



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS
EN BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DE PECARI DE COLLAR (*Pecari tajacu*)
DEL BAJO BALSAS, MICHOACÁN.**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

IBQ. ERIK MONDRAGÓN BLANCO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA GUADALUPE ZAVALA PARAMO

CO-DIRECTOR:

DR. HORACIO CANO CAMACHO

MORELIA, MICHOACÁN, MARZO 2013





**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL CENTRO
MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA FMVZ-
UMSNH. km 9.5 CARRETERA MORELIA-ZINAPÉCUARO, MICHOACÁN
C.P. 62250. TEL/FAX: (443) 295 80 29. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. MARIA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO EN CO-DIRECCIÓN CON
EL DR. HORACIO CANO CAMACHO.**

DEDICATORIA

A mi hija, **Aislinn Yerahí Mondragón Quiroz** que se ha convertido en ese pequeño motor que le da sentido a mi vida.

A Erika Quiroz Roque por a verle puesto la sal y la pimienta que le faltaba a mi insipiente andar.

A mis padres Ing. Pedro Mondragón Pedroza y Enfra. Cirina Blanco Escarramán que con su paciencia, amor y enseñanza estuvieron en todo momento de alegría y adversidad en mi camino.

A mis hermanos ISC. José Manuel Mondragón Blanco y Enfra. Zuleima Yamilet Mondragón Blanco, por la motivación, el amor y el apoyo moral siempre brindado de manera incondicional.

A mis abuelos Miguel Blanco Luna y María Isabel Pedroza Mendoza que ayudaron a mi formación por medio de valores morales y enseñanza de igualdad y justicia, siempre estarán en mi corazón. *DEP.*

A todos aquellos que creyeron que no lo lograría, pero sobre todo a aquellos que si creyeron que podía.

“Un ser humano es algo más que la suma de sus genes”

(Anónimo)

AGRADECIMIENTOS

A ese ser supremo que todo lo ve, por permitirme la vida y salud para poder culminar este trabajo y ser mi aliado en todas las labores desempeñadas.

A los Doctores María Guadalupe Zavala Páramo y Horacio Cano Camacho por permitirme formar parte de su equipo y por el apoyo moral brindado en la realización de este trabajo.

A los Drs. Omar Dominguez Dominguez, Ulices Aguilera Reyes y Tiberio Cesar Monterrubio Rico, por su apoyo académico y moral que me brindaron.

A mis padres por el apoyo económico y moral que me brindaron en todos los aspectos de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio: Nadezhda, Lupita, Alicia, Carlos Alberto, Eymard, Ulises y Alfonso por su apoyo y por compartirme sus conocimientos durante mi estancia en la realización de esta tesis.

A mi amigo Alejandro García Guzmán, por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo y por creer en mí.

A CONACyT por el apoyo económico que me brindo para la realización de este trabajo.

INDICE

RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Marcadores Moleculares.....	9
2.1.1 El ADN mitocondrial como marcador molecular.....	10
2.1.2 El ADN nuclear como marcador molecular, Microsatélites.....	11
2.2 Estudios moleculares en Pecari.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo General.....	16
5.2 Objetivos Particulares.....	16
6. MATERIAL Y METODOS.....	17
6.1 Material biológico.....	17
6.2 Extracción de ADN de sangre y tejido.....	17
6.3 Extracción de ADN de hueso.....	19
6.4 Amplificación de mtADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	19

6.5 Secuenciación y análisis.....	20
6.6 Amplificación de loci microsatélites por PCR y detección.....	22
6.7 Análisis estadístico.....	24
6.8 Análisis de comparación.....	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1 Extracción de ADN.....	26
7.2 Amplificación del marcador <i>Cytb</i>	27
7.3 Alineamiento de secuencias.....	27
7.4 Diversidad genética.....	28
7.5 Análisis de distancia genética.....	29
7.6 Amplificación de marcadores moleculares, microsatélites.....	33
7.7 Análisis de microsatélites.....	36
7.7.1 Diversidad genética.....	36
7.7.2 Equilibrio de Hardy Weinberg.....	40
7.7.3 Diferenciación genética.....	40
8. DISCUSIÓN.....	42
8.1 Diversidad genética con <i>Cytb</i>	42
8.2 Análisis de distancia genética con <i>Cytb</i>	43
8.3 Análisis con cinco loci microsatélites.....	44
8.3.1 Diversidad genética.....	44

8.3.2 Equilibrio de Hardy Weinberg.....	45
8.3.3 Alelos privados.....	46
8.3.4 Diferenciación genética.....	47
9. CONCLUSIONES.....	48
10. BIBLIOGRAFIA.....	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala geológica de tiempo.....	3
Tabla 2. Colección de muestras del CMEB.....	18
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de <i>Cytb</i>	19
Tabla 4. Haplotípos reportados en base de datos utilizados en los análisis de comparación.....	22
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificación del loci microsatélites...	23
Tabla 6. Secuencias correspondientes a los haplotípos de <i>Cytb</i> obtenidos en este estudio.....	28
Tabla 7. Datos obtenidos del análisis de diversidad.....	29
Tabla 8. Alelos obtenidos en cada locus microsatélite y sus frecuencias en las poblaciones analizadas.....	36
Tabla 9. Numero de alelos observados, riqueza alelica y diversidad genética por locus.....	38
Tabla 10. Polimorfismo de cinco loci microsatélites.....	38
Tabla 11. Polimorfismo de las poblaciones analizadas.....	39
Tabla 12. Diferenciación genética pareada (F_{ST}) y distancia genética pareada de Nei de las poblaciones analizadas.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Migración del Pecari.....	4
Figura 2. <i>Catagonus Wagneri</i>	5
Figura 3. Mapa de distribución actual.....	5
Figuar 4. <i>Tayassu pecari</i>	6
Figura 5. Mapa de distribución actual.....	6
Figura 6. <i>Pecari tajacu</i>	6
Figura 7. Mapa de distribución actual.....	6
Figura 8. Estructura y organización de los genes en mtADN en mamíferos.....	9
Figura 9. ADN purificado de muestras biológicas de sangre y tejido de <i>P. tajacu</i> ..	26
Figura 10. Productos de amplificación del marcador molecular <i>Cytb</i>	27
Figura 11. Alineamiento de secuencias en BioEdit.....	28
Figura 12. Árbol de distancia por el método Neightbor Joinin con el modelo de sustitución Tamura-Nei (1993).....	31
Figura 13. Red de haplotípos de <i>P. tajacu</i> de la población de Michoacán y de zoológicos de América.....	32
Figura 14. Productos de amplificación de cinco loci microsatélites.....	33
Figura 15. Producto de amplificación para el locus SW240.....	34
Figura 16. Producto de amplificación del marcador microsatélite S0097.....	34

Figura 17. Producto de amplificación del marcador microsatélite SW857.....	35
Figura 18. Producto de amplificación del marcador microsatelite IGF1.....	35
Figura 19. Producto de amplificación del marcador microsatelite SW72.....	36
Figura 20. Dendograma de distancia construido por el método Neighbor Joining.	41

RESUMEN

El pecarí de collar es un mamífero neotropical perteneciente al grupo de los pecaríes o cerdos americanos, conocido como una de las especies de mamíferos silvestres existente en Michoacán, ha desempeñado un papel muy importante como parte de las cadenas tróficas. Sin embargo, actualmente se desconoce el nivel de diversidad genética de la especie. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis molecular en una población de pecarí de collar de Michoacán mediante el marcador mitocondrial citocromo b (*cytb*) y cinco loci de microsatélites para establecer los niveles de diversidad genética, diversidad haplotípica y nucleotídica, y relaciones genéticas. Se analizaron 18 muestras biológicas de pecarí de collar (*Pecari tajacu*), adicionalmente se colectaron 6 muestras de sangre de 6 individuos de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) y 6 de pecari en cautiverio. Se purificó ADN de sangre y tejido mediante el método descrito por FitzSimmons *et al.* (1997). Para la amplificación por PCR de un fragmento de 1140 pb de Citocromo b, se utilizó el juego de oligonucleótidos descrito por Irwin *et al.* (1991). Se secuenció el ADN de ambas cadenas por el método dideoxy de Sanger *et al.* (1977). Se utilizaron oligonucleótidos para cinco loci de microsatélites propuestos por Stahlberg *et al.* (1998) y por Gongora *et al.* (2002). Para la detección de los productos de amplificación en GeneScan se utilizaron los oligonucleótidos 5' de cada par, marcados con el fluorocromo FAM-5 y el marcador interno ROX-350. Las secuencias obtenidas de *cytb* y los alelos de los loci de microsatélites se analizaron mediante varios paquetes de software especializados. Con el análisis de comparación de las secuencias de *cytb* de este estudio y las reportadas previamente en banco de datos internacional, se construyó un Árbol de distancias mediante el método Neighborn Joining. Las muestras de Michoacán se agruparon con individuos de las regiones Norte y Centro América, mientras que el resto de las secuencias analizadas se separó en un grupo mayor que incluye a los individuos de Sudamérica. Algunos de los haplotipos de individuos procedentes de zoológicos coincidieron con haplotipos de Michoacán. El análisis de diversidad genética con *cytb* sugieren un rápido crecimiento por la retención de mutaciones de la población y una reciente coalescencia, y los resultados del análisis de similitud en el árbol de distancia genética y la relación de haplotipos indicaron la

presencia de dos grupos genéticos. Se construyó una matriz con los datos obtenidos para los cinco loci de microsatélites. Se detectaron 15 alelos en los 18 individuos de Michoacán, 22 alelos en las muestras de cerdo y 12 en las muestras de pecarí en cautiverio. La presencia de un número alto de alelos privados la población de *P. tajacu* de Michoacán es congruente con la idea de que la población tuvo un rápido crecimiento con retención de mutaciones.

Palabras clave: *Pecari tajacu*, citocromo b, microsatélites, diversidad.

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Michoacán, cuenta con una amplia diversidad de climas y características topográficas en base a las cuales se identifican cinco regiones fisiográficas cada una con una asociación vegetal característica, Bajío, Faja Volcánica Transmexicana, Bajo Balsas, Sierra y Costa (Madrigal, 1997), y es reconocido por su extensa diversidad en mastofauna, con un aproximado de 161 especies silvestres. La región del Bajo Balsas en Michoacán es una de las tres subregiones que conforman la cuenca hidrológica del río Balsas. Considerada como el área de mayor diversidad (35,046 km²), integra los municipios de Arteaga, la Huacana, Múgica y Churumuco, aquí se localizan mamíferos de importancia comercial y cinegética, entre ellos especies de felinos como el ocelote (*Leopardus pardalis*) y puma (*Puma concolor*), algunas especies de lagomorfos (*Lepus callotis*, *Sylvilagus floridanus* y *Sylvilagus canicularis*), entre los mamíferos más destacados, el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el pecari de collar (*Pecari tajacu*). A pesar del extenso número de especies en el estado de Michoacán, los trabajos de investigación son escasos, consecuentemente la información con respecto a la tipificación molecular y genética de mamíferos silvestres es escasa o nula (Uribe y Arita, 1998).

El pecari de collar es un mamífero neotropical perteneciente al grupo de los pecaríes o cerdos americanos, ha desempeñado un papel muy importante como parte de las cadenas tróficas siendo una de las principales fuentes de proteína para diferentes predadores mayores, como jaguares, pumas, panteras, así como para comunidades marginales, especialmente poblaciones indígenas y rurales (Aranda, 1994). Otro de los aspectos importantes de esta especie es la dispersión de semillas de los frutales que forman parte de su dieta, por lo tanto, se infiere el importante papel en el

establecimiento de la estructura vegetal de los ecosistemas que habita, además, el pecari posee un excelente olfato que le permite detectar fuentes de nutrientes que se encuentran en el subsuelo, obligándolo a remover la tierra y hojarasca, acción que favorece el ciclado de nutrientes en el suelo (Sabogal Rodriguez S.P, 2010).

Las condiciones biológicas de esta especie llaman la atención hacia el desarrollo de estudios integrales bajo condiciones de confinamiento. Sin embargo, el análisis genético molecular que se ha desarrollado hasta ahora en el pecarí de collar, se ha enfocado en el reconocimiento de la especie dentro del género *Tayassu* y la comprensión de sus relaciones filogenéticas y filogeográficas.

En México son realmente pocos los estudios enfocados en el análisis de diversidad y estructura genética a nivel intraespecífico. Actualmente el conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres con potencial cinegético, permiten el desarrollo de estrategias de conservación y manejo sustentable de las especies silvestres sometidas a explotación.

2. ANTECEDENTES

Los restos fósiles de ungulados que datan del Paleoceno, sugieren que el pecari se desarrolló durante el periodo terciario, desde finales del Eoceno hasta principios del Oligoceno en Europa (Tabla 1).

Tabla 1. Escala geológica de tiempo

ERA	PERIODO	EPOCA	MILLONES DE AÑOS DE INICIADO AL PRESENTE	MAYOR EVENTO
CENOZOICO	CUATERNARIO	RECIENTE	0.01	Los continentes en posición moderna; repetidas glaciaciones y disminución del nivel del mar; cambio en la distribución geográfica; extinción de los grandes mamíferos y aves; evolución del <i>homo erectus</i> al <i>homo sapiens</i> ; desarrollo de la agricultura y la civilización.
		PLEISTOCENO	1.8	
	TERCIARIO	PLIOCENO	5.3	Continentes acercándose a la posición moderna; incremento del frío, clima seco, expansión de los mamíferos, aves, serpientes, angiospermas, insectos polinizadores, peces teleósteos
		MIOCENO	23.0	
		OLIGOCENO	33.9	
		EOCENO	55.8	
		PALEOCENO	65.5	
MESOZOICO	CRETACEO		145	Mayor separación de los continentes; continúan expandiéndose los dinosaurios; incremento en la diversidad de angiospermas, mamíferos, aves; extinción masiva y fin del periodo, incluyendo grandes ammonidos y dinosaurios.
	JURASICO		200	Separación de los continentes; diversificación de dinosaurios y otros reptiles; primeras aves; mamíferos arcaicos; dominio de gimnospermas; evolución de angiospermas; revolución marina mesozoica.
	TRIASICO		251	Inicio de la separación de los continentes; incremento de la diversidad marina; gimnospermas dominantes; diversificación de reptiles, incluyendo los primeros dinosaurios; primeros mamíferos.

Nota: datos obtenidos de la tabla estratigráfica internacional (International Commission on Stratigraphy, 2004).

Se han encontrado fósiles en todos los continentes, excepto en Australia y la Antártida (Docrocq, 1994; Góngora y Moran, 2005). Se ha propuesto que la separación de los pecaríes del resto de los ungulados ocurrió en Asia de donde migraron al Norte de América a principios del Oligoceno y posteriormente poblaron América del sur hasta hace aproximadamente tres millones de años durante el Pleistoceno, durante lo que se conoce como el Gran Intercambio Americano por la formación del Istmo de Panamá que conectó a América del norte con América del Sur (Wetzel, 1977; Mayer y Bandt, 1982; Docrocq, 1994; Góngora y Moran, 2005; Góngora *et al.*, 2006). Sin embargo, una segunda hipótesis sugiere que los pecaríes divergieron en América del norte durante el mioceno tardío y posteriormente poblaron América del Sur, de manera independiente (Fig. 1)(Góngora y Moran, 2005).

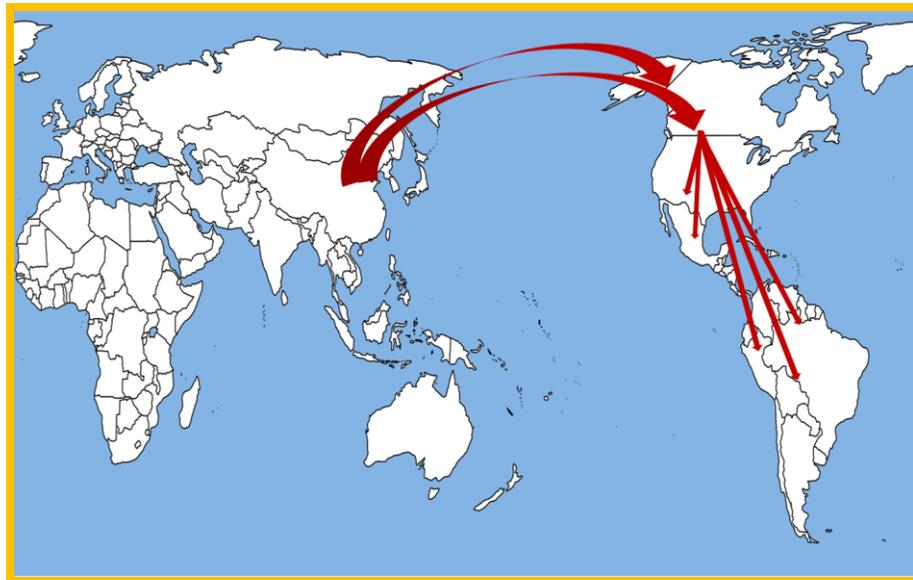


Figura 1. Migración de Pecari. Se cree que el pecari migró de Asia a América del norte y posteriormente se separa en las diferentes especies hermanas y se expanden hacia América del sur (Ducrocq, 1994).

Se reconocen actualmente tres especies de pecari, todos confinados al Continente Americano. La especie *Catagonus wagneri* -pecari chacoano- (Fig. 2) llega a tener una longitud promedio de 110 cm. Se caracteriza por un pelaje algo más claro, las orejas y la trompa son más grandes que las otras especies, sin la presencia de manchas específicas. Vive en bosques de arbusto seco y se encuentra únicamente en el Gran Chaco que comprende porciones de Paraguay, Argentina y Bolivia (Fig. 3). (Groves y Grubb, 1993; Aranda, 1994; Aranda, 2008; Gilbert, 1999).



Figura 2. *Catagonus wagneri*
(Foto de Dave Pape, zoológico de Phoenix Az, USA).



Figura 3. Mapa de distribución actual

La especie *Tayassu pecari*, tiene en promedio una altura a la cruz de 55 cm y una longitud de un metro. Una mancha clara en la base de la trompa en torno a los labios, le da el nombre común a la especie, pecari de labio blanco (Fig. 4). De las especies de pecaríes esta prefiere las frondas cerradas y los ámbitos prehúmedos, condiciones típicas de los bosques lluviosos de América central y América del sur, se distribuye del sur de México hasta el norte de Argentina (Fig. 5). (Groves y Grubb, 1993; Aranda, 1994; Gilbert, 1999; Aranda, 2008).



Figura 4. *Tayassu pecari*
(Foto de Ana Cotta, Brazil).



Figura 5. Mapa de distribución actual

La especie *Pecari tajacu* –pecari de collar- (Fig. 6), cuya distribución geográfica es la más extensa para cualquier mamífero de América de acuerdo con los datos de la UICN (1993), abarca desde el sureste de EE.UU. hasta el norte de Argentina (Fig. 7). En México solo está ausente en la península de Baja California y parte de la región central de la República Mexicana, se adapta a una gran variedad de hábitats, que van desde desiertos, sabanas, sabanas arboladas, bosques de galería y en algunos casos en zonas de cultivos (Hall, 1981; SOWLS, 1984; Eisenberg, 1989; Redford y Eisenberg, 1992; Groves y Grubb, 1993; Aranda, 1994; Gilbert, 1999; Aranda, 2000; Lamit y Hendrie, 2009).



Figura 6. *Pecari tajacu*
(Foto de Jorge Llugdar, Reserva el Itín, Col).



Figura 7. Mapa de distribución actual

De acuerdo con las características morfométricas de esta especie indican que vive en piaras y su alimentación es de carácter omnívoro, sin embargo su dieta principal se basa en plantas, dependiendo directamente de la disponibilidad de recursos en el área donde se localice. Algunos aspectos son; gestación de 142-148 días, con un promedio de 1-2 crías por parto, alcanzando un peso de entre 18 y 25 kg y una talla muy corta comparada con la de los cerdos comunes -*Sus scrofa*- (Groves y Grubb, 1993; Mayor P, 2004). Sus mandíbulas y colmillos están adaptados para triturar semillas duras y para arrancar raíces del subsuelo, funcionan también como arma de defensa contra algunos de sus predadores. La principal característica morfológica que los diferencia con respecto a los jabalíes, es que estos últimos, se identifican por tener los colmillos inferiores más largos y curvos hacia afuera, mientras que en los pecaríes, los colmillos superiores son más largos y rectos (Fernández-Silva *et al.*, 2003; Lamit y Hendrie, 2009).

El pelaje en etapa adulta, tiene una coloración moteada-oscura, oscuro grisáceo a lo largo de la espina dorsal y en miembros, con una franja blanquecina que pasa por el pecho y de hombro a hombro en forma de collar; en los juveniles, la coloración es de un tono rojo oscuro con aspecto canoso, con una línea distintiva de color café oscuro que se extiende a lo largo de la espina dorsal y un manchón blanco tenue alrededor del cuello. Poseen glándulas odoríferas en el lomo, que secretan un líquido de olor almizclado el cual provee de un olor característico para la manada que es usado para marcar el territorio; este puede abarcar desde 300 a 3000 m² aproximadamente (Groves y Gubb, 1993; Ducrocq, 1994; Fernández-Silva *et al.*, 2003; Lamit y Hendrie, 2009).

Por otra parte, con base en las mismas características (vestigios dentales y craneales), Marshall (1984) propuso la división de los pecaríes en dos géneros, *Tayassu* y *Catagonus* hace aproximadamente 1.5 millones de años. Sin embargo, mediante un análisis filogenético usando el marcador molecular de ADN mitocondrial citocromo b, Theimer y Keim (1998) encontraron la asociación de pecarí de labio blanco *Tayassu pecari* y chacoano *Catagonus wagneri* en un clado con un tiempo estimado de divergencia de aproximadamente 1.7 - 2.3 millones de años y del pecari de collar *Tayassu tajacu* con respecto a estos dos últimos de aproximadamente 3.2 – 7.4 millones de años. Esto es fundamental ya que la divergencia de las tres especies de pecaríes en el continente americano apoya la hipótesis de que se llevó a cabo después de la llegada de un ancestro común a América del norte y de su expansión hacia la región de América del sur entre finales del Mioceno y principio del Pleistoceno (Marshall, 1984; Theimer y Keim, 1998; Góngora y Moran, 2005). Góngora y Moran (2005).

Existe también una gran controversia acerca de la clasificación del pecari a nivel de subespecies, Grubb y Groves (1993) describieron la clasificación del pecari de collar como dos grupos de especies distribuidas a lo largo del continente americano, para la parte norte y centro de América lo clasifican como “*Angulatus*”, mientras que para la parte sur del continente lo denominan “*Tajacu*”, además, de acuerdo con características morfológicas hacen una subclasificación muy ambigua en tres grupos que representan las 14 subespecies teóricamente reconocidas clasificándolas como:

1) De América del Sur a las subespecies de color gris con el collar blanquecino claramente marcado y la banda en negro a lo largo de la espina dorsal: *tajacu* Linnaeus, 1758, Brasil.

2) Negrusco con muy poca expresión en el color del collar y la espina dorsal: *patira* Kerr, 1792, Guayana Francesa (sinónimo: *macrocephalus* Antony, 1921, Guayana); *torvus* Bangs, 1898, Colombia; *crusnigrum* Bangs, 1902, Panama; *niger* Allen, 1913, Ecuador; *bangsi* Goldman, 1917, Panama (sinónimo: *modestus* Cabrera, 1917, Colombia). Hershkovitz (1963) dudo sobre si la mayoría de ellos deben estar dentro de *patira*

3) América central en color gris: *angulatus* Cope, 1889, Texas; *sonoriensis* Mearns, Sonora, Mexico; *nanus*, *humeralis*, *yucatanensys* y *crassus* Merriam, 1901, de Cozumel, Colima, Yucatán y Puebla respectivamente, todos en Mexico; *nelsoni* y *nigrescens* Goldman, 1926, de Chiapas, Mexico, y Onduras, respectivamente (*nigrescens* quizá representando integración con *patira-sensu lato*).

El pecari de collar se encuentra incluido en la categoría de Bajo Riesgo/casi amenazada según el CITES (Rodríguez, 1998); Bajo Riesgo por su amplia distribución geográfica y casi amenazado debido a sus características cinegéticas principalmente por la obtención de carne, el tráfico de su piel y a la destrucción de sus hábitats naturales con fines de expansión agropecuaria (UICN, 1993).

2.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden o no relacionar con un rasgo genético particular y se emplean de acuerdo a lo que se quiere analizar (Awise, 1994), sus aplicaciones son muy diversas, han sido empleados para reconocer la

diferenciación de individuos, análisis filogenéticos y sistemáticos, mapeo del genoma, cuantificación de la variación intra e interespecífica, mejoras genéticas, localización de genes de resistencia a enfermedades y análisis de paternidad entre individuos (Zavala et al., 2002).

Genéticamente podemos distinguir entre técnicas que permiten identificar *Codominancia*, es decir, aquellos que se presentan en el genoma como dos copias (de origen biparental por herencia mendeliana, nucleares) y permiten identificar todos los alelos que están presentes en un locus particular. Los marcadores *dominantes* (de origen uniparental, cloroplasto y mitocondria), se presentan en el genoma como copias únicas, sin embargo pueden tener diferentes niveles de polimorfismo en su secuencia (Awise, 1994; Vienne, 2003).

2.1.1 El ADN mitocondrial como marcador molecular

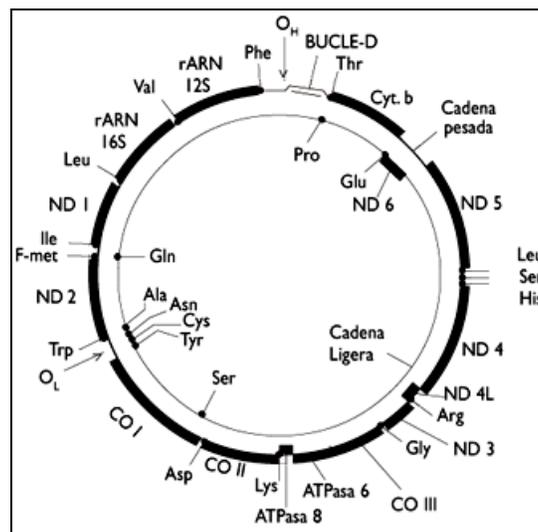


Figura 8. Estructura y organización de los genes en mtADN en mamíferos

Es una molécula circular de aproximadamente 16-18 Kb que codifica para 13 polipéptidos, son subunidades de proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, 22 ARN transferentes y 2 ARN ribosómicos (12S y 16S).

Contiene además 2 regiones no codificantes donde se localizan los orígenes de replicación: Region control (D-Loop) para la cadena pesada, y ori-L, para la cadena ligera. Permitiendo así, un mejor entendimiento de los patrones de variación genética, estudios poblacionales y en filogenia por características como:

- No experimenta procesos de recombinación, carece de ADN repetitivo (pseudogenes, transposones e intrones).
- Su alta tasa de variabilidad.
- Es de herencia materna (Fig. 8) (Fernandez-Silva *et al.* 2003).

El citocromo b (*cytb*), es uno de los marcadores moleculares mitocondriales más utilizados exitosamente para inferir relaciones filogenéticas entre distintos grupos taxonómicos, este contiene una tasa de evolución más lenta (10^{-8} /sitio/año), por lo que se utiliza frecuentemente para establecer relaciones entre subespecies, especies, generos y familias (Awise, 2000; Fabila-Blanco, 2010).

2.1.2 El ADN nuclear como marcador molecular, microsatélites.

Los microsatélites, son secuencias cortas de ADN que están formadas por repeticiones en tándem de una a seis pares de bases, estas son altamente polimórficas, co-dominantes, tienen herencia mendeliana simple, se encuentran amplia y uniformemente distribuidos a lo largo del genoma de los seres vivos, se localizan principalmente en regiones no codificantes del genoma y las más frecuentes son las repeticiones de los di-nucleótidos AC y TG. Debido a sus características permiten estimar los niveles de variabilidad genética y los niveles de consanguinidad, se segregan independientemente y son polimórficos, es decir que cada individuo tiene dos alelos por locus (uno de la madre y otro del padre) y es muy poco probable que dos individuos seleccionados

aleatoriamente compartan los mismo alelos para los microsatélites elegidos (golstein y Schölterer, 1999, Vienne, 2003; Bautista-Gómez 2008).

2.2. Estudios moleculares en pecarí

Los estudios moleculares realizados en las especies de pecarí se han enfocado principalmente en resolver las relaciones filogenéticas y filogeográficas. Con relación a lo anterior, se ha implementado el uso de los marcadores moleculares de los genes de ADN mitocondrial, Región control, Citoromo b y ARN ribosomal 12S, así como los genes nucleares *K-caseina*, tirotropina, tirocinasa y los elementos cortos nucleares interdispersos de cerdo, *PRE-1*, *P27* y *P642* en muestras de pecaríes en cautiverio, donados por Zoológicos de USA, México, Colombia, Costa Rica y Paraguay. Con las secuencias de estos genes, se estableció la existencia de dos géneros dentro de la familia Tayassuidae dentro de los cuales uno corresponde al pecari de collar y el otro al pecari chacoano/pecari labio blanco (Góngora y Moran 2005). En un estudio posterior enfocado en pecari de collar, se analizaron 31 muestras de poblaciones cautivas de cinco países del Norte, Centro y Sur de América. Los análisis de relaciones filogenéticas y filogeográficas con los marcadores moleculares mitocondriales mostraron una buena resolución y los marcadores nucleares fueron parcialmente informativos, ya que el análisis de máxima probabilidad de secuencias mitocondriales mostró que el pecarí de collar se agrupa en dos clados que representan a especímenes del Norte-Centro de América y América del sur. La distancia genética pareada de secuencias mitocondriales mostró una alta divergencia entre los dos clados (en un rango de 0.018 a 0.058), similar a la encontrada entre las dos subespecies del género, y fue más alta comparada con la observada dentro y entre las especies reconocidas para la familia Suidae (en un rango de 0.001 a 0.013) (Góngora *et al.*, 2006).

Uno de los resultados mostrados por el estudio de relaciones filogenéticas del pecari de collar fue que la variación de las secuencias de la región control y citocromo b mitocondriales es tan extrema que apoya la variación subespecífica y probablemente específica de sus poblaciones (Góngora *et al.*, 2006). A la fecha, en México no existen estudios genético moleculares de poblaciones naturales de pecari de collar que permitan establecer los niveles de diversidad, relación y estructura genética.

Los estudios enfocados en la variabilidad genética, son muy pocos. En 2002, Góngora y colaboradores hicieron un análisis con juegos de oligonucleótidos diseñados para un loci de 18 microsatélites de cerdo común, en seis especímenes de pecari de collar. Los resultados fueron favorables para 16 loci, y el 89% de estos sugieren que existe una baja divergencia de nucleótidos en los individuos muestreados, el locus microsatelite SW240 empleado en el estudio reveló la presencia de 3 alelos (95,101, 111) en cinco de los seis pecaríes analizados.

Recientemente Bautista-Gómez *et al.* (2008) reportaron la utilización de cinco marcadores microsatélites para la evaluación de una piara de 35 pecaríes obtenidos del área conservada "El Ocotal" en el Estado de México. Se encontró un valor de heterozigosidad media observada de 0.43, mientras que el valor de heterozigosidad esperada fue de 0.54, indicando así que existe una tasa elevada de homozigosis en la población. Esto queda sustentado con el hecho de que la población se encuentra en estado de semicautiverio por lo que los valores obtenidos indican un alto grado de congruencia con respecto a la disposición de su área de distribución y de diversificación, cabe señalar que la implementación de estos marcadores resultó eficiente, en algunos casos se observó la presencia de regiones no encontradas en el cerdo doméstico.

3. JUSTIFICACIÓN

El pecari de collar es una especie de mamífero silvestre de amplia distribución geográfica, existente en Michoacán, el estado se encuentra localizado en la transición Neártica-Neotropical lo que le permite contener un mayor número de especies de mamíferos además de las condiciones topográficas y de climas que se pueden observar en el mismo, actualmente se desconoce el nivel de diversidad genética de la especie. El proyecto en curso pretende genotipificar y analizar individuos de esta especie de la fauna silvestre de Michoacán para contar con datos que permitan establecer los niveles de diversidad genética, diversidad haplotípica y nucleotídica y las relaciones genéticas.

4. HIPÓTESIS

Las poblaciones de pecarí de collar del Bajo Balsas, Michoacán presenta una alta diversidad genética.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Realizar el análisis genético molecular del pecarí de collar presente en la región del Bajo Balsas, Michoacán, mediante la utilización de marcadores moleculares.

5.2. Objetivos Particulares

- Analizar la diversidad haplotípica, nucleotídica y relaciones genéticas de una población silvestre de *Pecari tajacu* del Bajo Balsas Michoacán, mediante el marcador de ADN mitocondrial citocromo b (*cytb*).
- Analizar la diversidad genética de la población silvestre de *Pecari tajacu* del Bajo Balsas Michoacán mediante marcadores tipo microsatélites.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se contó con una colección de 18 muestras biológicas de tejido, sangre, pelo y hueso de pecari de collar pertenecientes a la colección de muestras biológicas de fauna silvestre de Michoacán del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), UMSNH (Tabla 2). Adicionalmente se colectaron muestras de sangre de individuos de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) y de individuos de Pecari criado en cautiverio, para su utilización en los análisis como grupos externos (Tabla 2).

Las muestras de sangre (0.2 mL) y pelo, se recolectaron y depositaron en un vial de 2 mL que contenía 0.5 mL de solución para conservación (EDTA 250mM pH 8.0, NaCl 10mM)(Dutton, 1996). Las muestras de tejido muscular, se trasladaron en fragmentos del tamaño de un arroz a viales de 2 mL con solución de conservación con DMSO (EDTA 250 mM pH 8.0, DMSO 20%, NaCl hasta saturación). Las muestras de hueso se colectaron en bolsas de papel de estraza y se almacenaron en condiciones de sequedad a temperatura ambiente.

6.2. Extracción de ADN de sangre y tejido

Se empleó la metodología descrita por FitzSimmons et al. (1997), tomando una fracción de músculo del tamaño de un arroz o 15 µL de sangre, se incubó en 300 µL de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 10 mM, SDS 1% y proteinasa K 1mg/mL) durante aproximadamente 3 horas a 60 °C en baño María. Enseguida se adicionaron 150 µL de acetato de amonio (7.5 M) y se incubó durante 20 minutos a -70 °C. Posteriormente se sometió a centrifugación a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min (Sorvall Biofuge Pico, Kendro). El sobrenadante fue transferido a un

microtubo de 1.5 mL en condiciones de esterilidad, se adicionó 1 mL de etanol al 95% frío (-20 °C) y se incubó a -70 °C durante 20 minutos. A continuación se realizó una centrifugación a 13,000 rpm, por 20 min, se eliminó el sobrenadante por inversión y se enjuagó con etanol al 70%, frío (-20 °C). La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 µL de agua destilada, desionizada, estéril (H₂O_{dde}). Finalmente la muestra de ADN purificado se almacenó a 4°C.

Tabla 2 Colección de muestras del CMEB, colectadas de la región del bajo Balsas, Michoacán y muestras de *Sus scrofa* y pecari criado en cautiverio de la posta veterinaria UMSNH.

Muestra	Genero	Especie	Nombre común	Clave CMEB	Fecha	Tipo de muestra	Localidad	Coordenadas
36	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA36-1-A	07/04/07	Pelo	El Cofre, Arteaga	18°15'16.4" N 102°08'24.6" O
10	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA 10-5-A	03/04/07	Pelo	Los Limos, barranca blanca, Arteaga	18°17'38" N 102°29'36" O
5	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA3-7-A	03/04/07	Tejido	Los Limos, barranca blanca, Arteaga	18°17'38" N 102°30'43" O
3	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA3-8-A	03/04/07	Hueso	Los Limos, barranca blanca, Arteaga	18°17'38" N 102°30'26" O
4	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA3-8-A	03/04/07	Hueso	Los Limos, barranca blanca, Arteaga	18°08'30" N 102°31'12.3" O
5.1	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA5.1-B	03/04/08	Pelo, sangre, tejido	Encino barrido, Arteaga	18°48'48" N 102°03'16" O
6.1	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA6.1-D	03/04/08	Tejido	San pedro barajas, La Huacana	18°55'32.6" N 101°50'11.1" O
9.1	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA9.1-D	03/04/08	Pelo, sangre, tejido	Ejido Ichamio, La Huacana	-----
10.1	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA10.1-D	03/04/08	Tejido	Tres palos, La Huacana	
1	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA1-E	03/04/09	Pelo, tejido	Las joyas, La Huacana	18°48'40" N 102°06'13" O
4	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA4-E	03/04/09	Pelo	Barranca cañofistula, La Huacana	18°59'28" N 101°56'48" O
74	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA74-I	19/02/09	Pelo, sangre, tejido	La Bonetera, Lázaro Cárdenas	18°05'48" N 102°23'38" O
39	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA39-J	19/03/09	Pelo	Ichamio, La Huacana	18°56'38" N 101°51'48.6" O
40	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA40-J	19/03/09	Pelo-piel	Ichamio, La Huacana	18°56'45" N 101°51'1.3" O
8	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA8-K	12/04/09	Tejido	San José de los pinos, Arteaga	18°08'33.4" N 102°31'11.8" O
10	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	PETA10-K	19/05/09	Tejido, sangre	San José de los pinos, Arteaga	18°09'33" N 102°30'29.5" O
1-6	<i>Pecari</i>	<i>Tajacu</i>	pecari de collar	J1-J6	15/10/11	Sangre	Posta Veterinaria, UMSNH	19°46'10.48" N 101°08'51.9" O
1-6	<i>Sus</i>	<i>Scrofa</i>	Cerdo	SS1-SS6	15/10/11	Sangre	Posta Veterinaria, UMSNH	19°46'15" N 101°08'48" O

6.3. Extracción de ADN de hueso.

Se empleó la metodología con Chelex 100 Resin (100-200 mesh, BioRad 143-2832) (García *et al.* 2004), la cual consistió en el mezclado de la muestra de hueso (600 mg aprox.) pulverizado con 500 μ L de una solución de resina Chelex-100 al 10% y 5 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) (Sigma) en un microtubo de 1.5 mL. Se incubó durante una hora a 55°C en agitación continua y posteriormente durante 15 minutos a 100°C (para intensificar la desnaturalización de las proteínas). A continuación se sometió a agitación en vortex durante 10 segundos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos (Sorvall Biofuge Pico, Kendro) y se recuperó la fase acuosa donde se obtuvo el ADN.

6.4. Amplificación de mtADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del marcador del gen mitocondrial citocromo b (*cytb*) con un tamaño esperado de 1140 pb, inicialmente se utilizó el juego de oligonucleótidos reportados previamente para la tipificación molecular de ADN mitocondrial de ungulados (Tabla 3). Sin embargo, el oligonucleótido MACytb-R presentó problemas de inespecificidad provocando problemas de amplificación y secuenciación, por este motivo, con base en la secuencia de *cytb* obtenidas inicialmente, se diseñó el oligonucleótido específico PETACB-R (5'-GAGTTATCCTCCGTCTTTGGTT-3') para sustituir a MACytb-R en las amplificaciones.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *Cytb*.

LOCI	PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cytb</i>	MACytb-D MACytb-R	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3' 5'GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC3	1140 pb	Irwin y Col. (1991)

Para la amplificación del gen, cada mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 25 μ L en microtubos de 0.2 mL como sigue; De 50 a 150 ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), $MgCl_2$ 1.5 mM, 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) y H_2O_{dde} en un volumen total de 25 μ L. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 95°C, 5 minutos seguido de 30 ciclos; desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 45°C durante 2 minutos y extensión a 72°C durante 2 minutos; y una extensión final a 72°C, durante 8 minutos.

Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1% con el marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogene) a 80 voltios por 50 minutos, se visualizaron y registraron en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2000).

6.5. Secuenciación y análisis

La secuenciación del ADN en ambas cadenas se realizó por el método de dideoxy de Sanger *et al.* (1977), por la empresa comercial MacroGen USA. Para el análisis y la edición de secuencias se utilizó el software CROMAS 2.33 y BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0 para el alineamiento en el sistema Clustal W.

A partir de las secuencias se obtuvo el número de sitios polimórficos o segregantes (S), el índice de diversidad haplotípica (H), el índice de diversidad nucleotídica (π) con el

software DNAsP ver 5.10 (Librado y Rozas, 2009). La diversidad haplotípica (Hd) refleja la probabilidad de que dos secuencias sean diferentes. La diversidad nucleotídica (π) refleja la probabilidad de que dos nucleótidos sean diferentes. Los sitios segregantes (S) son sitios variables en un nucleótido dentro de una secuencia (Freeland, 2005).

Para el análisis de comparación se utilizaron 17 haplotipos de *cytb* de 31 individuos reportados en la base de datos BLAST de NCBI, las muestras son todas de especímenes en zoológicos, el nombre con el cual se designó cada haplotipo indica el país donde se encuentra ubicado el mismo, México (MEX), Estados Unidos (USA), Colombia (COL), Argentina (ARG) y Bolivia (BOL). Se incluyeron también dos muestras de individuos de los cuales se desconoce su procedencia (UNK). Como grupo externo se utilizó la secuencia reportada para *Sus scrofa* (Tabla 4).

Para establecer las relaciones históricas de parentesco entre los haplotipos de *cytb* se realizó un análisis de distancia con el método Neighbor Joining con 10,000 réplicas de Bootstrap en el programa PAUP (Análisis Filogenético Usando Parsimonia) versión 4.0b10 (Swofford, 2001).

El análisis de las relaciones entre los haplotipos se realizó mediante el método Median-joining con el software NETWORK versión 4.6.0.0., este método al construir las redes combina el algoritmo de Kruskal para encontrar árboles de expansión mínima favoreciendo conexiones cortas y el algoritmo heurístico de máxima parsimonia de Farris (MP), el cual agrega secuencialmente nuevas vértices llamadas vectores (Bandelt *et al.*, 1999).

Tabla 4. Haplotipos reportados en base de datos utilizados en los análisis de comparación.

Haplotipos <i>P. tajacu</i>	Número de acceso
MEX-1	Genbank DQ179066.1; Genbank DQ179064.1; Genbank DQ179065.1
MEX-2	Genbank DQ179070.1
MEX-3	Genbank DQ179062.1
MEX-4	Genbank DQ179060.1; Genbank DQ179058.1; Genbank DQ179059.1; Genbank DQ179061.1; Genbank DQ179063.1
USA-1	Genbank DQ179068.1; Genbank DQ179069.1; Genbank DQ179067.1
UNK-1	Genbank DQ179073.1; Genbank DQ179074.1
COL-1	Genbank DQ179079.1; Genbank DQ179078.1; Genbank DQ179076.1
COL-2	Genbank DQ179071.1
COL-3	Genbank DQ179072.1
COL-4	Genbank DQ179072.1
COL-5	Genbank DQ179056.1
COL-6	Genbank DQ179055.1
COL-9	Genbank DQ179075.1
COL-10	Genbank DQ179077.1
ARG-1	Genbank DQ179081.1; Genbank DQ179085.1; Genbank DQ179080.1
ARG-4	Genbank DQ179084.1
BOL-1	Genbank DQ179082.1; Genbank DQ179083.1
<i>Sus scrofa</i> .	Genbank GUI135710.1

6.6 Amplificación de loci microsatélites por PCR y detección.

Se utilizaron juegos de oligonucleótidos para cinco loci de microsatélites propuestos por Stahlberg *et al.* (1998) y por Gongora *et al.* (2002) (Tabla 5). Cada mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 25 μ L en microtubos de 0.2 mL como sigue; 25 a 75 ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), $MgCl_2$ 1.5 mM, 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) y H_2O_{dde} .

Las muestras se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 95°C, 5 minutos seguido de 35

ciclos; desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento 58-60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto; y una extensión final a 72°C, durante 10 minutos. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% con el marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001) a 80 voltios por 60 minutos, se visualizaron y registraron en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2000). Una vez confirmada la presencia de los fragmentos de ADN, el análisis de detección en GeneScan se realizó mediante los oligonucleótidos 5' de cada juego, marcados con el fluorocromo FAM-5 y utilizados en los ensayos de amplificación.

El análisis de detección se realizó como sigue; en un volumen total de 15 µL, se depositó una alícuota de 1-2 µL de cada amplificación, 12.5 µL de formamida HiDi y 0.5 µL del marcador de tamaño molecular Genescan-350ROX (Applied Biosystems). A continuación las muestras se analizaron en un AB 3100 *Avant* (Applied Biosystems).

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de loci microsatélites.

LOCI	OLIGONUCLEÓTIDOS	UNIDAD DE REPETIDOS	TAMAÑO	No. de alelos
S0097*	5'-GACCTATCTAATGTCATTATAGT-3' 5'-TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT-3'	(AC)10	208-244	2
IGF1**	5'-GCTTGGATGGACCATGTTG-3' 5'-CACTTGAGGGGCAAATGATT-3'	(AC)15	204, 210, 216	3
SW72**	5'-ATCAGAACAGTGCGCCGT-3' 5'-TTTGGAAATGGGGTGTTC-3'	(AC)18	2104, 122, 124	3
SW240**	5'-AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG-3' 5'-AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA-3'	(CT)3, (AC)9	95, 101, 111	3
SW857**	5'-TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC-3' 5'-GATCCTCCTCCAAATCCCAT-3'	(GT)13	138, 139, 141, 158	4

*Stahlberg et al. 1998, **Góngora et al. 2002

6.7. Análisis estadístico

Los tamaños de los alelos se determinaron mediante análisis con el software Peak Scanner v1.0. Se evaluó la riqueza alélica (por el método de rarefacción), diversidad genética, diferenciación a través de F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} y la significancia de los valores de F_{ST} mediante el software FSTAT (Goudet ver. 2.9.3.). Wright (1951) introdujo un método para partir el coeficiente de endogamia en una población subdividida (F_{IT}) entre el componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones (F_{IS}) y la subdivisión entre poblaciones (F_{ST}). Así, la endogamia total tendría un componente generado por la cruce entre parientes dentro de una población (F_{IS}) y otro por el balance entre deriva génica y flujo (F_{ST}). La definición original de Wright se basaba en el coeficiente de endogamia. Así, los estadísticos F pueden ser vistos como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión en relación con cualquier otro nivel superior: la correlación entre los genes de los individuos (I) y los de la población total (T) es representada por F_{IT} , que corresponde a la endogamia total. La correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación (S) es representada por F_{IS} , mientras que la correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población total está representada por F_{ST} (Excoffier 2001), que es igual a la probabilidad de que dos alelos idénticos por descendencia se combinen en un cigoto, o autocigosis. Los estadísticos F se relacionan entre sí de la siguiente manera:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

y por lo tanto

$$F_{ST} = F_{IT} - F_{IS} / (1 - F_{IS}).$$

Una medida que resulta fácil de calcular y conceptualmente útil es la Nm , que es la multiplicación del tamaño efectivo (N_e) por la tasa de migración (m), y nos habla del número de “migrantes efectivos”. Si Nm o el número de migrantes efectivos es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si Nm es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones, y si es mayor de 4 entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica.

No hay que olvidar que los valores calculados de Nm dependen directamente de nuestra estimación de la F_{st} y la estimación final de Nm reflejará los errores del sesgo que haya en la estimación de la F_{st} (Whitlock y McCauley 1999).

El análisis de población se realizó con el software GeneAIEx v6.3 para estimar variación genética, equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y distancia genética de Nei (1978).

6.8 Análisis de comparación

Se realizó el cálculo de similitud entre poblaciones mediante el uso del software Phylip v3.3 y Treeview v1 software de la 3a edición, utilizando como grupo externo a *S. scrofa*.

Se construyó un dendograma Neighbor-Joining resumiendo las relaciones de *P. tajacu* y pecarí criado en confinamiento, utilizando las distancias genéticas de Nei.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN.

A pesar de que se realizó la extracción de ADN de las 18 muestras biológicas de *Pecari tajacu* sólo se obtuvieron 13 con suficiente integridad y concentración para la obtención del gen *cytb* y las 18 para el caso de loci microsatélites (Fig. 9). También se extrajo el ADN de las seis muestras de *Sus scrofa* y seis de *Pecari* criado en confinamiento para ser utilizados como grupos externos en los análisis. Para la identificación de las muestras de ADN se les asignó un código utilizando las iniciales del nombre científico y su número de colecta en el catálogo de la Colección, como PETA1, PETA2, PETA3, etc. Para la identificación de las muestras de ADN de *S. scrofa* se asignó el código SS1-SS6 y para el Pecarí criado en confinamiento J1-J6.

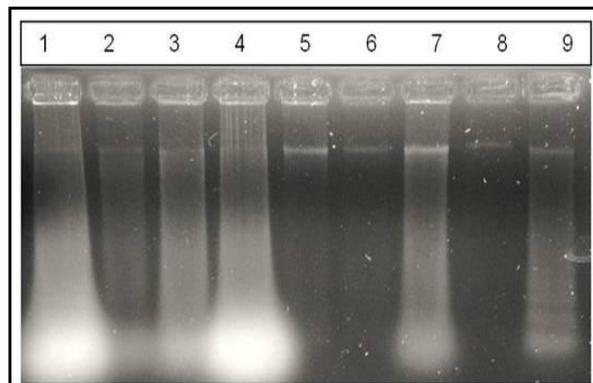


Figura 9. ADN purificado de muestras biológicas de sangre y tejido de *P. tajacu*. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril 1-9 PETA1-PETA9.

7.2. Amplificación del marcador *cytb*

Se realizó la amplificación de *cytb* a partir de las muestras de ADN obtenidas. En la figura 10 se muestra el producto de amplificación para algunas de las muestras con un tamaño esperado de 1140 pb. A continuación estos fragmentos se secuenciaron, sin embargo, solo se obtuvieron 13 secuencias, ya que el resto mostraron errores de secuenciación debido a problemas técnicos.

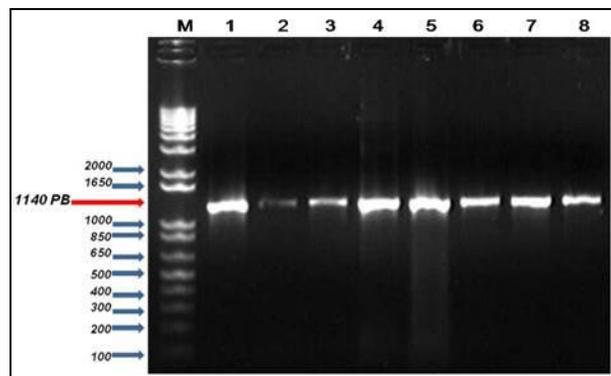


Figura 10. Productos de amplificación del marcador molecular *Cytb*. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con Syber safe. M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; carril 1 peta-1; carril 2 peta-5; carril 3 peta-6; carril 4 peta-8; carril 5 peta-9; carril 6 peta-10; carril 7 peta-4; carril 8 peta-7.

7.3 Alineamiento de secuencias

Se alinearon 13 secuencias de este estudio con 31 secuencias de *cytb* reportadas previamente (Tabla 4, Fig. 11), las cuales resultaron ser todas de individuos de zoológicos. Como resultado de la edición se obtuvo un total de 1180 pb, pero para fines comparativos sólo se utilizaron 1140 pb, ya que este fue el tamaño de las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI.

PETA13CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATATATTGGTACCGACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
PETA17CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATATATTGGTACCGACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
PETA18CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATATATTGGTACCGACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX1CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
USA5CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
USA4CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX8CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX7CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX4CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX6CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT
MEX5CB	AGGACAAATACTTTCTGAGGAGCAACAGTTATTACAAACCTTCATCAGCAATCCCATACATTGGTACCGATCTGGTAGAATGAATTTGAGGGGGATT

Figura 11. Alinamiento de secuencias en BioEdit. Haplotipos de pecari del Bajo Balsas y haplotipos reportados en NCBI

7.4. Diversidad genética

Se analizaron 1140 pb de *cytb* de 13 individuos y se encontraron seis haplotipos no reportados en la literatura correspondientes a los individuos analizados en este estudio (Tabla 6). Con respecto a las secuencias reportadas se encontró un total de 17 haplotipos (Tabla 4).

Tabla 6. Secuencias correspondientes a los haplotipos de *cytb* obtenidos en este estudio. En la parte superior de la tabla, se observa el número de nucleótido donde ocurre el cambio y en la parte lateral izquierda el número de haplotipo al que pertenece.

	SITIO	111	199	315	417	477	543	672	721	795	816	825	841	910	936	1059	1083	1101	1117	FRECUENCIA
1	PETA1CB	G	A	G	T	C	C	T	T	T	A	G	T	G	A	A	T	A	G	1
2	PETA2CB	C	5
3	PETA3CB	C	T	1
4	PETA4CB	A	G	A	C	T	T	C	.	C	G	A	C	A	G	G	C	G	.	4
5	PETA13CB	C	C	.	.	1
6	PETA18CB	C	C	G	.	1

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis de diversidad genética de haplotipos de Michoacán y los encontrados en la base de datos que incluyen haplotipos de zoológicos de USA, México, Colombia, Argentina y Bolivia. Los seis haplotipos de Michoacán mostraron un total de 18 sitios polimórficos, con una diversidad haplotípica alta (0.795) y una diversidad nucleotídica baja ($\pi=0.007$). El resultado del análisis de diferencias nucleotídicas (k) fue congruente con lo anterior, mostrando escasa diferencia nucleotídica en la población de Michoacán. El análisis de los haplotipos reportados en base de datos internacional mostró 122 sitios polimórficos en 17 haplotipos, con una diversidad haplotípica alta (0.948) comparable con la encontrada en los haplotipos de Michoacán, y una diversidad nucleotídica ($\pi=0.037$) y (k) mayores a las de Michoacán.

Tabla 7. Datos obtenidos del análisis de diversidad. Haplotípos de los individuos analizados de *P. tajacu* y los reportados en base de datos internacional.

Población	n ¹	H ²	S ³	Pi ⁴	Hd ⁵	π ⁶	k ⁷
Michoacán (Silvestres)	13	6	18	17	0.795	0.00717	8.179
GeneBank (zoológico)	31	17	122	116	0.948	0.03734	42.572
Totales	44	23	126*				

¹Número de individuos, ²Número de haplotipos, ³Sitios polimórficos, ⁴Sitios parsimoniosos, ⁵Diversidad haplotípica, ⁶Diversidad nucleotídica, ⁷Diferencias nucleotídicas. *Número de total de sitios polimórficos,

7.5. Análisis de distancia genética

Posterior a la selección del modelo evolutivo mediante la implementación del programa ModelTest v.0.1.1 bajo el criterio de Akaike (AIC), se construyó un árbol de distancias mediante el método Neighbor-Joining con el modelo de sustitución Tamura-Nei (1993) (TrN+I+G; freqA = 0.3211, freqC = 0.3079, freqG = 0.1236, freqT = 0.2474) con el

parámetro $\gamma = 0.4212$. Se utilizó un total de 17 haplotipos reportados en GenBank y los obtenidos en este estudio (Fig. 12). El análisis de distancia genética mostró la separación de los haplotipos en dos clados basales principales, un clado (A1) que incluyó a los individuos del norteamérica y algunos de Colombia, con 92% de soporte bootstrap, y un segundo clado (A2) que incluyó haplotipos de sudamérica, Colombia, Argentina y Bolivia con 98% de soporte bootstrap. Se puede observar la separación de los haplotipos de México en dos clados (B1 y B2) (96% de soporte bootstrap). El clado B1 muestra a la mayoría de los haplotipos de Michoacán (cinco de seis) (64-65% soporte bootstrap) y un grupo separado de haplotipos de México. El clado B2 incluyó al haplotipo de USA, algunos de México y uno de Michoacán.

Los clados B3 y B4 que incluyó haplotipos de Colombia con 99 y 100% de soporte bootstrap indicaron mayor relación con haplotipos de norteamérica.

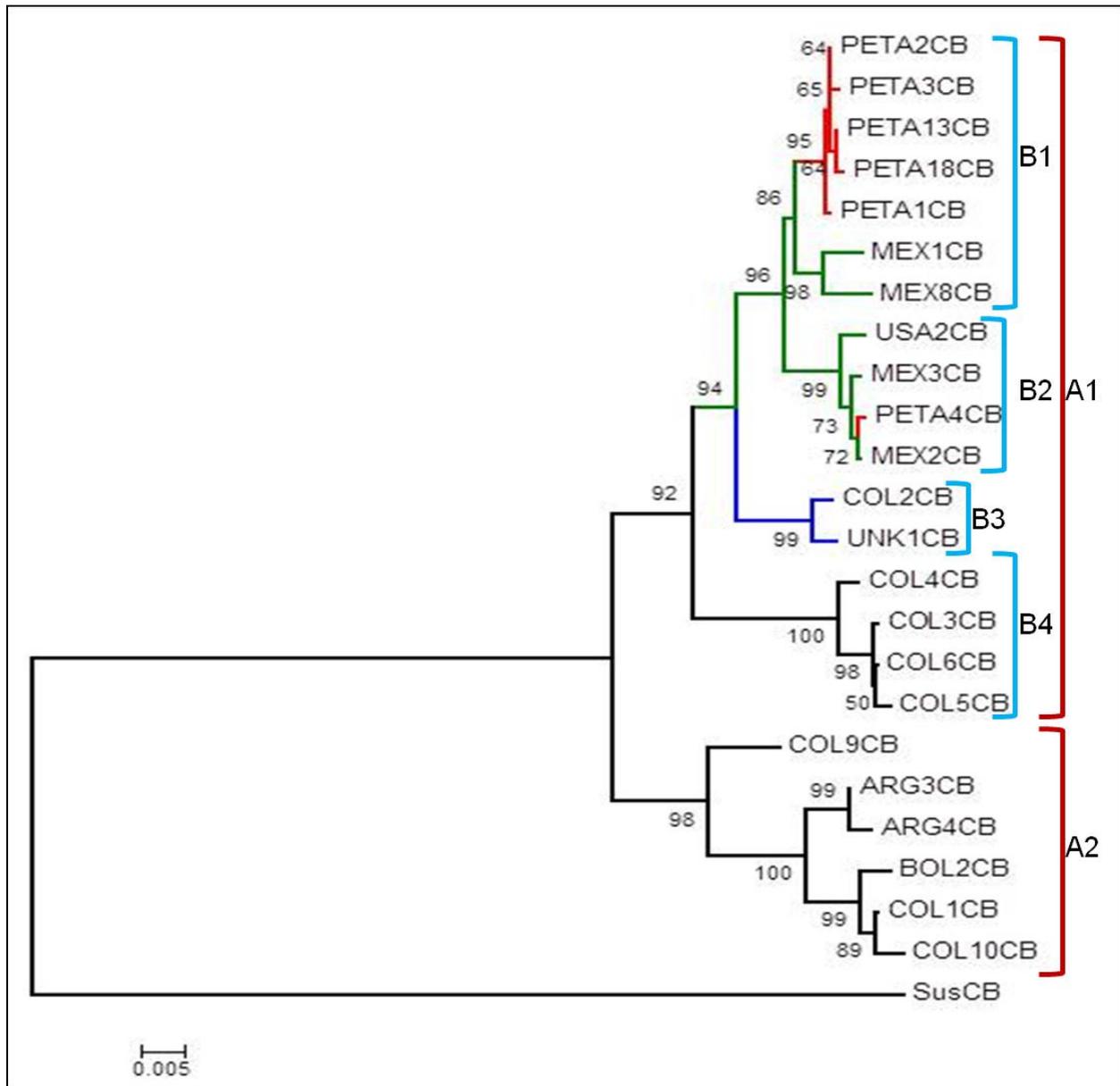


Figura 12. Árbol de distancia por el método Neighbor Joining con el modelo de sustitución de Tamura –Nei (1993). Relación de 23 haplotipos de *Pecari tajacu*. generado con 10,000 replicas de bootstrap. Las ramificaciones en rojo muestran los haplotipos de michoacan considerados dentro de la población de norteamerica, en verde los haplotipos de Norteamérica, en azul se indica una asociación entre haplotipos de procedencia desconocida y uno de colombia. El resto de los haplotipos son de procedencia sudamericana y como grupo externo se utilizó a *Sus scrofa*.

En la figura 13 se presenta la red de haplotipos generada por el programa network con 17 haplotipos detectados en las secuencias reportadas en base de datos y los seis

obtenidos en este estudio. Se puede observar una asociación entre los haplotipos de Argentina y Bolivia, y que los haplotipos de Colombia mostraron parafilia. De manera similar al resultado del análisis de distancia, un haplotipo de Colombia se separó del grupo y mostró relación con el haplotipo desconocido y con el haplotipo H2 de Michoacán. Los haplotipos de México se separaron en tres grupos, uno de los cuales mostró relación con un haplotipo de Colombia. Entre los haplotipos de la población de Michoacán se obtuvieron dos dominantes, uno de ellos (H-2) relacionado con la mayoría de los haplotipos michoacanos, y un segundo (H-4) relacionado con haplotipos de México y de USA.

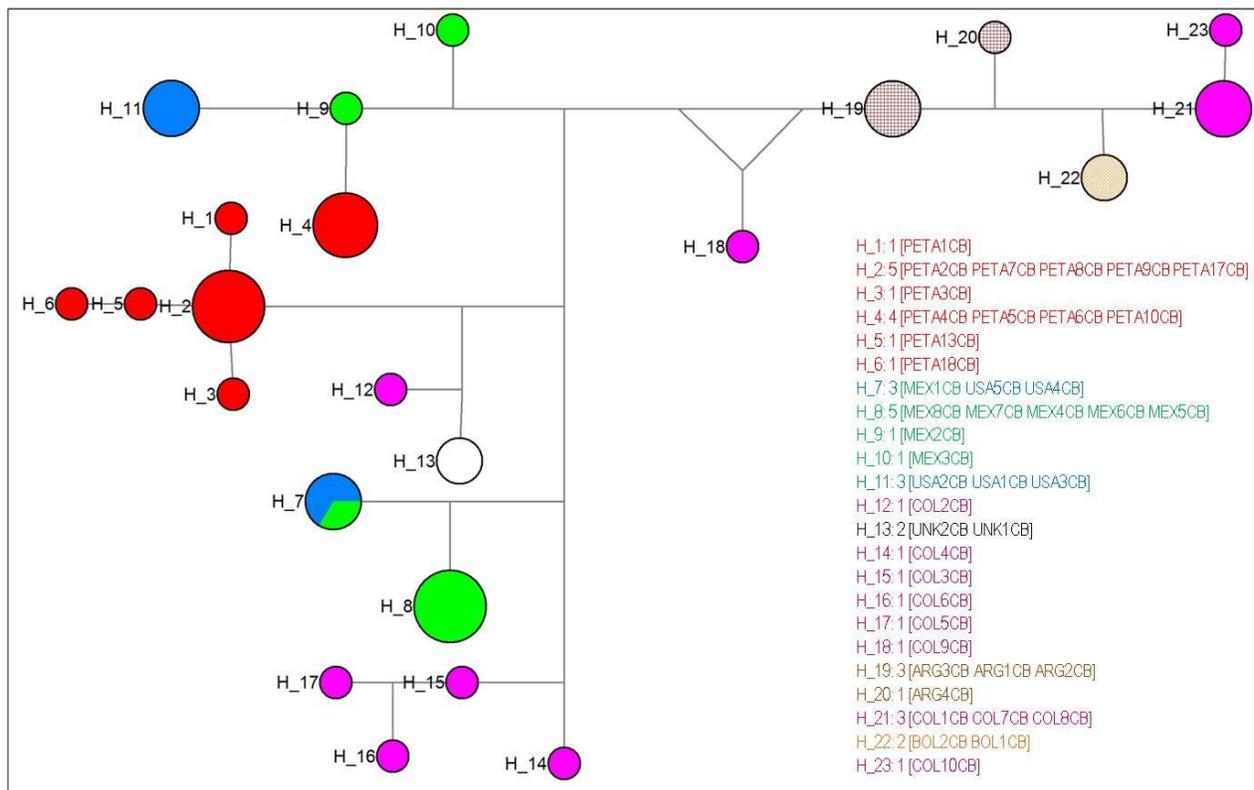


Figura 13. Red de haplotipos de *P. tajacu* de la población de Michoacán y de zoológicos de América. Relaciones de 17 haplotipos encontrados en 44 individuos de *P. tajacu*. Cada círculo representa un haplotipo y en la columna de la derecha se indica el haplotipo en color correspondiente y el número de individuos por cada uno.

7.6. Amplificación de marcadores moleculares, microsatélites

Se realizó un ensayo preeliminar de amplificación con una muestra de ADN de *P. tajacu*, el cual mostró productos de amplificación para los loci IGF1, SOO97, SW72, SW240 y SW857 (Fig. 14). A continuación se realizó la amplificación de los cinco loci microsatélites con el ADN de las 18 muestras de la población de *P. tajacu*, con las muestras de *S. scrofa* y las de Pecarí criado en confinamiento (Tabla 2). En la figura 15 se muestran los productos de amplificación de aproximadamente 100 pb, obtenidos para el locus SW240 de algunas de las muestras de la población de *P. tajacu* (PETA) y algunos individuos de Pecarí criado en confinamiento (J).

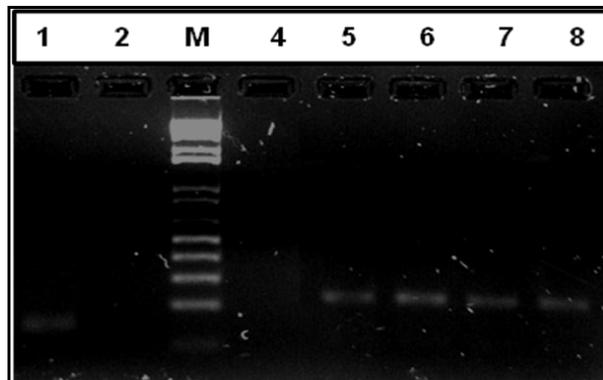


Figura 14. Producto de amplificación de cinco loci microsatélites. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 locus IGF1 a 58 °C; carril 2 locus IGF1 a 59°C; carril 4 locus S0097 a 58°C ; carril 5 locus S0097 a 60°C; carril 6 locus SW72 a 60°C; carril 7 locus SW240 a 60°C; carril 8 locus SW857 a 60°C.

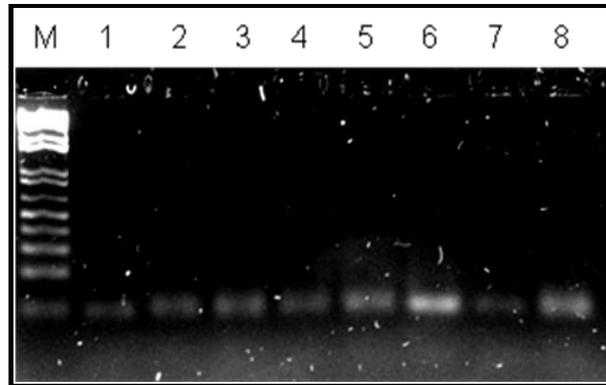


Figura 15. Productos de amplificación para el locus SW240. Muestras de ADN de *P. tajacu* y Pecarí criado en confinamiento. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 PETA1; carril 2 PETA2; carril 4 PETA3; carril 5 PETA5; carril 6 J1; carril 7 J2; carril 8 J3.

En la figura 16 se muestran los productos de amplificación de aproximadamente 250 pb, obtenidos para el locus S0097 de varias de las muestras de *P. tajacu*, *S. scrofa* (SS) y pecarí criado en confinamiento.

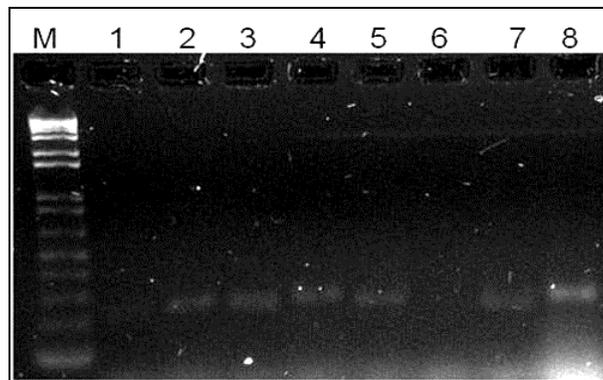


Figura 16. Producto de amplificación del marcador microsatelite S0097. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 PETA3; carril 2 PETA4; carril 3 PETA6; carril 4 PETA8; carril 5 J5; carril 6 J6; carril 7 SS1; carril 8 SS2

En la figura 17 se muestran algunos de los productos de amplificación de aproximadamente 150 pb, obtenidos para el locus SW857 de las muestras de *P. tajacu*, *Sus scrofa* y pecarí criado en confinamiento con un tamaño aproximado.

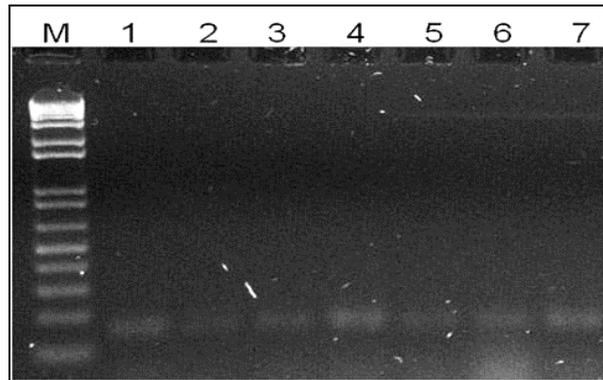


Figura 17. Producto de amplificación del marcador microsatelite SW857. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 PETA1; carril 2 PETA3; carril 3 PETA5; carril 4 J4; carril 5 J5; carril 6 J6; carril 7 SS1.

En la Figura 18 se muestra el producto de amplificación de aproximadamente 100 pb, de algunas muestras de *P. tajacu*, *Sus Scrofa* y Pecari criado en confinamiento con el locus IGF1. En la Figura 19 se muestran resultados de amplificación de aproximadamente 100 pb con el locus SW72.

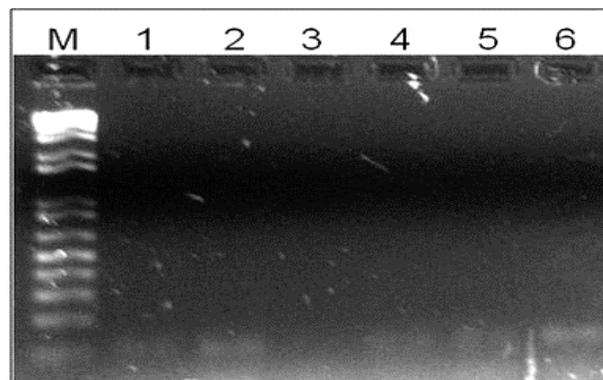


Figura 18. Producto de amplificación del marcador microsatelite IGF1. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 PETA1; carril 2 PETA2; carril 3 PETA3; carril 4 J1; carril 5 J5; carril 6 J6; carril 7 SS1; carril 8 SS2.

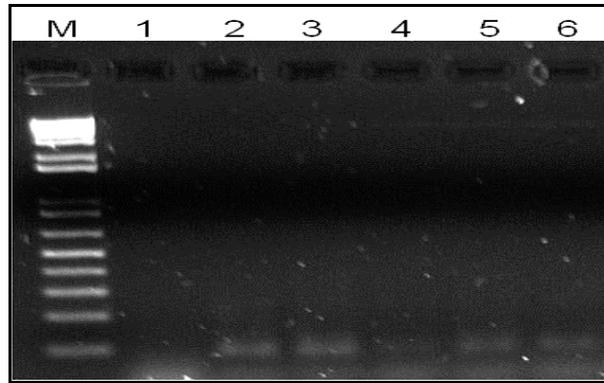


Figura 19. Producto de amplificación del marcador microsatelite SW72. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñido con Syber safe. Carril M, marcador de tamaño molecular 1kb Plus DNA Ladder; carril 1 PETA13; carril 2 PETA14; carril 3 PETA15; carril 4 J4; carril 5 J5; carril 6 J6; carril 7 SS1; carril 8 SS2.

7.7 Análisis de microsatélites

7.7.1 Diversidad genética

Se detectaron un total de 41 alelos para los 5 loci en las tres poblaciones analizadas.

En la tabla 8 se muestran los tamaños de los alelos obtenidos por locus, así como la frecuencia de cada uno de ellos dentro de las poblaciones analizadas.

Tabla 8. Alelos obtenidos en cada locus microsatelite y sus frecuencias en las poblaciones analizadas.

LOCUS	ALELOS	PETA (n=18)	J(n=6)	SS(n=6)
IGF1	Pb			
	221	0.0	0.250	0.0
	222	0.0	0.250	0.0
	223	0.0	0.250	0.0
	224	0.0	0.250	0.083
	230	0.0	0.0	0.500
	232	0.0	0.0	0.167
	234	0.056	0.0	0.250
	236	0.306	0.0	0.0
	238	0.333	0.0	0.0
	240	0.306	0.0	0.0
TOTAL	10	1.0	1.0	1.0

Tabla 8. Continuación

LOCUS	ALELOS	PETA (n=18)	J(n=6)	SS(n=6)
S0097	Pb			
	204	0.0	0.0	0.500
	212	0.028	0.0	0.0
	214	0.028	0.0	0.0
	216	0.0	0.0	0.083
	218	0.0	0.0	0.333
	228	0.194	0.0	0.0
	232	0.556	0.000	0.0
	238	0.0	0.500	0.083
	240	0.083	0.500	0.0
	244	0.056	0.0	0.0
	248	0.056	0.0	0.0
TOTAL	11	1.0	1.0	1.0
SW72	Pb			
	96	0.0	0.0	0.500
	104	0.500	0.333	0.000
	106	0.500	0.667	0.000
	114	0.0	0.0	0.500
TOTAL	4	1.0	1.0	1.0
SW240	Pb			
	90	0.139	0.167	0.083
	92	0.111	0.417	0.0
	94	0.250	0.083	0.583
	102	0.389	0.0	0.0
	104	0.111	0.0	0.0
	108	0.0	0.333	0.0
	110	0.0	0.0	0.083
	112	0.0	0.0	0.250
TOTAL	8	1.0	1.0	1.0
SW857	Pb			
	136	0.111	0.083	0.0
	138	0.389	0.083	0.083
	140	0.111	0.0	0.083
	142	0.028	0.0	0.0
	144	0.194	0.250	0.417
	146	0.139	0.250	0.167
	152	0.028	0.250	0.0
	154	0.0	0.083	0.250
TOTAL	8	1.0	1.0	1.0

Se calculó la riqueza alélica y la diversidad genética (Tabla 9) con respecto al número de alelos observados. Todos los locus presentaron mayor número de alelos que el reportado (Stahlberg *et al.*, 1998; Góngora *et al.*, 2002). El valor promedio por locus fue de 8.2 con un rango de cuatro a 11 alelos (SW72 y S0097, respectivamente).

El promedio de H_o para los loci a través de la población de *P. tajacu* fue de 0.689 y el de H_e de 0.669 (Tabla 10). Los pecaríes criados en confinamiento mostraron un valor promedio de H_o de 0.800 y H_e de 0.633. Para la población de *S. scrofa* el valor promedio de H_o fue de 0.867 y el de H_e de 0.617.

Tabla 9. Número de alelos observados, riqueza alélica y diversidad genética por locus.

Locus	Alelos observados	Riqueza alélica	Diversidad genética
IGF1	10	3.40	0.701
S0097	11	2.48	0.588
SW72	4	1.93	0.481
SW240	8	3.14	0.669
SW857	8	4.22	0.760
Promedio	8.20	3.03	0.640

El valor de P para F_{is} entre las muestras fue -0.251

Tabla 10. Polimorfismo de 5 loci microsatélites. Población de *P. tajacu* (PETA), pecarí criado en cautiverio (J) y *S. scrofa* (SS).

Loci	RAL ¹ (pb)	Ra ² Na ³			EFA ⁴			Ho ⁵			He ⁶			HWE ⁷		
					PETA	J	SS	PETA	J	SS	PETA	J	SS	PETA	J	SS
IGF1	221-240	3	10	3.323	4.000	2.880	0.500	0.667	1.000	0.699	0.750	0.653	0.005**	0.049*	0.432 ^{ns}	
S0097	204-248	2	11	2.769	2.000	2.667	0.278	1.000	0.833	0.639	0.500	0.625	0.000***	0.014*	0.654 ^{ns}	
SW72	96-114	3	4	2.000	1.800	2.000	1.000	0.667	0.667	0.500	0.444	0.500	0.000***	0.221 ^{ns}	0.414 ^{ns}	
SW240	90-112	3	8	3.880	3.130	2.400	0.778	0.833	0.833	0.742	0.681	0.583	0.011*	0.531 ^{ns}	0.801 ^{ns}	
SW857	136-154	4	8	4.263	4.800	3.600	0.889	0.833	1.000	0.763	0.792	0.722	0.031*	0.055 ^{ns}	0.877 ^{ns}	
Promedio	-		8.20	3.247	3.146	2.701	0.689	0.800	0.867	0.669	0.633	0.617	0.009	0.174	0.636	

¹Rango de alelos, ²Número de alelos previamente reportados ³Número de alelos por locus, a través de la población, ⁴Número efectivo de alelos por población por locus, ⁵Heterozigosidad observada; promedio a través de los loci, ⁶Heterozigosidad esperada; promedio a través de los loci, ⁷Número de loci desviados del equilibrio de Hardy-Weinberg (ns=no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

El promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) dentro de la población de *P. tajacu* a través de los loci fue bajo (-0.030), sin embargo, el de la población de pecarí criado en confinamiento y de la población de *S. scrofa* mostraron valores más bajos que *P. tajacu* (-0.263, y -0.405 respectivamente) (Tabla 11). La diferenciación genética (F_{ST}) de la población de *P. tajacu* a través de los loci fué la más baja (0.183), y las poblaciones de pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa* mostraron valores superiores al de *P. tajacu* (0.226 y 0.247 respectivamente) (Tabla 11).

El promedio de alelos por locus fue mayor para la población de *P. tajacu* (5.00), y el de pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa* fue menor y parecido entre ambas poblaciones (3.60 y 3.80 respectivamente).

En promedio, entre los 18 individuos de la población de *P. tajacu* de Michoacan, se encontró 5 alelos por locus a través de los loci; de un total de 25 alelos (Tabla 11). De estos 25, se detectaron 12 alelos privados (48%) distribuidos a través de los loci. La población de *S. scrofa* presentó 10 alelos privados (52.63%) de un total de 19, y la población de pecarí criado en cautiverio presentó solo cuatro alelos privados de un total de 18 (Tabla 11).

Tabla 11. Polimorfismo de las tres poblaciones analizadas.

Población	n ¹	NAT ²	Na ³	Pa ⁴	F_{IS} ⁵	F_{ST} ⁶	F_{IT} ⁷
<i>Pecari tajacu</i>	18	25	5	12	-0.030	0.183	0.158
Pecari criado en confinamiento	6	18	3.6	4	-0.263	0.226	0.023
<i>Sus scrofa</i>	6	19	3.8	10	-0.405	0.247	-0.059
Promedio	-	20.66	4.13	8.66	-0.233	0.219	0.041

¹Tamaño de muestra, ²Número de alelos totales, ³Número de alelos por locus; promedio a través de los loci, ⁴Número de alelos privados, ⁵Coeficiente de endogamia; promedio a través de los loci, ⁶Coeficiente de endogamia debido a la diferenciación en subpoblaciones, ⁷Coeficiente de endogamia entre las poblaciones.

7.7.2. Equilibrio de Hardy Weinberg

A través de los loci la población de *P. tajacu* mostró una desviación de HW baja (0.009), la población de pecarí criado en confinamiento tuvo una desviación alta (0.174), y la población de *S. scrofa* mostró el valor de desviación más alto (0.646). Tres loci presentaron desviación de HW en las tres poblaciones IGF1, SW240 y SW857 (Tabla 10).

7.7.3. Diferenciación genética

Los valores pareados de F_{ST} para diferenciación entre poblaciones, mostraron diferencia moderada entre *P. tajacu* y pecarí criado en confinamiento (0.124), y entre *P. tajacu* y *S. scrofa* (0.187) y la diferencia más alta entre pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa* (0.205) (Tabla 12). Los valores de distancia genética (Nei 1973) fueron congruentes con los de diferenciación genética. La distancia genética más alta fue entre *S. scrofa* y pecarí criado en confinamiento (1.837), seguida por la detectada entre *P. tajacu* y *S. scrofa* (1.725) y la detectada entre *P. tajacu* y pecarí criado en confinamiento (0.824).

Tabla 12. Diferenciación genética pareada (F_{ST}) (sobre la diagonal) y distancia genética pareada de Nei (bajo la diagonal) de las poblaciones analizadas.

	PETA	J	SS
PETA	-	0.124	0.187
J	0.824	-	0.205
SS	1.725	1.837	-

El dendograma de Neighbor-Joining (Fig. 20) para las poblaciones de pecari analizadas (natural y confinado) mostró que existe distancia entre estos dos, sin embargo, la distancia mayor se ve reflejada con relación a *Sus scrofa*, asumiendo con esto que muy probablemente se trata de una hibridación de pecari. Además, podemos ver de forma muy marcada la separación de los individuos con relación a los grupos, esto corrobora los resultados de distancia genética entre las poblaciones.

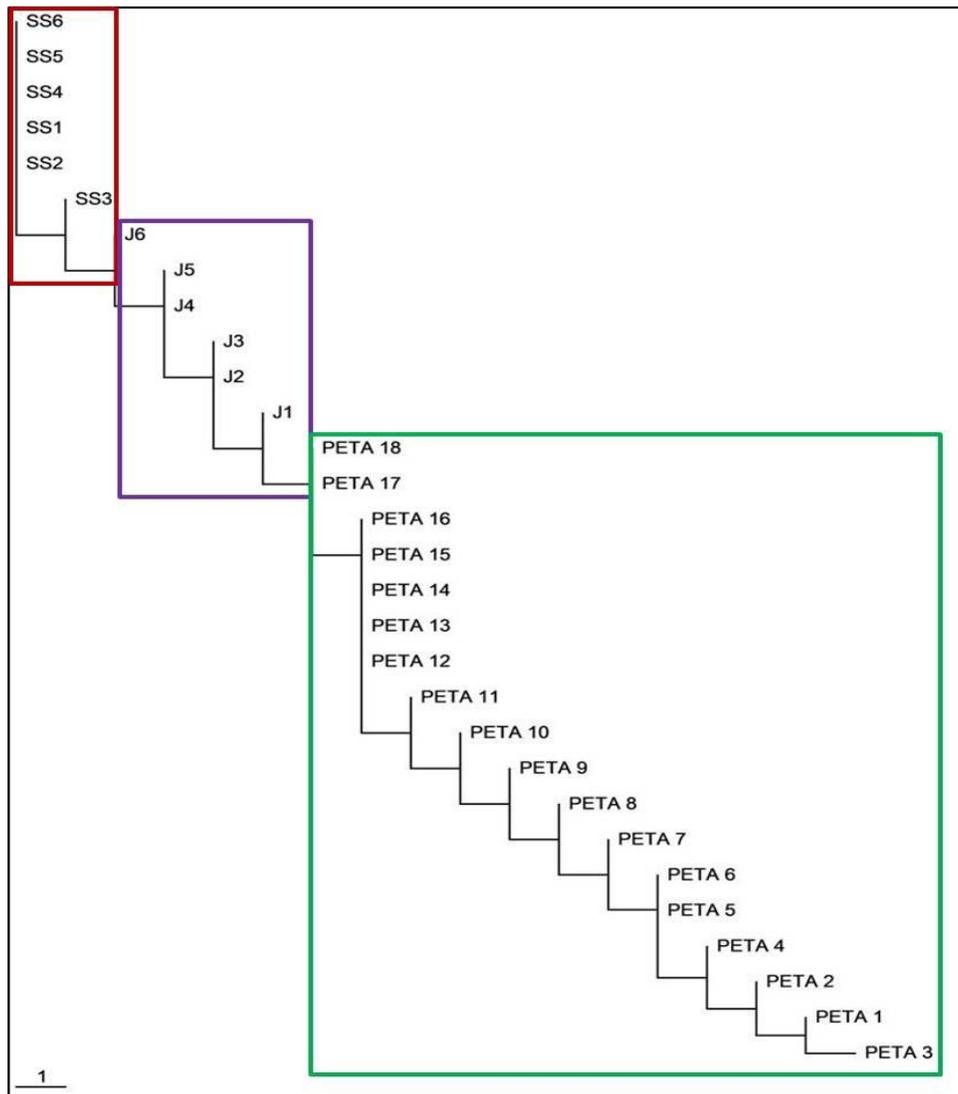


Figura 20. Dendrograma de distancia construido por el método de Neighbor-Joining. En el recuadro en rojo se presenta la población de *Sus scrofa*, en morado la población de pecaríes criados en confinamiento y en verde la población de pecaríes tajacu de Michoacán.

8. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de individuos de *Pecari tajacu* de una población silvestre proveniente del Bajo Balsas y otras localidades de Michoacán, utilizando el marcador de ADN mitocondrial *cytb* y cinco loci microsatélites. El marcador mitocondrial *cytb* se ha utilizado previamente en algunos estudios sobre las relaciones genéticas de las especies de *P. tajacu* en muestras obtenidas de zoológicos en norte y sudamérica (Gongora y Moran 2005), y los loci microsatélites se han empleado en el estudio de una población confinada de *P. tajacu* (Bautista Gómez 2008).

8.1 Diversidad genética con *Cytb*

Los resultados obtenidos del análisis de diversidad genética mostraron una diversidad haplotípica alta (0.795) y una diversidad nucleotídica baja (0.00717) para la población de *P. tajacu* de Michoacán comparada con la de individuos de zoológicos a lo largo del continente (0.948 y 0.03734), analizados previamente por Gongora y Moran (2005). Estos datos son congruentes considerando que los individuos de Michoacán corresponden a una población muestreada de una región geográfica específica, mientras que los individuos de zoológicos reportados en GenBank provienen de diferentes poblaciones de diferentes regiones geográficas, lo cual explica una diversidad genética alta comparada. Por otro lado, dado que el tamaño de la población de Michoacán es pequeño, es probable que el incremento de muestras pueda permitir la identificación de nuevos haplotipos y con ello el incremento de los valores de diversidad.

La historia demográfica de una población se refleja por la combinación de los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, dando cuatro tipos de escenarios (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000). Uno de estos escenarios se observa en la población de *P. tajacu* de Michoacán, la diversidad haplotípica alta (0.795), indica que la población tiene un rápido crecimiento por la retención de mutaciones y la diversidad nucleotídica baja (0.00717), muestra una coalescencia reciente, esto quizá como un reflejo de una expansión rápida seguida de un aislamiento en los refugios del Pleistoceno. Esta teoría, explica de alguna manera la gran diversidad de las especies en los ecosistemas tropicales por efecto de las fluctuaciones climáticas (Haffer, 1982). Las poblaciones dependientes de bosques tropicales llegaron a ser aisladas a partir de su primer hábitat fragmentado durante el máximo glacial (época seca en la zona tropical). Estas zonas de bosques habrían constituido los diferentes refugios para las especies causando así su división en poblaciones. Dicho aislamiento es un mecanismo que puede conducir a especiación, es decir, la evolución de una nueva especie. La alternancia de períodos secos y húmedos aumentaría la necesidad de los animales de desarrollar nuevas adaptaciones.

8.2 Análisis de distancia genética con *Cytb*

En el árbol de distancia genética la separación basal en dos grupos corroboró los resultados obtenidos por Gongora et al. (2006) quienes en un análisis realizado con marcadores nucleares propusieron la separación de *P. tajacu* en dos grandes grupos, a los cuales designaron como de sudamérica y centroamérica. Sin embargo, se observa que el grupo señalado como de centroamérica, en realidad incluye individuos de sudamérica (Colombia) y norteamérica, por lo cual en este estudio proponemos que un grupo corresponde a norteamérica y otro a sudamérica.

Por otro lado, en el árbol de distancia genética, la mayoría de los individuos de Michoacán se agruparon en una clada de manera congruente con su procedencia de una sola región geográfica. Sin embargo un haplotipo de Michoacán (n=4) se agrupó con haplotipos de México y no con los de Michoacán, sugiriendo además por su procedencia geográfica (La Huacana, Mich.) que estos individuos corresponden a un grupo genético diferente al que incluye a la mayoría de los haplotipos de Michoacán. El análisis de la relación de haplotipos, mostró congruencia con los resultados anteriores, donde los individuos de Michoacán correspondieron a dos grupos genéticos. Uno de estos grupos es monofilético con cinco haplotipos (n=9) y el segundo grupo con un haplotipo (n=4) está relacionado a dos haplotipos de México y dos de USA.

8.3 Análisis con cinco loci microsatélites

8.3.1 Diversidad genética

Como grupo, la población de *P. tajacu* de Michoacán mostró un nivel moderado de diversidad. Para los loci utilizados en el análisis de las poblaciones de *P. tajacu*, pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa*, la riqueza alélica fue baja (3.03) pero la diversidad genética fue alta (0.640). El valor de heterozigosidad mostrado por la población de *P. tajacu* de Michoacán fue alto (0.689) comparado con el observado en borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) (0.4761) de Sonora, México, en un análisis con cinco loci microsatélites (Abad Zavaleta, 2006). Sin embargo, los valores presentados por la población de pecarí criado en confinamiento y la población de *S. scrofa* fueron inesperadamente superiores (0.800 y 0.867 respectivamente), considerando que los individuos de ambas poblaciones han sufrido selección en diferente nivel, y por ello se espera que presenten una H_o menor a la de la población natural de *P. tajacu* de

Michoacán. Una explicación a este resultado es probablemente el tamaño de las poblaciones de pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa* (n=6 cada una), por lo cual, para estudios futuros se debe considerar la utilización de poblaciones de tamaño similar ó mayor a la de *P. tajacu* silvestre.

Como se esperaba, el valor de F_{IS} de *P. tajacu* de Michoacán a través de los loci, fue bajo, sin embargo, los valores de pecarí criado en confinamiento y *S. scrofa*, fueron menores que el de *P. tajacu* de Michoacán, sugiriendo de nuevo un problema con el tamaño de población utilizado. Los valores de F_{ST} a través de los loci indicaron que aproximadamente el 18% de la variación genética total de la población de *P. tajacu* de Michoacán se explica por diferencias de la población y 82% corresponde a diferencias dentro de la población.

El valor de F_{IS} de la población de *P. tajacu* de Michoacán fue consistente con el nivel de heterozigosidad observado.

8.3.2 Equilibrio de Hardy Weinberg

Se espera desviación de HW si las poblaciones individuales estan estructuradas en subpoblaciones aisladas unas de las otras, o si a ocurrido endogamia en la población total. El bajo nivel de HWE encontrado en la población de *P. tajacu* de Michoacán indica una estructura en subpoblaciones. Este nivel de HWE también correlacionó con el promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) y deficiencia de heterozigotos debido a la diferenciación en subpoblaciones (F_{ST}).

El moderado nivel de HWE encontrado en la población de pecarí criado en confinamiento sugiere endogamia considerando su origen. Sin embargo, este nivel de HWE no correlacionó con el promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) que fue

negativo, pero si con la deficiencia de heterocigotos debido a endogamia (F_{ST}). Ya que esta población de pecarí mostró un fenotipo parecido al pecarí labio blanco y un tamaño parecido al de *S. scrofa*, los resultados sugieren un proceso de hibridación entre ambas especies.

El alto nivel de HWE mostrado por *S. scrofa* indica endogamia, lo cual es congruente con el proceso de selección en una especie domesticada. Pero el nivel de HWE no correlacionó con el promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) que fue negativo, pero si con la deficiencia de heterocigotos debido a endogamia (F_{ST}).

8.3.3 Alelos privados

Los nuevos alelos en los loci de microsatélites son el producto de procesos de mutación y un número alto de alelos privados en loci de microsatélites específicos puede indicar que están situados en una región genómica altamente mutagénica, o que vienen de sitios heterocigotos que tienden a mutar más frecuentemente que los sitios homocigotos (Li et al., 2002). La población de *P. tajacu* de Michoacán mostró un número alto de alelos privados (12 de 25) de los cuales seis correspondieron a un locus, y los otros seis se distribuyeron en tres loci, lo cual se puede relacionar con el nivel de heterocigosidad observada y es congruente con la idea de que la población tuvo un rápido crecimiento con retención de mutaciones. La población de *S. scrofa* también mostró un número alto de alelos privados (10 de 19), que se distribuyeron en los cinco loci. En contraste, la población de pecarí criado en confinamiento mostró un número bajo de alelos privados (4 de 18), de los cuales tres correspondieron a un locus y uno a otro locus.

8.3.4 Diferenciación genética

El valor de F_{ST} (0.183) de la población de *P. tajacu* de Michoacán, indica una divergencia moderada de la población, sugiriendo un origen en una población grande.

El valor de F_{IS} (-0.030) indica alta heterozigosidad dentro de la población.

La alta distancia genética entre *P. tajacu* de Michoacán y *S. scrofa* (1.725), muestra un escenario en el cual se marca la separación de estas dos especies, sin embargo, los individuos de pecaí criado en confinamiento mostraron estar más cercanos genéticamente a *P. tajacu* (0.824) que a *S. scrofa* (1.837), sugiriendo que son producto de hibridación. De acuerdo con Rosell et al. (2001), existe una gran dificultad para el estudio taxonómico de la especie *S.scrofa*, debido a su variedad de caracteres inducida por los tres procesos de domesticación por los que pasó hace aproximadamente 9.000 años en Europa y en dos ocasiones más en Asia. De aquí que, luego de su domesticación y vuelta a la naturaleza, y nueva adaptación al estado silvestre, presente fenotipos intermedios entre el cerdo doméstico y su antecesor (*Sus Scrofa Scrofa* – jabalí-), lo que origina nuevas subespecies, y las consecuentes confusiones taxonómicas.

9. CONCLUSIONES

Los resultados del análisis de diversidad genética de la población de *P. tajacu* de Michoacán con el marcador mitocondrial *cytb* sugieren un rápido crecimiento por la retención de mutaciones de la población y una reciente coalescencia, y los resultados del análisis de similitud en el árbol de distancia genética y la relación de haplotipos indicaron la presencia de dos grupos genéticos.

El análisis por microsatélites mostró un valor bajo de F_{IS} que fue congruente con un nivel de heterozigosidad alto en *P. tajacu* de Michoacán. Los valores de F_{ST} a través de los loci indicaron que aproximadamente el 18% de la variación genética total de la población de *P. tajacu* de Michoacán se explica por diferencias de la población y 82% corresponde a diferencias dentro de la población. El nivel de HWE fue consistente con el promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) y deficiencia de heterozigotos debido a la diferenciación en subpoblaciones (F_{ST}).

La presencia de un número alto de alelos privados la población de *P. tajacu* de Michoacán es congruente con la idea de que la población tuvo un rápido crecimiento con retención de mutaciones.

El valor de F_{ST} (0.183) de la población de *P. tajacu* de Michoacán, indica una divergencia de la población moderada, sugiriendo un origen en una población grande.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad Z. J. (2006). Análisis de la diversidad genética de dos poblaciones de borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia. Chihuahua, Chih. México. 3-22pp.
- Aranda J. M. (1981). Identificación e interpretación de rastros de mamíferos silvestres. Curso intensivo. Instituto de ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México.
- Aranda, M. (1994). Importancia de los pecaríes (*Tayassu* spp.) en la alimentación del jaguar (*Panthera onca*). *Acta Zool. Mex.* (n. s.) 62: 12-22.
- Aranda M. (2000). Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología. A. C. Xalapa, Veracruz, México. 212 p.
- Awise, J.C. (1994). *Molecular markers; Natural History and Evolution*. Kluwer Academic Publishers. USA.511p.
- Awise J. C. (2000). *Phylogeography: The History and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA USA 447p.
- Awise J. C. (2004). *Molecular markers, Natural History and Evolution, Second Edition*. Sinauer Associates Inc. MA USA. 684p.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Bautista Gómez L.G. (2008). Tesis de maestría. Variabilidad genética en un grupo de pecari de collar (pecari tajacu) en semicautiverio utilizando microsatélites. Universidad autónoma del Estado de Mexico, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. 50 p.
- Bautista-Gómez L.G., Martínez-Castañeda J.S., Zavala-Paramo M.G. y Aguilera Reyes U. (2008). Microsatélites de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) caracterizados en una manada de pecari de collar (pecari tajacu) en semicautiverio, ubicada en el Estado de México. Laboratorio de conducta animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ceballos, G, y G. Oliva (Coords). (2005), *Los mamíferos silvestres de México*. Fondo de cultura económica, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, México. 986 pp.
- Dolores Ramos E; Reyna Isabel Rojas Martínez; José G. Herrera Haro¹; Adelfa del Carmen García Contreras; Clemente Lemus Flores y Alfonso Hernández Garay. (2008). Estandarización de una Técnica de Extracción de ADN en Sementales Porcinos para Evaluar la Frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP.

- Montecillo, Texcoco, Edo. de México. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2(1): 39-50.
- Douzery E. and F. M. Catzeflis (1995). Molecular evolution of the mitochondrial 12S rRNA in ungulata (Mammalia). *J Mol Evol.* 41:622-636.
- Ducrocq, S. (1994). An Eocene peccary from Thailand and the biogeographical origins of the Artiodactyl family Tayassuidae. *Palaeontology*, 37, 765-779.
- Dutton PH (1996). Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. In: Proceeding of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics, Miami FL, 12-14 September 1995 (Bowen BW and Witzell WN, eds). Miami Florida: NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396; 17-24.
- Eisenberg, J.F., (1989). *Mammals of the Neotropics The Northern Neotropics*, vol. 1. The University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Fabila- Blanco A. (2010). Tesis de licenciatura. Genotipificación Mitocondrial de Especies de Mamíferos de la Región del Bajo Balsas Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Facultad de Biología. Morelia, Michoacán. México. Marzo 19 del 2010. 63p.
- Fernández-Silva P., Enríquez J. A. y Montoya J. (2003). Replicación y transcripción del ADN en mitocondrias de mamíferos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, España.
- Fitzsimmons, N., C. Moritz, C. Limpus, L. Pope, and R. Prince (1997). Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow, *Genetics* 147:12 pp.
- Fitzsimmons N. (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology*, 7: 575-584.
- Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. Jhon Weley and Sons, Chichester. England . 388p.
- Garcia G. L.A., R. J. P. Tapia, L. P. Sanchez, S. Ramos y N. Suárez. (2004). Extracción de ADN con resina Chelex en el análisis de la amplificación de oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 55:139-144.}
- Gilbert, Bil. (1999). Do Not Take the Javelina Lightly. *Smithsonian* 30 (5): 52-60.
- Góngora, J., Chen, Y., Bernal, J. E., Nicholas, F. W. and Moran, C. (2002). Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. *Animal Genetics*, 33, 312-314.

- Góngora, J. and Morán, C. (2005). Nuclear and mitochondrial evolutionary analyses of Collared, White-lipped, and Chacoan peccaries (Tayassuidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 181-189.
- Góngora, J., Morales, S., Bernal, J. E. and Moran, C. (2006). Phylogenetic divisions among Collared peccaries (*Pecari tajacu*) detected using mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 1-11.
- Góngora, J., Taber, A., Keuroghlian, A., Altrichter, M., Bodmer, R. E., Mayor, P., Moran, C., Damayanti, C. S. and Gonzalez, S. (2007). Re-examining the evidence for a 'new' peccary species, 'Pecari maximus', from the Brazilian Amazon. *Suiform Soundings*, 7, 19-26.
- Grant W. S. and Bowen B. W., (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89: 415–426.
- Groves, C. P., and P. Grubb. (1993). The Eurasian suids, *Sus* and *Babyrousa* - Taxonomy and Description. In *Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Action Plan*. Edited by W. L. R. Oliver. Gland, Switzerland: IUCN. pp. 129-136.
- Grzimek's (1990). *Encyclopedia of Mammals*. Vol.5. New York: McGraw-Hill Publishing, Pp.51-55.
- Hall, E.R. (1981). *The Mammals of North America*. Vol.2. Toronto: John Wiley & Sons, Pp.1079-1081.
- Hoshino, Y.T. and N. Matsumoto (2005). Skim milk drastically improves the efficiency of DNA extraction from andisol, a volcanic soil. *Jap. Agric. Res. Q.*, 39: 247-252.
- Irwin D. M, T. D. Kocher and A. C. Wilson. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol* 32: 128-144.
- Kratochwill, T. R. and Wetzel, R. J. (1977). Observer agreement, credibility, and judgement: some considerations in presenting observer agreement data. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 10, 133-139.
- Lamit L.J. and Marguerite N.H. (2009). Range expansion of the Collared Peccary in New México: Potential for Interactions Between Historically Separate Subspecies. Monte L. Bean Life Science Museum, Brigham Young University. *Western North American Naturalist, BioOne*. 69(2):253-256.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465.
- Madrigal, S. X. (1997). Ubicación fisiográfica de la vegetación en Michoacán, Mexico. *Animal Genetic Resources Information* 23:69-78.

- Marshall L.G., Berta A., Hoffstetter R., Pacual R., Reig O.A., Bombin M., Mones A., (1984). Mammals And Stratigraphy: geochronology of the continental mammal-bearing Quaternary of South America. *Palaeovertebrata Mem, Extr.* 1-17.
- Marshall L. (1985). Geochronology and land-mammal biochronology of the transamerican faunal interchange, In: Stehli, F.G., Webb, S.D. (Eds), *The Great American Biotic Interchange*, Plenum Press, New York , 49-85.
- Mayer J.J. and Brandt P.N. (1982). Identity, Distribution and Natural History of the Peccaries, Tayassuidae. *Mammalian Biology in South America*, M.A. Mares and H.H. Genoways, eds. Pittsburgh, PA.: University of Pittsburgh Press: 433-55.
- Mayor, P., Jori, F. and Lopez-Bejar, M. (2004). Anatomicohistological characteristics of the tubular genital organs of the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from North-eastern Amazon. *Anat Hist Embryol*, 33:65-74.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Orsini M. and Romano-Spica V., (2001). A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*. Volume 33, Issue 1, pages 17–20.
- Redford, K.H., Eisenberg, J.F., (1992). *Mammals of the Neotropics, The Southern Cone*, vol 2. The University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Rodriguez, J.V. (1998). Listas preliminares de mamíferos Colombianos con algún riesgo de extinción. Informe final presentado al Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.
- Sambrook J., F. E. Fritsch y T. Maniatis. (1994). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E. U. A.
- Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-087969577-4.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. " *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.
- Stahlberg R., Harlizius B., Weitze K.F., and Waberski D. (1998). Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology*. Apr 1;53(6):1365-73.

- Sowls, L.K. (1984). The peccaries. The University of Arizona Press. Tucson.
- Swofford, D. L. (2001). PAUP*: Phylogenetic Analisis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4.0b10 Sinauer Associates Inc., Massachusetts USA.
- Tamura K, Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993 May;10(3):512-26
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 *Molecular Biology and evolution*, 24:1596-1599.
- Theimer T.C. and Keim K. (1998). Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. *J. Mammal* 79: 566–572
- UICN. (1993). Pecaríes, Plan de acción y evaluación de la condición actual, Ed. William L.R.Oliver,UICN/CSE Grupo de especialistas en puercos y pecaríes; Extraído de “Pigs, Peccaries and Hippos: status survey and conservation. Action plan. 1993. 56 p.
- Uribe J. y H. T. Arita (1998). Distribucion, diversidad y conservación de los mamíferos de importancia cinegética en México. *Acta Zool. Mex.* (n.s.) 75:45-71.
- Vienne, Dominique de, (2003). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Science Publishers, INC. USA. 235p.
- Zavala, P. G., Cano C.H., Valdez, A. J. J. y Lopez, M. J. (2002). Marcadores Moleculares: revisión y aplicaciones practicas en animales. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ-UMSNH Morelia, Michoacán. México. *Ciencia Nicolaita* 32:99-109.