de diversidad biológica en el futuro (Faith, 1994).

De este modo, enfatizando en la protección de áreas exclusivas con alto número de especies, no garantiza la permanencia en el futuro de la biodiversidad, ya que bajo ese esquema tradicional, todas las especies son concebidas con el mismo valor de conservación. No obstante, dicha valoración debe realizarse en términos de relaciones históricas y singularidad evolutiva, para asegurar la protección del máximo potencial evolutivo (Vane-Wright *et al.,* 1991; Vézquez y Gittleman, 1998). En este mismo contexto, además de conservar el mayor número de especies, también es necesario conservar conjuntos de especies que reúnan la mayor cantidad de historia evolutiva posible (Vane-Wright *et al.,* 1991; Pressey *et al.,* 1993). Es por esto que se ha propuesto la integración de la información filogenética en los estudios de ecología de comunidades y en los análisis de priorización de áreas para la conservación de la biodiversidad, ya que éstas proveen nuevas formas de medir y analizar la biodiversidad y cuantificar la historia evolutiva de cualquier conjunto de especies (Vézquez y Gittleman, 1998; Posadas *et al.,* 2001; Mace, 2004).

Este nuevo enfoque ha permitido inferir los mecanismos potenciales que determinan la estructura filogenética de las comunidades o la "*filodiversidad*[8]", es decir, las relaciones filogenéticas de las especies distribuidas dentro y entre las comunidades (Machac *et al.,* 2011).

[8] Se refiere a las relaciones evolutivas entre las especies que coexisten dentro de una comunidad local (*p.e.*, estructura filogenética). La diversidad filogenética mide cuanto del patrón de ramificación y las longitudes de ramas de un árbol filogenético, están representadas en una muestra de especies (Faith y Baker, 2006).

Con esta aproximación es posible analizar las interacciones contemporáneas entre los miembros que coexisten en una comunidad, los efectos de la comunidad en la evolución de caracteres de cada especie, y los efectos de la diversificación y la evolución de caracteres en la forma en que interactúan los miembros de la comunidad (Vamosi *et al.,* 2009). Por ejemplo, bajo diferentes filtros ecológicos[9] o interacciones (*p.e.*, competencia o depredación) sería posible observar diferencias en la composición de los ensamblajes en los patrones de estructura filogenética y fenotípica de la comunidad (Webb *et al.,* 2002; Cavender-Bares *et al.,* 2009)

Además, si se complementan los análisis de estructura filogenética de las comunidades con medidas de diversidad filogenética (*p.e.*, filobetadiversidad[10]) es posible inferir un marco evolutivo para evaluar *cómo* la estructura de la comunidad y los caracteres de las especies que la conforman, cambiaron o podrían cambian en función de los gradientes espaciales y ambientales (Graham y Fine, 2008; Fine y Kembel, 2011). Analizando la filobetadiversidad podría ayudar a entender *cuáles* linajes experimentan patrones de recambio entre regiones y durante que periodos de tiempo.

[9] Es cualquier condición ambiental que limite la presencia de algunas especies en una comunidad determinada. Estas condiciones ambientales particulares pueden provocar la coexistencia de especies cercanamente emparentadas o que compartan características que les permitan sobrevivir a esas condiciones y eliminar todas las especies que no las posean (Webb *et al.,* 2002).

[10] Es la diversidad Beta (cambio de la composición de especies en el espacio) con una dimensión temporal; está definida como la distancia filogenética (longitudes de rama) existente entre cualquier par de sitios (o comunidades) en el planeta. La filodiversidad Beta cuantifica el grado de relación (parentesco) filogenética existente entre las especies a través del espacio (Graham y Fine, 2008).

Asimismo, cuantificar como las relaciones filogenéticas cambian a lo largo del tiempo, de forma similar en la que la diversidad beta mide como cambia la composición de especies en el espacio (Graham y Fine, 2008)

Índices de Diversidad Filogenética

Actualmente, a partir de datos moleculares no solo es posible determinar con exactitud la relación entre las especies, sino también identificar la secuencia cronológica y el tiempo aproximado de cladogenesis de un clado o grupo específico (Hillis *et al.,* 1996). Del mismo modo, la información filogenética también puede ser importante en identificar cualquier tipo o nivel de extinción, ya que la perdida de historia evolutiva depende del tipo de proceso de diversificación que originó el clado considerado, y de la correlación entre el riesgo de extinción y las tasas de especiación del mismo (Heard y Mooers, 2000). Es decir, si una especie se encuentra en peligro de extinción, sus parientes más cercanos también podrían presentar una alta probabilidad de encontrarse en peligro (Russell *et al.,* 1998). Asimismo, implicaría que los taxones monotípicos más antiguos con pocos o ningún taxón hermano en la actualidad, aportan significativamente más a la biodiversidad que los taxones que han diversificado recientemente, y por ello representarían una prioridad en conservación (Krajewski, 1991). Así que perder especies que no posean parientes filogenéticamente cercanos, tiende a generar una mayor pérdida de información genética -y por consiguiente evolutiva- que perder especies con varios grupos cercanos.

De tal forma, que elegir áreas prioritarias para la conservación desde un punto de vista reduccionista, considerando exclusivamente endemismos y riqueza de especies, excluiría la información filogenética y en consecuencia la historia evolutiva de los taxones de esas áreas. Para abordar este problema se han propuesto diferentes Índices de Diversidad basados en la medición indirecta de la información evolutiva. Vane-Wright y colaboradores (1991) propusieron que la información codificada en las relaciones filogenéticas de los taxones (topología) podía ser trasladada a un índice de diversidad, donde la asignación del valor de prioridad de cada región se hace en dos pasos. Primero identificar la región con el valor de prioridad mayor; es decir, aquella que posea la mayor cantidad de especies y que representen la mayor cantidad de historia evolutiva. Y segundo, seleccionar otras regiones de acuerdo con su grado de complementariedad con la región principal. Este proceso se lleva a cabo calculando dos índices: **I** y **W**. Donde el índice **I**, determina el número de clados a los que cada taxón pertenece y el índice **W**, mide la proporción en que cada taxón contribuye a la diversidad total del grupo. Al utilizar grupos taxonómicos diferentes, es posible comparar la posición relativa de las áreas y escoger el conjunto de áreas que mejor reúna la diversidad filogenética, en términos de complementariedad y representatividad.

Otro de los métodos más utilizados es el de *Distancia Filogenética* (DF) propuesto por Faith (1992). Este índice mide la distancia evolutiva -en millones de años entre diferentes especies- que conecta a los taxones de un área dada, por lo que la DF total de un conjunto de áreas es igual, a la suma de las distancias de todas las especies presentes

en cada una de las áreas del conjunto. La aplicación de esta medida puede ser extendida con los conceptos de complementariedad y endemismos para la selección de áreas prioritarias de conservación. Sí se toma un área con un alto grado de diversidad filogenética como referencia, el aporte de un región particular al área de referencia, en términos de complementariedad, será la distancia evolutiva o longitud de ramas con que colectivamente contribuyen las especies presentes en dicha área, pero que no estén en el conjunto de referencia (Faith, 1994). Este método permite determinar la estructura de las comunidades desde un punto de vista de las relaciones de ancestro-descendencia de las especies que coexisten (Valiente-Banuet *et al.,* 2009). Por otra parte, el endemismo en diversidad filogenética, se refiere a longitud de ramas (DF) o historia evolutiva representada sólo en un área particular (Faith, 1994). Con esta información es posible buscar el subconjunto de áreas y taxones que maximicen la acumulación de DF o historia evolutiva, como alternativa a la riqueza y complementariedad de especies (Faith *et al.,* 2004).

De esta manera, todas las medidas de diversidad filogenética pueden ser comparadas con modelos nulos de evolución y ensamblaje de comunidades, para estimar si las comunidades naturales están compuestas por especies cercana o lejanamente emparentadas (Cavender-Bares *et al.,* 2004; Cavender-Bares *et al.,* 2009; Vamosi *et al.,* 2009). Al interior de estas comunidades es posible observar al menos dos patrones de estructura filogenética. Por un lado, *sobredispersión filogenética* (o ensambles de especies con poco parentesco entre

sí), cuando la competencia y por ende la exclusión competitiva, es la fuerza organizadora, y ésta ocurre más frecuentemente entre especies cercanamente emparentadas limitando su coexistencia (Webb *et al.,* 2002; Kraft *et al.,* 2007; Graham *et al.,* 2009). Por el otro lado, *agrupamiento filogenético* (o coexistencia de especies cercanamente emparentadas), cuando especies emparentadas que comparten rasgos particulares que les permiten sobrevivir y reproducirse en dicho ambiente coexistirán más comúnmente que lo esperado por azar (Webb *et al.,* 2002; Cavender-Bares *et al.,* 2004; Valiente-Banuet y Verdú, 2007).

Conocer estos patrones es importante a la hora de dilucidar la importancia de utilizar la información filogenética para escoger áreas prioritarias. Comúnmente, se ha encontrado que la riqueza de especies y la diversidad filogenética se distribuyen de forma similar en el espacio (Polasky *et al.,* 2001; Brooks *et al.,* 2006; Forest *et al.,* 2007), lo que inicialmente, indicaría una utilidad limitada del cálculo de diversidad filogenética (Polasky *et al.,* 2001; Rodrigues y Gaston, 2002). La riqueza de especies y la diversidad filogenética pueden estar relacionadas, pero esta relación puede ser compleja; algunas áreas pueden exhibir mayor o menor diversidad filogenética, que lo esperado a partir de la riqueza de especies que presenten. Asumiendo conservatismo de nicho (Peterson *et al.,* 1999; Wiens, 2004; Kozak y Wiens, 2006), se ha propuesto que la competencia interespecífica, radiaciones evolutivas antiguas y procesos relacionados con

paleoclima pueden producir *sobredispersión filogenética* (Webb *et al.,* 2002; Cavender-Bares *et al.,* 2009). Mientras que las radiaciones evolutivas recientes y los filtros ambientales pueden provocar *agrupamiento filogenético* (Webb *et al.,* 2002; Valiente-Banuet y Verdú, 2007). Esta relación entre riqueza y diversidad filogenética invalida el uso de la riqueza de especies como único indicador para la elección de áreas prioritarias. La utilización de la riqueza de especies para la selección de áreas bajo el principio de complementariedad, dejan por fuera localidades que proveen gran contribución a la diversidad filogenética (Fjeldsaå y Lovett, 1997; Forest *et al.,* 2007).

En los últimos años, la disponibilidad de filogenias para comunidades ecológicas enteras en diferentes áreas geográficas y grupos taxonómicos (*p.e.*, en plantas: Kembel y Hubbell, 2006; Forest *et al.,* 2007; anfibios: Pyron y Wiens, 2011; aves: Sibley y Ahlquist, 1990), han originado un rápido incremento en el número de estudios que involucran análisis de diversidad filogenética (Cuadro 1), dando como resultado un auge en aplicaciones y métodos para cuantificar la misma al interior de las comunidades naturales (Webb *et al.,* 2008; Kembel *et al.,* 2010). Estas aplicaciones desarrolladas dan más importancia a los taxones basales, debido a que estos son raros filogenéticamente, que a los taxones derivados recientemente; además, de compartir un objetivo en común: maximizar el número de clados que serán representados en un conjunto de áreas o comunidades, más que el número de especies a conservar (Vézquez y Gittleman, 1998).

Cuadro 1. Índices más comunes para la medición de la diversidad filogenética

Índice	Definición	Referencias
Diversidad Filogenética	Mide las longitudes de ramas que separan los taxones dentro de una comunidad directamente del árbol filogenético	(Faith, 1992; Faith, 1994; Faith *et al.,* 2004)
Singularidad Taxonomica	Mide el número de nodos (topología) en un árbol filogenético que se requieren para ir desde la raíz del árbol hasta cada uno de los terminales. Mientras menor sea el número de nodos más basal será el taxón. El cociente del total de nodos (T) respecto al número de nodos de cada taxón (T/N) produce un valor para cada taxón terminal, que entre más alto indica un enraizamiento más basal en la filogenia.	(Vane-Wright *et al.,* 1991; Posadas *et al.,* 2001)
Distancia Filogenética Promedio	Se refiere al promedio de la distancia filogenética entre todas las combinaciones de pares de especies que ocurren juntas en una comunidad natural	(Webb *et al.,*2002; Kembel y Hubbell, 2006; Fine y Kembel, 2011)
Distancia al Taxón más Cercano	Mide la distancia filogenética media al pariente más cercano para todas las especies que aparecen juntas en una comunidad	(Webb *et al.,* 2002; Kembel y Hubbell, 2006; Fine y Kembel, 2011)
Índice de Taxones más Cercanos	Es una medida estandarizada de la distancia filogenética al taxón más cercano para cada taxón en la muestra; cuantifica el grado de agrupamiento filogenético de los terminales, independiente del nivel de agrupamiento en la base de la filogenia	(Webb *et al.,* 2002; Graham *et al.,* 2009; Fine y Kembel, 2011; Machac *et al.,* 2011)

Índice	Definición	Referencias
Índice de Relación	Medida estandarizada de la distancia filogenética media por pares de los taxones en una comunidad local, en relación con la filogenia del grupo a nivel regional	(Webb *et al.,* 2002; Graham *et al.,* 2009; Machac *et al.,* 2011)
Regresión de Relaciones Filogenéticas y Co-ocurrencia	Mide si la relación entre distancia filogenética (relación de parentesco entre especies) y la co-ocurrencia de las especies se encuentran asociadas mediante una regresión de cuantiles	(Slingsby y Verboom, 2006)
Índice Filogenético de Sørenson	Mide la longitud de ramas de la filogenia que comparten dos comunidades naturales	(Bryant *et al.,* 2008; Graham y Fine, 2008; Graham *et al.,* 2009)
Fracción Única	Mide la distancia filogenética entre conjuntos de taxones en un árbol filogenético como la fracción de la longitud de la rama del árbol que lleva a los descendientes de cualquiera de ellos	(Lozupone y Knight, 2005)

Finalmente, la investigación en filogenética de comunidades y diversidad filogenética representan un avance muy importante en el conocimiento sobre cómo las interacciones bióticas, las limitaciones filogenéticas, el aislamiento geográfico actual y pasado, y los gradientes ambientales interactúan para producir los patrones observados de diversidad. Sin embargo, la falta de falta de conocimiento detallado de los diferentes taxones, es una de las principales limitantes en el desarrollo de esta estrategia de conservación. Aunque existe una buena cantidad de información contenida en los listados taxonómicos e inventarios, estos no son necesariamente indicadores

de historia o diversidad filogenética. Adicionalmente, los algoritmos de selección de áreas requieren datos de distribución de todos los taxones y filogenias completas y bien resueltas, que algunas veces no se encuentran disponibles. Actualmente, no se cuenta con la capacidad suficiente para evaluar en *qué* medida los grupos principales de organismos muestran patrones de historia evolutiva (extinciones y diversificaciones) en común (Mace *et al.,* 2003).

Sin embargo, muchos investigadores argumentan que la inclusión de la información filogenética es indispensable para la priorización de especies o áreas con fines de conservación. Esto no necesariamente se cumple en todos los casos. Algunos estudios han obtenido resultados en los que, la elección de reservas utilizando índices de diversidad filogenética no difieren significativamente de aquellas seleccionadas utilizando sólo la riqueza de especies (Polasky *et al.,* 2001). Sugiriendo entonces, que el objetivo de maximizar la diversidad filogenética representada en una red de reservas, es razonablemente bien alcanzado, mediante la simple representación del número máximo de especies en la red. De tal forma que, incluir la información filogenética provee grandes aportes a la selección de áreas sí: *i*) las filogenias no se encuentran balanceadas, *ii*) las filogenias reflejan la geografía, *iii*) las especies más antiguas tienden a presentar rangos geográficos pequeños, y *iv*) sí las especies más antiguas se encuentran en zonas con baja riqueza de especies (Purvis *et al.,* 2005). Las dos primeras condiciones se cumplen usualmente, y muchos estudios indican que la tercera condición también se factible; sin embargo, la cuarta

condición queda pendiente para futuras investigaciones (Mace *et al.,* 2003).

CONCLUSIONES

En este trabajo ilustramos algunos ejemplos de *cómo* emplear información proveniente de técnicas moleculares, en el campo de la Conservación Biológica. Básicamente nos centramos en las relaciones evolutivas entre las especies y las poblaciones, para puntualizar en tres temas centrales: las aplicación de la filogeografía en la comprensión de la historia evolutiva y el fortalecimiento de los esfuerzos de conservación; la comparación entre especies fuertemente emparentadas y entre los atributos de las mismas, como factor determinante para probar hipótesis sobre la extinción; y finalmente, la inclusión de los índices de diversidad filogenética como aproximaciones en los esfuerzos de conservación a niveles por arriba de especies-poblaciones.

A pesar de que la filogeografía se ha empleado comúnmente como una herramienta para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie, las inferencias filogeográficas también pueden ayudar a determinar las prioridades de conservación mediante la identificación y delimitación de áreas co-distribuidas con historias evolutivas singulares y con altos índices de diversidad filogenética, con el fin de priorizar unidades geográficas para la conservación biológica. Hasta la fecha las aproximaciones filogeográficas han sido útiles en inferir procesos demográficos históricos, tamaño efectivo de la

población, secuencias de colonización, cuellos de botella y en determinar unidades de conservación. Sin embargo, el conocimiento acerca de *dónde* se han producido eventos o procesos evolutivos únicos, complementa la información sobre la diversidad, lo que nos permitiría conservar no sólo la biodiversidad existente, sino los procesos que generan esta diversidad. Por lo tanto, la conjunción de estos estudios, permitiría por un lado reconstruir los cambios evolutivos de las especies co-distribuidas, que han sido afectados por diferentes factores en el pasado (*p.e.,* cambios climáticos, glaciaciones y precipitaciones cíclicas), lo que permitiría identificar diferentes planes de conservación. Y por otro lado, identificar no solo unidades evolutivamente significativas, sino también rasgos particulares o grupo de características que hacen a las especies o poblaciones propensas a la extinción. Este enfoque será útil para predecir *cómo*, por ejemplo, el cambio climático afectaría genéticamente, demográficamente y espacialmente la biodiversidad local o regional. Sin embargo, el vínculo entre estos estudios y la práctica de la conservación se debilita en dos puntos clave. En primer lugar, los resultados de los análisis filogenéticos pueden presentar un cierto grado de ambigüedad, inconsistencia o pueden ser difíciles de traducir a la política. En segundo lugar, las políticas y mecanismos actuales de conservación hacen hincapié en la protección y rescate de las especies amenazadas contemporáneamente, mientras que las aproximaciones genéticas, son más adecuadas para un enfoque proactivo que se anticipa y previene la futura disminución de las especie.

Aunque las políticas de conservación y manejo de la diversidad biológica son definidas desde los cuatro niveles básicos de organización de la biodiversidad: genético,

especies-poblaciones, comunidades- ecosistemas y paisaje-región; el enfoque que integra todos los niveles jerárquicos en que la diversidad biológica se manifiesta, está convirtiéndose en el nuevo paradigma de la conservación. Es así como, si queremos proteger la diversidad genética, debemos formular estrategias específicas para este nivel de organización. Paralelamente, si queremos proteger poblaciones de las especies entonces tenemos que apuntar a la problemática del tamaño mínimo viable de las poblaciones en cuestión. El enfoque de conservación integrado por niveles se refleja en el ejemplo que plantea la determinación de cuanta población debe ser protegida para conservar la diversidad genética. Aquí intervienen tres niveles, el genético, el de las poblaciones y el de los ecosistemas; porque si no conocemos la proporción de heterozigocis que contiene una población, o qué cantidad está distribuida entre las poblaciones, es imposible determinar cuántas poblaciones deben ser protegidas para conservar la diversidad genética.

El conocimiento de la diversidad genética resulta de fundamental importancia en Biología de la Conservación, ya que en ella está contenida la información para todos aquellos procesos en que se sustenta la vida y es la base de la variación orgánica. Además de que se encuentra fuertemente relacionada con la respuesta funcional de los organismos a las diferentes presiones de selección (*p.e.,* cambio climático, competencia, depredación, parasitismo, etc.).

Dentro de la genética, la genética de poblaciones se ha convertido en una disciplina que se ha destacado por

los programas de gestión y conservación de especies; sin embargo, sin el desarrollo de las técnicas moleculares, las cuales han revolucionado todos y cada uno de los campos de la biología, esto no hubiera sido posible. En este sentido, los marcadores moleculares han sido usados con varios fines, entre los que destacan: la estimación dela diversidad genética intra e interpoblacional, el desarrollo de mapas de ligamiento para estudio de las relaciones filogenéticas, y para determinar la mejor estrategia de conservación, ya sea por la caracterización de germoplasma y colecciones nucleares, identificación de genotipos, determinación de pureza, aislamiento y caracterización de genes específicos, así como en la identificación de transformantes individuales o su progenie.

En términos generales, las técnicas moleculares permiten explorar la complejidad y variabilidad del contenido genético de cualquier tipo de organismos. Este tipo de información sirve para múltiples objetivos que van desde el individuo, hasta categorías taxonómicas menos inclusivas. Las principales aplicaciones de estas técnicas, en el ámbito de la Biología de la Conservación han sido: *i*) definir los límites de las especies y/o poblaciones, *ii*) estudiar la estructura de estas poblaciones, *iii*) revelar patrones de migración y estimar el flujo génico inter poblacional, *iv*) entender los cambios genéticos que afectan a la supervivencia de especies y por consiguiente la viabilidad de las poblaciones a largo plazo, y *v*) proporcionar información genética utilizable para la mejor gestión de las especies amenazadas. En este sentido, la comunidad científica encargada de este tema,

debería hacer su investigación más accesible hacia los políticos y los gestores; y estos a su vez, deberían considerar el uso de técnicas moleculares enfocados en la prevención y planificación de la conservación biológica.

BIBLIOGRAFÍA

Allendorf, F.W. and R.F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. pp. 57-76. In: Soulé, M. (ed). Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 598 p.

Alter, S.E., E.,Rynes and S.R. Palumbi. 2007. DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(24): 15162-15167.

Amano, T. and Y. Yamaura. 2007. Ecological and life-history traits related to range contractions among breeding birds in Japan. Biological Conservation 137(2):271-282.

Amori, G., S. Gippoliti and R. Castiglia. 2009. European non-volant mammal diversity: conservation priorities inferred from phylogeographic studies. Folia Zoologica, 58(3): 270-278.

Araújo, M.B. and A. Guisan. 2006. Five (or so) challenges for species distribution modeling. Journal of Biogeography, 33(10): 1677-1688.

Arbogast, B.S. and G.J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. Journal of Biogeography, 28(7): 819-825.

Arbogast, B.S., S.V. Edwards, J. Wakeley, P. Beerli and J.B. Slowinski. 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 33(2002): 707-740.

Arif, I.A. and H.A. Khan. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. Animal Biodiversity and Conservation, 32(1): 9-17.

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge. 464 p.

Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution, Second edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 684 p.

Avise, J.C. 2009. Phylogeography: Retrospect and prospect. Journal of Biogeography, 36(1): 3-15.

Avise, J.C. and J.L. Hamrick. 1996. Conservation genetics, case histories from nature, First Edition, Chapman and Hall, New York. 536 p.

Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E Neigel, C.A. Reeb and N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics, 18(1987): 489-522.

Balakrishnan, C.N., S.L. Monfort, A. Gaur, L. Singh and M.D. Sorenson. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld´s deer (*Cervus eldi*). Molecular Ecology, 12(1): 1-10.

Banhos, A., T. Hrbek, W. Gravena, T. Sanaiotti and I.P. Farias. 2008. Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja,* Falconiformes, Accipitridae). Genetics and Molecular Biology, 31(1): 146-154.

Bauwens, D. and R. Díaz-Uriarte. 1997. Covariation of life history traits in lacertid lizards: a comparative study. The American Naturalist, 149(1): 91-111.

Becerra V.V. y C.M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica, 60(3): 270-281.

Beck, J., L. Ballesteros-Mejia, C.M. Buchmann, J. Dengler, S.A. Fritz, B. Gruber, C. Hof, F. Jansen, S. Knapp, H. Kreft, A. K. Schneider,

M. Winter and C.F. Dormann. 2012. What's on the horizon for macroecology? Ecography, 35(8): 673-683.

Beheregaray, L.B., 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. Molecular Ecology, 17(17): 3754-3774

Beheregaray, L.B., C. Ciofi, A. Caccone, J.P. Gibbs and J.R. Powell. 2003. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos Islands. Conservation Genetics, 4: 31-46.

Bell, G. 1989. A comparative method. The American Naturalist, 133(4): 553-571.

Bennett, P.M. and I.P. Owens. 1997. Variation in extinction risk among birds: chance or evolutionary predisposition? Proceeding of the Biological Sciences of Royal Society, 264(1380): 401-408.

Bermingham, E. and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. Molecular Ecology, 7(4): 367-369.

Bielby, J., A.A. Cunningham and A. Purvis. 2006. Taxonomic selectivity in amphibians: ignorance, geography or biology? Animal Conservation, 9(2): 135-143.

Björklund, M. 1997. Are "comparative methods" always necessary? Oikos, 80(3), 607-613.

Blackburn, T.M. 2004. Method in macroecology. Basic and Applied Ecology, 5(5): 401-412.

Blackburn, T.M. and K.J. Gaston. 2002. Extrinsic factors and the population sizes of threatened birds. Ecology Letters, 5(4): 568-576.

Blomberg, S.P., and T. Garland, Jr. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. Journal of Evolutionary Biology, 15(6): 899-910.

Bos, D.H. and J.W. Sites, Jr. 2001. Phylogeography and conservation genetics of the Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*; Amphibia, Ranidae). Molecular Ecology, 10(6): 1499-1513.

Boxall, G.D., J.J. Sandberg and F.J. Kroon. 2002. Population structure, movement and habitat preferences of the purple-spotted gudgeon, Mogurnda adspersa. Marine and Freshwater Research: 53(5): 909-917.

Brooks, T.M., R.A. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, J. Gerlach, M. Hoffmann, J. Lamoreux, C.G. Mittermeier, J.D. Pilgrim and A.S.L. Rodrigues. 2006. Global biodiversity conservation priorities. Science Magazine, 313(5783): 58-61.

Brown, W.M., M. George and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(4): 1967-1871.

Bruford, M.W. and R.K. Wayne. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. Current Opinion in Genetics and Development, 3(6): 939-943.

Bryant, J.A., C. Lamanna, H. Morlon, A.J. Kerkhoff, B.J. Enquist and J.L. Green. 2008. Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(1): 11505-11511.

Burt, A. 1989. Comparative methods using phylogenetically independent contrasts. Oxford Surveys in Evolutionary Biology, 6: 33-53.

Burt, B.B. 2001. Evolutionary stasis, constraint and other terminology describing evolutionary patterns. Biological Journal of the Linnean Society, 72(4): 509-517.

Cardillo, M. and L. Bromham. 2001. Body size and risk of extinction in Australian mammals. Conservation Biology, 15(5): 1435-1440.

Cardillo, M. and E. Meijaard. 2012. Are comparative studies of extinction risk useful for conservation? Trends in Ecology and Evolution, 27(3): 167-171.

Cardillo, M., G.M. Mace, J.L. Gittleman, K.E. Jones, J. Bielby and A. Purvis. 2008. The predictability of extinction: biological and external correlates of decline in mammals. Proceeding of the Biological Sciences of Royal Society, 275(1641): 1441-1448.

Carstens, B.C., J.D. Degenhardt, A.L. Stevensen and J. Sullivan. 2005. Accounting for coalescent stochasticity in testing phylogeographic hypotheses: modeling Pleistocene population structure in the Idaho Giant Salamander *Dicamptodon aterrimus*. Molecular Ecology, 14(1): 255-265.

Cavalli-Sforza, L.L. and A.W. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. American Journal of Human Genetics, 19(3): 233-255.

Cavender-Bares, J., D. Ackerly, D. Baum and F. Bazzaz. 2004. Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities. The American Naturalist, 163(6): 823-843.

Cavender-Bares, J., K.H. Kozak, P.V. Fine and S.W. Kembel. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. Ecology letters, 12(7): 693-715.

Ceballos, G., P. Rodríguez, and R.A. Medellín. 1998. Assessing conservation priorities in megadiverse Mexico: mammalian diversity, endemicity, and endangerment. Ecological Applications, 8(1): 8-17.

Cheverud, J.M. and M.M. Dow. 1985. An autocorrelation analysis of genetic variation due to lineal fission in social groups of rhesus macaques. American Journal of Physical Anthropology, 67(2): 113-121.

Cheverud, J.M., M.M. Dow and W. Lautenegger. 1985. The quantitative assessment of phyogenetic constraints in comparative analyses: sexual dimorphism in body weight in primates. Evolution, 39(6): 1335-1351.

Collen B., E. Bykova, S. Ling, E.J. Milner-Gulland and A. Purvis. 2006. Extinction risk: a comparative analysis of Central Asian vertebrates. Biodiversity and Conservation, 15(6): 1859-1871.

Cooper, N., J. Bielby, G.H. Thomas and A. Purvis. 2008. Macroecology and extinction risk correlates of frogs. Global Ecology and Biogeography, 17(2): 211-221.

Cornillon, P.A., D. Pontier and M.J. Rochet. 2000. Autoregressive models for estimating phylogenetic and environmental effects: accounting for within-species variations. Journal of Theorical Biology, 202(4): 247-256.

Crandall, K.A., O.R.P. Bininda-Emonds, G.M. Mace and R.K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in Ecology and Evolution, 15(7): 290-295.

Cruzan, M.B. and A.R. Templeton. 2000. Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. Trends in Ecology and Evolution, 15(12): 491-496.

Cuenca, A., A.E. Escalante and D. Piñero. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). Molecular Ecology, 12(8): 2087-2097.

Damuth, J. 1987. Interspecific allometry of population density in mammals and other animals: the independence of body mass and population energy-use. Biological Journal of the Linnean Society, 31(3): 193-246.

De Chaine, E.G. and A.P. Martin. 2006. Using coalescent simulations to test the impact of quaternary climate cycles on divergence in an alpine plant-insect association. Evolution, 60(5): 1004-1013.

Desdevises, Y., P. Legendre,L. Azouzi and S. Morand. 2003. Quantifying phylogenetically structured environmental variation. Evolution, 57(11): 2647-2652.

Diniz-Filho J.A.F. and N.M. Tôrres. 2002. Phylogenetic comparative methods and the geographic range size-body size relationship in new world terrestrial carnivore. Evolutionary Ecology, 16(4): 351-367.

Diniz-Filho, J.A.F. 2000. Métodos Filogenéticos Comparativos. Holos Editora, Ribeirão Preto. 162 p.

Diniz-Filho, J.A.F. 2001. Phylogenetic autocorrelation under distinct evolutionary processes. Evolution, 55(6): 1104-1109.

Diniz-Filho, J.A.F., A.S.G. Coelho and C.E.R. Sant'Ana. 2000. Statistical inference of correlated evolution among macroecological traits using phylogenetic eigenvector regression. Ecologia Austral, 10(1): 27-36.

Diniz-Filho, J.A.F., C.E.R. Sant'Ana and L.M. Bini. 1998. An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. Evolution, 52(5): 1247-1262.

Dobson, F.S. 1985. The use of phylogeny in behavior and ecology. Evolution, 39(6): 1384-1388.

Domínguez-Domínguez, O. y E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation, 32(1): 59-70.

Edwards, A.W.F. and L.L. Cavalli-Sforza. 1964. Reconstruction of evolutionary trees .Pp. 67-76. In: Heywood, V.H. and J. McNeill (eds). Phenetic and Phylogenetic Classification: A Symposium. The Systematics Association Publication No. 6. London. 370p.

Edwards, S.V. and M. Kot. 1995. Comparative methods at the species level: geographic variation in morphology and group size in grey-crowned babblers (*Pomatostomus temporalis*). Evolution, 49(6): 1134-1146.

Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología Molecular. Editorial SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. México. 592 p.

Eizirik, E., J.H. Kim, M. Menotti-Raymond, P.G. Crawshaw, S.J. O'Brien and W.E. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca,* Mammalia, Felidae). Molecular Ecology, 10(1): 65-79.

Faith, D.P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. Biological Conservation, 61(1): 1-10.

Faith, D.P. 1994. Genetic diversity and taxonomic priorities for conservation. Biological Conservation, 68(1): 69-74.

Faith, D.P. and A.M. Baker. 2006. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. Evolutionary Bioinformatics Online, 17(2): 121-128.

Faith, D.P., C. Reid and J. Hunter. 2004. Integrating phylogenetic diversity, complementarity, and endemism for conservation assessment. Conservation Biology, 18(1): 255-261.

Faulks, L.K., D.M. Gilligan and L.B. Beheregaray. 2008. Phylogeography of a threatened freshwater fish (*Mogurnda adspersa*) in eastern Australia: conservation implication. Marine and Freshwater Research, 59(1): 89-96.

Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. The American Naturalist, 125(1): 1-15.

Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. Annual Review of Genetics, 22: 521-565.

Ferrier, S. 2002. Mapping spatial pattern in biodiversity for regional conservation planning: where to from here? Systematic Biology, 51(2): 331-363.

Ferson, S and M. Burgman. (eds) 2000. Quantitative methods for conservation biology. Springer-Verlag, New York, 322 p.

Fine, P.V.A. and S.W. Kembel. 2011. Phylogenetic community structure and phylogenetic turnover across space and edaphic gradients in western Amazonian tree communities. Ecography, 34(4): 552-565.

Fisher, D.O. and I.P.F. Owens. 2004. The comparative method in conservation biology. Trends in Ecology and Evolution, 19(7): 391-398.

Fisher, D.O., S.P. Blomberg and I.P.F. Owens. 2003. Extrinsic versus intrinsic factors in the decline and extinction of Australian marsupials. Proceedings of the Royal Society, 270(1526): 1801-1808.

Fjeldsaå, J. and J.C. Lovett. 1997. Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. Biodiversity and Conservation, 6(3): 325-346.

Forero-Medina, G., M.V. Vieira, C.E. Grelle and P.J. Almeida. 2009. Body size and extinction risk in Brazilian carnivores. Biota Neotropical, 9(2): 45-49.

Forest, F., R. Grenyer, M. Rouget, T.J. Davies, R.M. Cowling, D.P. Faith, A. Balmford, J.C. Manning, M. van der Bank and G. Reeves. 2007. Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. Nature, 445: 757-760.

Foufopoulos J. and A.R. Ives. 1999. Reptile extinctions on land-bridge islands: life-history attributes and vulnerability to extinction. The American Naturalist, 153(1): 1-25.

Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. Comptes Rendus Biologies, 326(1): 22-29.

Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 607 p.

Freeland, J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons (eds). The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Essex, UK. 388 p.

Fritz, S.A., O.R.P. Bininda-Emonds and A. Purvis. 2009. Geographical variation in predictors of mammalian extinction risk: big is bad, but only in the tropics. Ecology Letters, 12(6): 538-549.

Futuyma, D.J. 2005. Evolutionary Biology. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts. 603 p.

García V.B., L.O. Lucifora and R.A. Myers. 2008. The importance of habitat and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimeras. Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences, 275 (1603): 83-89.

Garland, T., Jr and P.A. Carter. 1994. Evolutionary physiology. Annual Review of Physiology, 56: 579 -621.

Garland, T., Jr. and A.R. Ives. 2000. Using the past to predict the present: confidence intervals for regression equations in phylogenetic comparative methods. The American Naturalist, 155(3): 346-364.

Garland, T., Jr. and S.C. Adolph. 1994. Why not to do two-species comparative studies: limitations on inferring adaptation. Physiological Zoology, 67(4): 797-828.

Garland, T., Jr., P.H. Harvey and A.R. Ives. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. Systematic Biology, 41(1): 18-32.

Gaston, K.J. 2010. Biodiversity. In: Sodhi, N.S. and P.R. Erlich. (eds). Conservation Biology for All. Pp. 27-44. Oxford University Press. Oxford. 341 p.

Gaston, K.J. and T.M. Blackburn. 1997. Evolutionary age and risk of extinction in the global avifauna. Evolutionary Ecology, 11(5): 557-565.

Ge, X.J., C.C. Hwang, Z.H. Liu, C.C. Huang, W.H. Huang, K.H. Hung, W.K. Wang and T Y. Chiang. 2011. Conservation genetics and phylogeography of endangered and endemic shrub *Tetraena mongolica* (Zygophyllaceae) in Inner Mongolia, China. BioMed Central Genetics, 12(1): 1-12.

Gemmell. N.J., V.J. Metcalf and F.W. Allendorf. 2004. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. Trends in Ecology and Evolution, 19(5): 238-244.

Gittleman, J.L. and H.K. Luh. 1992. On comparing comparative methods. Annual Review of Ecology and Sysematics, 23: 383-404.

Gittleman, J.L. and M. Kot. 1990. Adaptation: Statistics and null model for estimating phylogenetic effects. Systematics Zoology, 39: 227-241.

Gittleman, J.L., K.E. Jones and S.A. Price. 2004. Using complete phylogenies in comparative biology (Chapter 20). Pp. 439-460. In: Bininda-Emonds O.R.P. (Ed). Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. 550 p.

Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. Ecosistemas, 18(1): 23-33.

Graham, C.H. and P.V.A. Fine. 2008. Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time. Ecology Letters, 11(12): 1265-1277.

Graham, C.H., J.L. Parra, C. Rahbek and J.A. McGuire. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(2): 19673-19678.

Groombridge, J.J., M.W. Brufford, C. Jones and R.A. Nichols. 2000. Conservations biology "ghost" alleles of the *Mauritius kestrel*. Nature, 403: 616.

Hansen, T.F. and E.P. Martins. 1996. Translating between microevolutionary process and macroevolutionary patterns: A general model of the correlation structure of interspecific data. Evolution, 50(4): 1404-1417.

Hansen, T.F. and S.H. Orzack. 2005. Assessing current adaptation and phylogenetic inertia as explanations of trait evolution: the need for controlled comparisons. Evolution, 59(10): 2063-2072.

Harcourt, A.H. 1998. Ecological indicators of risk for primates, as judged by species' susceptibility to logging. Pp. 56-79. In: Caro, T. (ed). Behavioral Ecology and Conservation Biology. Oxford University Press, Oxford, New York. 582 p.

Harding, R. M. 1996. New phylogenies: an introductory look at the coalescent. Pp. 15-22. In: Harvey, P.H., A.J. Leigh, J. Maynard and S. Nee (eds.). New uses for new phylogenies. Oxford University Press, Oxford, Nueva York. 368 p.

Hardy, M.E., J.M. Grady and E.J. Routman. 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlans of United States. Molecular Ecology, 11(11): 2393-2403.

Harvey P.H. and A.E. Keymer. 1991. Comparing life histories using phylogenies. Philosophical Transactions de la Royal Society B: Biological Sciences, 332(1262): 31-39.

Harvey, P.H. 1996. Phylogenies for ecologists. Journal of Animal Ecology, 65: 255-263.

Harvey, P.H. and M.D. Pagel. 1991. The comparative method in evolutionary biology. Oxford Series in Ecology and Evolution 1. Oxford University Press, Oxford New York, 239 p.

Harvey, P.H. and T.H. Clutton-Brock. 1985. Life history variations in primates. Evolution, 39(3): 559-581.

Harvey, P.H., and M.D. Purvis. 1991. Comparative methods for explaining adaptations. Nature, 351: 619-624.

Heard, S.B. and A.O. Mooers. 2000. Phylogenetically patterned speciation rates and extinction risks change the loss of evolutionary history during extinctions. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 267(1443): 613-620.

Hedrick, P.W. 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution, 53(2): 313-318.

Hein, J., M.H. Schierup and C. Wiuf. 2005. Gene genealogies, variation and evolution: A primer in coalescent theory. Oxford University Press. Oxford, New York, 290 p.

Herbert, F. 2003. Dune. Ediciones Debolsillo, Barcelona, España. 255 p.

Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. Molecular Ecology, 10(3): 537-549.

Hey, J. and C.A. Machado. 2003. The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. Nature Reviews Genetics, 4: 535-543.

Hickerson, M.J., B.C. Carstens, J. Cavender-Bares, K.A. Crandall, C.H. Graham, J.B. Johnson, L. Rissler, P.F. Victoriano and A.D. Yoder. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise 2000. Molecular Phylogenetics and Evolution, 54(1): 291-301.

Hillis, D.M., C. Moritz and B.K. Mable. 1996. Molecular systematics. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, 655 p.

Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. Pp. 1-44. In: Futuyma, D. and J. Antonovics (eds). Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Oxford University Press, Oxford, UK. 255 p.

Hudson, R.R. 1998. Island models and the coalescent process. Molecular Ecology, 7(4): 413-418.

Hughes, C.R. and D.C. Queller. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. Molecular Ecology, 2(3): 131-137.

Hull, J.M., A.C. Hull, B.N. Sacks, J.P. Smith and H.B. Ernest. 2008. Landscape characteristics influence morphological and genetic differentiation in a widespread raptor (*Buteo jamaicensis*). Molecular Ecology, 17(3): 810-824.

Hurwood, D.A. and J.M. Hughes. 1998. Phylogeography of the freshwater fish, *Mogurnda adspersa,* in streams of northeastern Queensland, Australia: evidence for altered drainage patterns. Molecular Ecology, 7(11), 1507-1517.

Irwin, D.E. 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers. Evolution, 56(12): 2383-2394.

Johnson, C.N. 1998. Species extinction and the relationship between distribution and abundance. Nature, 394: 272-274.

Johnson, C.N., S. Delean and A. Balmford. 2002. Phylogeny and the selectivity of extinction in Australian marsupials. Animal Conservation, 5(2): 135-142.

Jones, K.E., J. Bielby, M. Cardillo, S.A. Fritz, J. O'Dell, C.D.L. Orme, K. Safi, W. Sechrest, E.H. Boakes, C. Carbone, C. Connolly, M.J. Cutts, J.K. Foster, R. Grenyer, M. Habib, C.A. Plaster, S.A. Price, E.A. Rigby, J. Rist, A. Teacher, O.R.P. Bininda-Emonds, J.L. Gittleman, G.M. Mace and A. Purvis. 2009. PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. Ecology, 90(9): 2648.

Kashi, Y. and M. Soller. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein, D.B. and C. Sclotterer (eds). Microsatellites: Evolution and Applications. P 10-23. Oxford University Press. 386 p.

Kembel, S.W. and S.P. Hubbell. 2006. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree community. Ecology, 87(7): 86-99.

Kembel, S.W., P.D. Cowan, M.R. Helmus, W.K. Cornwell, H. Morlon, D.D. Ackerly, S.P. Blomberg, and C.O. Webb. 2010. PICANTE: R tools for integrating phylogenies and ecology. Bioinformatics, 26(11): 1463-1464.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2): 111-120.

Kingman, J.F.C. 1982. The coalescent. Stochastic Processes and their Applications, 13(3): 235-248.

Kotze, D. and R. O'Hara. 2003. Species decline - but why? Explanations of carabid beetle (Coleoptera, Carabidae) declines in Europe. Oecologia, 135(1): 138-148.

Kozak, K.H. and J.J. Wiens. 2006. Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. Evolution, 60: 2604-2621.

Kraft, N.J.B., W.K. Cornwell, C.O. Webb and D.D. Ackerly. 2007. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. The American Naturalist, 170(2): 271-283.

Krajewski, C. 1991. Phylogeny and diversity. Science, 254(5034): 918-919.

Lanteri, A.A. y V.A. Confalonieri. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. P 185-193. En: Llorente-Bousquets, J. y J.J. Morrone (eds). Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 546 p.

Larson, A. and J.B. Losos. 1996. Phylogenetic systematics of adaptation. Pp. 187–220. In: Rose, M.R. and G.V. Lauder (eds). Adaptation. Academic Press, San Diego, CA. 507 p.

Losos, J.B. 1990. The evolution of form and function: morphology and locomotor performance in West Indian Anolislizards. Evolution, 44(5): 1189-1203.

Losos, J.B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. Ecology Letters, 11(10): 995-1003.

Lozupone, C. and R. Knight. 2005. UNIFRAC: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 8228-8235.

Lynch, M. 1991. Methods for analysis of comparative data in evolutionary biology. Evolution, 45(5): 1065-1080.

Mace, G.M. 2004. The role of taxonomy in species conservation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 359(1444): 711-719.

Mace, G.M., J.L. Gittleman and A. Purvis. 2003. Preserving the tree of life. Science, 300(5626): 1707-1709.

Machac, A., M. Janda, R.R. Dunn and N.J. Sanders. 2011. Elevational gradients in phylogenetic structure of ant communities reveal the interplay of biotic and abiotic constraints on diversity. Ecography, 34(3): 364-371.

Maddison, W.P. 1996. Molecular approaches and the growth of phylogenetic biology. Pp. 47-63. In: Ferraris, J.D. and S.R. Palumbi (eds). Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols. Wiley-Liss, New York. 580 p.

Manel, S., M.K. Schwartz, G. Luikart and P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution, 18(4): 189-197.

Margules, C., R. Pressey and P. Williams. 2002. Representing biodiversity: data and procedures for identifying priority areas for conservation. Journal of Biosciences, 27(4): 309-326.

Martins, E.P. 1993. A comparative study of the evolution of *Sceloporus* push-up displays. The American Naturalist, 142(6): 994-1018.

Martins, E.P. 1994. Estimating the rate of phenotypic evolution from comparative data. The American Naturalist, 144(2): 193-209.

Martins, E.P. 1996. Phylogenies and the comparative method in animal behavior. Oxford University Press, New York. 432 p.

Martins, E.P. 2000. Adaptation and the comparative method. Trends in Ecology and Evolution, 15(7): 296-299.

Martins, E.P. and T. Garland. 1991. Phylogenetic analyses of the correlated evolution of continuous characters: a simulation study. Evolution, 45: 534-557.

Martins, E.P. and T.F. Hansen. 1997. Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. The American Naturalist, 149(4): 646-667.

Martins, E.P., A. Labra, M.P. Halloy and J.T. Thompson. 2004. Large-scale patterns of signal evolution: an interspecific study of *Liolaemus* lizard headbob displays. Animal Behaviour, 68(3): 453-463.

May-Collado, L.J. and I. Agnarsson. 2011. Phylogenetic analysis of conservation priorities for aquatic mammals and their terrestrial relatives. Public Library of Science-One, 6(7): 1-10.

Morales, E. 2000. Estimanting phylogenetic inertia in the genus *Tithonia* (Asteracea): a comparative approach. Evolution, 54(2): 475-484.

Morando, M., L.J. Ávila and W. Sites. 2008. Phylogeography between valleys and mountains: the history of populations of *Liolaemus koslowskyi* (Squamata, Liolaemini). Zoologica Scripta, 37(6): 603-618.

Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. Molecular Ecology, 3(4): 401-411.

Moritz, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 349(1327): 113-118.

Moritz, C. and D. Faith. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. Molecular Ecology, 7(4): 419-429.

Moxon, E.R., C. Wills. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? Scientific American, 280(1): 94-99.

Murray B.R. and G.C. Hose. 2005. Life-history and ecological correlates of decline and extinction in the endemic Australian frog fauna. Austral Ecology, 30: 564-571

Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403: 853-858.

Neff. B.D. and M.R. Gross. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. Evolution, 55(9): 1717-1733.

Nielsen, R., and M. A. Beaumont. 2009. Statistical inferences in phylogeography. Molecular Ecology, 18(6): 1034-1047.

Nordborg, M. 2000. Coalescent theory. In: Balding, D.J., M.J. Bishop and C. Cannings (eds.). P 1-37. Handbook of Statistical Genetics. John Wiley & Sons, Winchester, UK. 1308 p.

Nunn, C.L. 2011. The Comparative Approach in Evolutionary Anthropology and Biology. University of Chicago Press, Chicago, USA. 392 p.

Ornelas, J.F. 1998. Filogenias y método comparativo: identificación y evaluación de hipótesis evolutivas y establecimiento de criterios para conservar especies en riesgo. Acta Zoológica Mexicana, 74: 5-42.

Owens, I.P.F., and P.M. Bennett. 2000. Ecological basis of extinction risk in birds: habitat loss versus human persecution and introduced predators. Proceedings of the National Academy Sciences, USA, 97: 12144-12148.

Pagel M.D., and P.H. Harvey. 1988. Recent developments in the analysis of comparative data. Quarterly Review of Biology, 63:413-440.

Peterson, A., J. Soberón and V. Sánchez-Cordero. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. Science, 285: 1265-1267.

Pillon, Y., M.F. Fay, A.B. Shipunov and M.W. Chase. 2006. Species diversity versus phylogenetic diversity: a practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae). Biological Conservation, 129: 4-13.

Polasky, S., B. Csuti, C.A. Vossler, and S.M. Meyers. 2001. A comparison of taxonomic distinctness versus richness as criteria for setting conservation priorities for North American birds. Biological Conservation, 97(1): 99-105.

Polo, V. and L.M. Carrascal. 1999. Shaping the body size distribution of passeriformes: habitat use and body size are evolutionarily and ecologically related. Journal of Animal Ecology, 68(2): 324-337.

Posadas, P., D.R.M. Esquivel, and J.V. Crisci. 2001. Using phylogenetic diversity measures to set priorities in conservation: an example from southern South America. Conservation Biology, 15(5): 1325-1334.

Pressey, R., C. Humphries, C. Margules, R. Vane-Wright, and P. Williams. 1993. Beyond opportunism: key principles for systematic reserve selection. Trends in Ecology and Evolution, 8(4): 124-128.

Purvis A., Gittleman J.L., Cowlishaw G. and Mace G.M. 2000. Predicting extinction risk in declining species. Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences 267: 1947–1952.

Purvis A., M. Cardillo, R. Greyner and B. Collen. 2005. Correlates of extinction riks: phylogeny, biology, threat and scale. In: Purvis A., J.L. Gittleman and T. Brookes (eds). P 295-316. Phylogeny and Conservation. Cambridge University Press, Cambridge. 448 p.

Purvis A., P.M. Agapow, J.L. Gittleman and G.M. Mace. 2000. Nonrandom extinction and the loss of evolutionary history. Science, 288(5464): 328-330.

Pyron, R.A. and J.J. Wiens. 2011. A large-scale phylogeny of amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Molecular Phylogenetics and Evolution, 61(2): 543-583.

Rach, J., R. Desalle, I.N. Sarkar, B. Schierwater and H. Hadrys. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. Proceeding of the Biological Sciences of Royal Society, 275(1632): 237-247.

Rentería-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. (Capítulo 18). En: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. (eds). P. 541-566. Ecología Molecular. 1ra Edición. Editorial SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. México. 592 p.

Rezende, E.L., y T. Garland, Jr. 2003. Comparaciones interespecíficas y métodos estadísticos filogenéticos. En: Bozinovic, F. (ed). P 79-98. Fisiología Ecológica y Evolutiva. Teoría y Casos de Estudios en Animales. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 532 p.

Rissler, L. J., R.J. Hijimans, C.H. Graham, C. Moritz and D.B. Wake. 2006. Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analyses: a case study of California herpetofauna. The American Naturalist, 167(5): 655-666.

Rissler, L.J. and J.J. Apodaca. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). Systematic Biology, 56(6): 924-942.

Rodrigues, A.S.L. and K.J. Gaston. 2002. Maximising phylogenetic diversity in the selection of networks of conservation areas. Biological Conservation, 105: 103-111.

Rohlf, F.J. 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. Evolution, 55(11): 2143-2160.

Russell, G.J., T.M. Brooks, M.M. McKinney and C.G. Anderson. 1998. Present and future taxonomic selectivity in bird and mammal extinctions. Conservation Biology, 12(6): 1365-1376.

Russello, M.A. and G. Amato. 2004. Ex-situ population management in the absence of pedigree information. Molecular Ecology, 13(9): 2829-2840.

Safi, K. and G. Kerth. 2004. A comparative analysis of specialization and extinction risk in temperate-zone bats. Conservation Biology, 18(5): 1293-1303.

Schluter, D. 2000. The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press, Oxford. 288 p.

Schneider, C.J., M. Cunningham and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the wet tropics rainforests of Australia. Molecular Ecology, 7(4): 487-498.

Sibley, C.G. and J.E. Ahlquist. 1990. Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. New Haven. Yale University Press. 1080 p.

Slater, E.C. 1988. Is biochemistry irreducible to chemistry? Trends in Biochemical Sciences, 13(10): 378.

Slingsby, J.A. and G.A. Verboom. 2006. Phylogenetic relatedness limits co-occurrence at fine spatial scales: evidence from the *Schoenoid sedges* (Cyperaceae: Schoeneae) of the Cape Floristic Region, South Africa. The American Naturalist, 168(1): 14-27.

Sokal, R.R. and N.L. Oden. 1978. Spatial autocorrelation in biology: 1. Methodology. Biological Journal of the Linnean Society, 10(2): 199-228.

Soltis, D.E., P.S. Soltis and I.J. Doyle. 1998. Molecular systematics of plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers Boston, Dordrecht, London. 581 p.

Storfer, A., M.A. Murphy, J.S. Evans, C.S. Goldberg, S. Robinson, S.F. Spear, R. Dezzani, E. Demelle, L. Vierling and L.P. Waits. 2007. Putting the "landscape" in landscape genetics. Heredity, 98: 128-142.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution, 15(5): 199-206.

Templeton A.R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. Molecular Ecology, 10(3): 779-791.

Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. Molecular Ecology, 7(4): 381-397.

Thomas, C.D., A. Cameron, R.E. Green, M. Bakkenes, L.J. Beaumont, Y.C. Collingham, B.F.N. Erasmus, M. Ferreira-de Siqueira, A. Grainger, L. Hannah, L. Hughes, B. Huntley, A.S. van Jaarsveld, G.F. Midgley, L. Miles, M.A. Ortega-Huerta, A.T. Peterson, O.L. Phillips and S.E. Williams. 2004. Extinction risk from climate change. Nature, 427: 145-148.

Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T. Gilbert, L. Orlando and E. Willerslev. 2011. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 21(11): 2565-2573.

Valiente-Banuet, A. and M. Verdú. 2007. Facilitation can increase the phylogenetic diversity of plant communities. Ecology Letters, 10(11): 1029-1036.

Valiente-Banuet, A., E. Baraza, R. Zamora y M. Verdú. 2009. Interacciones positivas planta-planta, reglas de ensamblaje y la conservación de la diversidad. En: Medel, R., M.A. Aizen y R. Zamora (eds). P 181-193. Ecología y Evolución de Interacciones Planta-Animal. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. 399 p.

Vamosi, S., S. Heard, J. Vamosi and C. Webb. 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. Molecular Ecology, 18(4): 572-592.

Vane-Wright, R.I., C.J. Humphries and P.H. Williams. 1991. What to protect? systematics and the agony of choice. Biological Conservation, 55(3): 235-254.

Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte, L.E., V. Sousa y X. Aguirre (eds.). P 441-466. Ecología Molecular. 1ra Edición. Editorial SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. México. 592 p.

Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda Rico, T. Garrido Garduño y T.A. Gutiérrez García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Revista Chilena de Historia Natural, 82(2): 277-297.

Vézquez, D.P. and J.L. Gittleman. 1998. Biodiversity conservation: does phylogeny matter? Current Biology, 8(11): 379-381.

Vogler, A.P. and R. De Salle. 1994. Diagnosing units of conservation management. Conservation Biology, 8(2): 170-178.

Weaver, R. F. 2011. Molecular Biology. 4ta Edition. McGraw-Hill Companies, Incorporated. New York, NY. 912 p.

Webb, C.O., D.D. Ackerly, M.A. McPeek and M.J. Donoghue. 2002. Phylogenies and community ecology. Annual Review of Ecology and Systematics, 33(2002): 475-505.

Westoby, M., M.R. Leishman and M.J. Lord. 1995. On misinterpreting the phylogenetic correction. Journal of Animal Ecology, 83(3): 531-534.

Wiens, J.J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. Evolution, 58(1): 193-197.

Wiens, J.J. and C.H. Graham. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 36(2005): 519-539.

Wiens, J.J. and T. Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). Systematic Biology, 51(1): 69-91.

Zardoya, R. and A. Meyer. 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 13(7): 933-942.

Zhang, D.X. and G.M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology, 12(3): 563-584.

Zink, R.M. 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. Integrative and Comparative Biology, 42(5): 953-959.

Editor: Albeiro López Herrera
Autores
Albeiro López Herrera. Zoot, MV, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. alherrera@unal.edu.co
Ángela M. Ortega-León. Biol, PhD. Grupo de Biodiversidad, Departamento de Biología, Universidad de Córdoba – Montería. amortega@sinu.unicordoba.edu.co
Carlos E. Ortíz-Yusty. Biol, MSc(C). Grupo de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Medellín. carlosyu1286@gmail.com
Edna Judith Márquez. Biol, MSc, PhD. Departamento de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. ejmarque@gmail.com
Jaime Eduardo Parra Suescun. Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. jeparrasu@unal.edu.co
Joan Gastón Zamora-Abrego. Lic Ecología, PhD. Grupo de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Medellín. jogzamoraab@unal.edu.co
Johana Andrea Ciro Galeano. Zoot, MSc. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. jacirog@unal.edu.co
José Julián Echeverri Zuluaga. Zoot, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. jjecheve@unal.edu.co
Juan Carlos Rincón Flórez. Zoot, MSc, PhD(C), Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Estudiante Posgrado en Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. jcrincon@unal.edu.co
Julio Cesar Hurtado-Alarcón. Zoot, MSc, PhD(C). Laboratorio de Biología Molecular y Celular Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. jchurtad@unal.edu.co
Néstor Javier Mancera-Rodríguez. Biol, PhD. Grupo Ecología y Conservación de Fauna Silvestre. Posgrado en Bosques y Conservación Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. njmancer@unal.edu.co
Norma L. Manríquez-Morán. Laboratorio de Sistemática Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. nrm292@gmail.com
Samir Benicio Brú Cordero. Profesional en Acuicultura, MSc(C). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Acuícolas. Grupo de investigación CINPIC, Universidad de Córdoba. samir_bru@hotmail.com
Sandra Clemencia Pardo Carrasco. MVZ, MSc, PhD. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Profesor Asociado. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. scpardoc@unal.edu.co
Ximena Cardona Lopera. Biol, MSc (C). Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Dpto.Asistencia técnica. Cooperativa COLANTA Ltda. ximenacl@colanta.com.co

Este libro fue escrito e impreso con recursos del proyecto "Técnicas moleculares utilizadas en el mejoramiento de la producción animal y la conservación de la biodiversidad", código Hermes 12754, de la CONVOCATORIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DE CREACIÓN ARTÍSTICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
2010 – 2012. Modalidad 2: Fortalecimiento a grupos de investigación y creación artística con proyección nacional. ALIANZAS DE GRUPOS

Este libro se terminó de imprimir en los talleres del Centro de Publicaciones
de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín
en el mes de abril de 2013.

Esta edición consta de 300 ejemplares,
Se utilizarón fuentes DIN para títulos
y la fuente Century Scholbook para los textos.
La carátula se imprimió en papel esmaltado de 250 g
las páginas interiores en papel Bond de 75 g.

La diagramación fue realizada por Madaly López González.