

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
FILOGEOGRAFÍA DEL JABALÍ
(*Sus scrofa scrofa* Linnaeus, 1758) EN ARGENTINA**

Trabajo final de grado del alumno

Mara Inés Sagua

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 3 de diciembre de 2014

Caracterización de la variabilidad genética y
filogeografía del jabalí
(*Sus scrofa scrofa* Linnaeus, 1758) en Argentina

Trabajo final de grado del alumno

Mara Inés Sagua

Directora:

Dra. Gabriela P. Fernández

Co-director:

Dr. Mariano L. Merino

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Caracterización de la variabilidad genética y filogeografía del jabalí (*Sus scrofa scrofa* Linnaeus, 1758) en Argentina

Trabajo final de grado del alumno

Mara Inés Sagua

Aprobado por el tribunal evaluador

.....
Ing. Agr. Susana Pistorale

.....
M.Sc. Bruno Carpinetti

.....
Dr. Angel Patitucci

.....
Dra. Gabriela P. Fernández

Directora

.....
Dr. Mariano L. Merino

Co-director

.....
Mara Inés Sagua

Alumno

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 3 de diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A Pablo, mi compañero de ruta.

A mis directores, Gabriela y Mariano, por permitir que la curiosidad que despertaron en el aula se transformara en vocación dentro del laboratorio.

A mis padres, Néstor y Norma por enseñarme a nunca bajar los brazos. A mi hermana Cecilia, y a mi hermana del alma Carolina, por acompañarme siempre. A mis abuelas por su amor infinito.

A Maxi, Chari y Omar, mi familia pergaminense.

A mi familia bahiense, suareense y trelewense por su cariño y apoyo constante. A mis amigos por bancarme siempre.

A los Rústicos por ser los mejores compañeros de trabajo y por su excelencia, dentro y fuera del laboratorio. Especialmente a Luján, una amiga como pocas, y a Charly, por su invaluable ayuda y paciencia.

A mis compañeros del CeBio por generar el mejor ambiente laboral. Al Dr. Andrés Lavore por su predisposición para aclarar dudas. A la Ing. Susana Pistorale, por su apoyo y por aquel fatídico paseo correntino.

Este trabajo está especialmente dedicado a Justo, el mejor abuelo del mundo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 EL JABALÍ.....	2
1.2 INTRODUCCIÓN DEL JABALÍ EN ARGENTINA.....	6
1.3 JABALÍ COMO ESPECIE INVASORA.....	8
1.4 PROCESO DE DISPERSIÓN DEL JABALÍ EN ARGENTINA.....	10
1.5 IMPACTO DE LA ESPECIE EN ARGENTINA.....	13
1.6 MARCADORES MOLECULARES Y FILOGEOGRAFÍA.....	14
1.7 ANTECEDENTES DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES EN JABALÍ EN PAÍSES LIMÍTROFES.....	16
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos Generales.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	21
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	24
4.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	24
4.4 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS.....	26
4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	27
5. RESULTADOS.....	30
5.1 VARIACIÓN DE SECUENCIA.....	30
5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	32
5.3 RELACIONES HAPLOTÍPICAS PARA LAS MUESTRAS DE JABALÍ.....	35
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	43
8. BIBLIOGRAFÍA.....	45
9. RESUMEN.....	51

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Jabalí

El género *Sus* pertenece al Orden Artiodactyla que se compone de 10 especies vivientes, con un número de subespecies variable de acuerdo a cómo éstas se definan (Grubb, 2005). El género es originario del sudeste asiático, donde la mayoría de las especies son endémicas, a excepción del jabalí euroasiático *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo y no se limita a dicha región (Mona *et al.*, 2007).

La especie *Sus scrofa* puede presentar cuatro morfotipos distintos (Genov, 2004):

1. Jabalí Silvestre.
2. Cerdo feral o cimarrón: aquel que escapó de los criaderos y se “asilvestró”.
3. Cerdo Doméstico: producto de zootecnia.
4. Combinaciones híbridas de los anteriores.

La gran plasticidad fenotípica propia de la especie, es decir la capacidad de un genotipo de desarrollar uno o más fenotipos en respuesta al ambiente genera una variación de caracteres que ha dado lugar a la descripción de nuevas subespecies y ha añadido dificultad al estudio taxonómico (Rosell *et al.* 2001; Lee, 2002; Berg, 2006). Hay ejemplares con un aspecto general de jabalí que en realidad podrían ser jabalíes puros, cerdos ferales o el producto de entrecruzamientos (Aravena y Skewes, 2007). (Fig. 1.1)

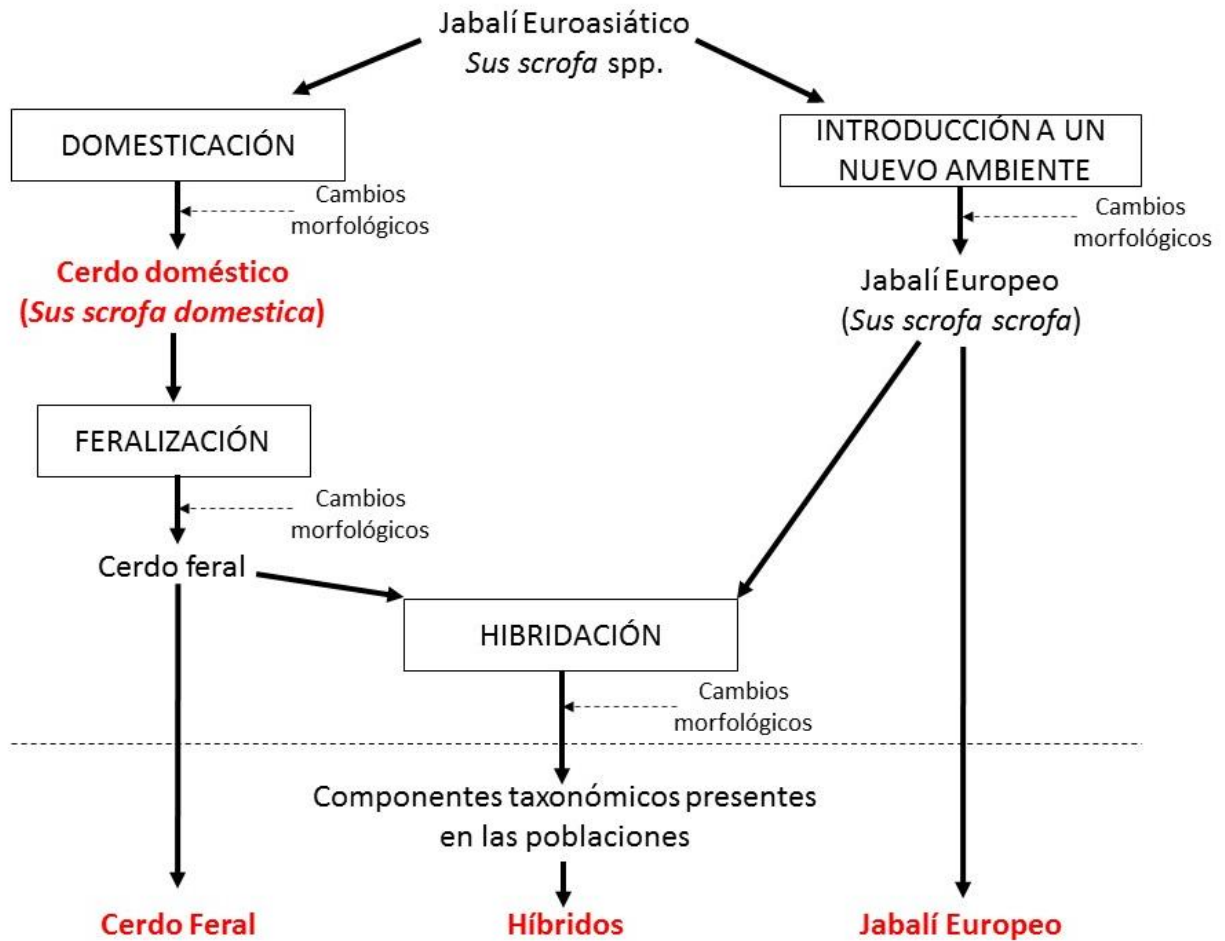


Figura 1.1 Linajes que llevan a los componentes taxonómicos actuales, y los eventos causales que podrían haber llevado a alteraciones en la morfología. Adaptado de Mayer y Brisbin, 1991.

El jabalí euroasiático (*Sus scrofa*), es uno de los mamíferos terrestres más ampliamente distribuidos en el mundo, encontrándose en todos los continentes menos en la Antártica (Groves y Grubb, 1993). La especie ocurre naturalmente desde el oeste de Europa a la costa norte de África, incluyendo a las islas de Córcega y Cerdeña, y al este hacia Japón y sur de Sri Lanka, Sumatra, Malasia e Indonesia (Long, 2003; Massei y Genov, 2004) (Figura 1.2). Relacionado con el hombre desde tiempos prehistóricos, fue domesticado en Asia hace aproximadamente 9.000 años, por lo que representa el origen genético del cerdo doméstico actual (Giuffra *et al.*, 2000; Rosell *et al.*, 2001). También debido a la acción del ser

humano, fue introducido en Noruega, Suecia, Sudáfrica, Egipto, Sudán, Australia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea y en América del Norte, Central y del Sur (Long 2003; Aravena y Skewes, 2007).

El jabalí europeo perteneciente a la subespecie *Sus scrofa scrofa* originaria de Europa central, se distribuye desde el centro de la Península Ibérica hasta el norte de Europa, con Polonia, República Checa, Eslovaquia, Hungría y Rumania como límites septentrionales (Rosell *et al.*, 2001; Aravena y Skewes, 2007).

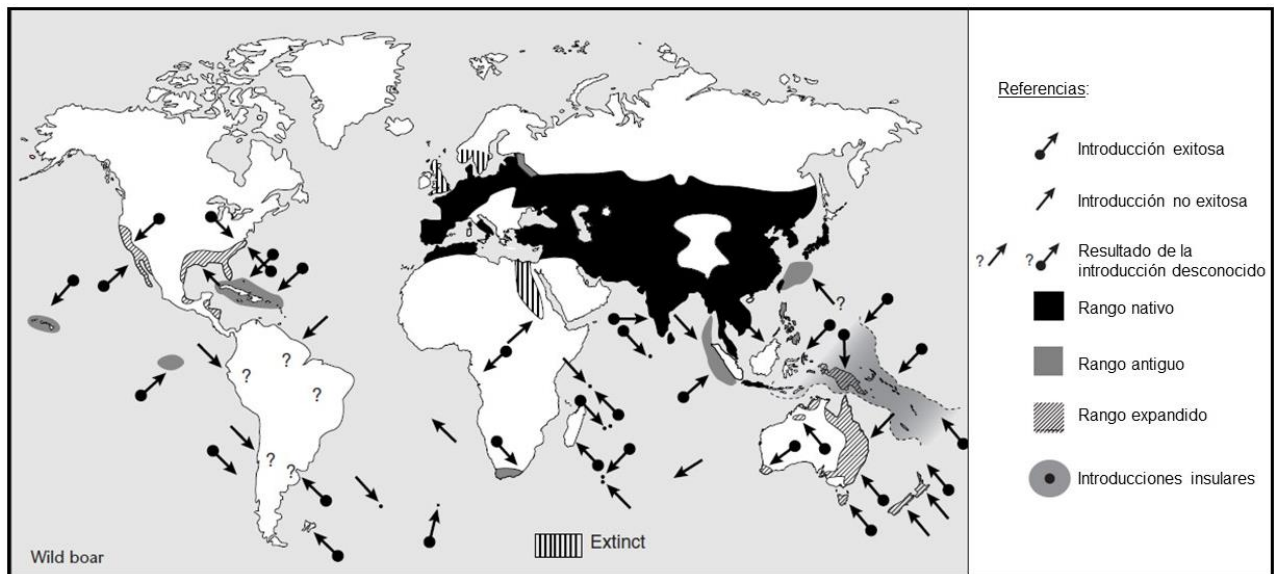


Figura 1.2 Mapa de distribución del jabalí a nivel mundial. Adaptado de Long, 2003

El jabalí euroasiático presenta una morfología característica en donde la altura máxima se da en la región de las extremidades anteriores, posee cuello poco aparente y orejas pequeñas que se mantienen erguidas, a diferencia de las del cerdo doméstico que son mayores y tienden a caer hacia adelante. El rostro es recto y alargado, característica que lo diferencia a simple vista de los ejemplares domésticos y ferales (Aravena y Skewes, 2007). Los dientes caninos superiores se arquean progresivamente hacia arriba hasta encajarse en la parte posterior del hocico del macho adulto. El roce continuo con los caninos inferiores los

mantiene afilados, constituyendo una importante defensa que además facilita el marcaje de árboles y participa en la lucha por las hembras en la época de celo (Rosell *et al.*, 2001). El tamaño corporal varía según la zona geográfica, ya que depende de la latitud y de la disponibilidad de alimento cumpliendo con la regla de Bergmann, que postula que dentro de un clado taxonómico ampliamente distribuido, las poblaciones con mayores tamaños corporales se encuentran en climas más fríos, y las de menor tamaño en climas más cálidos (Bergmann, 1847). Para el jabalí el peso promedio alcanza los 100 kg. El pelaje típico de los ejemplares adultos se compone de pelos duros con coloración castaño oscura y variaciones hacia el gris o el negro con una crin dorsal (Rosell *et al.*, 2001; Chebez y Rodríguez, 2013). Las crías o jabatos desde el nacimiento hasta los seis meses de edad presentan 11 líneas blancas longitudinales en el lomo que utilizan para camuflarse (Groves y Grubb, 1993; Rosell *et al.*, 2001) (Fig. 1.3).

La especie posee un marcado dimorfismo sexual, presentando los machos mayores dimensiones que las hembras, además de otros caracteres secundarios diferenciales, como la presencia de caninos mayores, la piel más gruesa y dura a lo largo del dorso, formando una “*coraza*” que evita que se produzcan lesiones importantes durante los combates en la época de celo, crin dorsal más desarrollada y presencia de un pincel de pelos que señala el emplazamiento del pene. Los testículos alcanzan un gran desarrollo lo que puede indicar que en esta especie se da algún tipo de competencia espermática. En verano también son conspicuas las mamas de las hembras adultas que se encuentran en número de cuatro a seis pares (Rosell *et al.*, 2001). El número cromosómico varía según la región geográfica, pero como regla general se toma que el jabalí europeo posee $2n=36$, mientras que el cerdo doméstico $2n=38$ y el cerdo feral $2n=37$. La diferencia se debe a dos translocaciones Robertsonianas entre los cromosomas 15 y 17 (Rothschild y Ruvinsky, 1998; Rosell *et al.*, 2001).

La estructura social tiene como unidad básica el grupo matriarcal, compuesto por una o diversas hembras acompañadas de sus crías. Los machos adultos son solitarios, pero se acercan a los grupos de hembras y crías durante el período de celo (Rosell *et al.*, 2001).

La mayor parte de los individuos muestran hábitos sedentarios, estudios realizados mediante técnicas de captura, marcaje y recaptura mostraron que entre el 75 y el 90% de los individuos capturados se recapturan en un radio inferior a 10 km (Boisaubert y Klein, 1984; Spitz *et al.*, 1984).

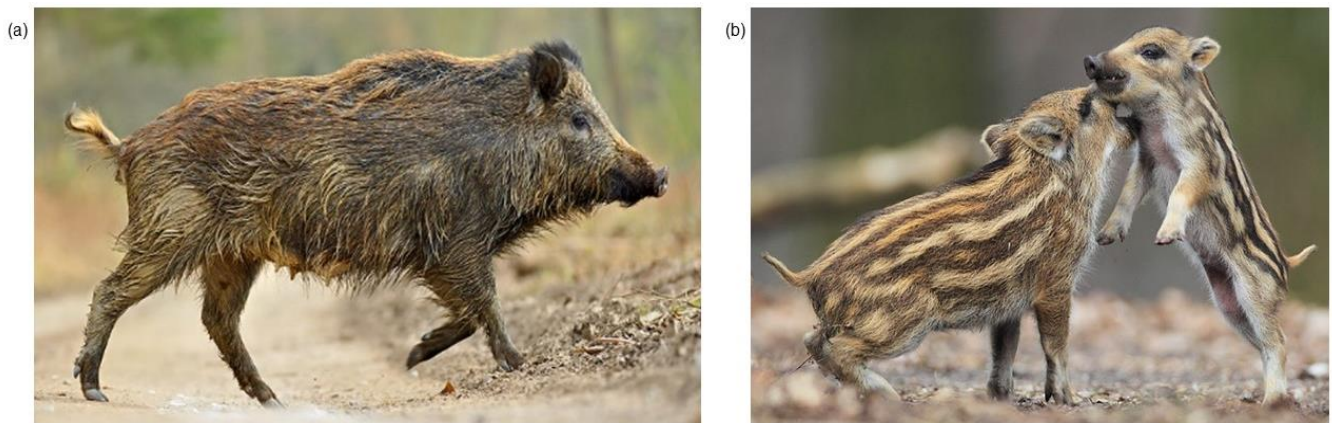


Figura 1.3 (a) ejemplar de hembra adulta de jabalí europeo (b) jabatos presentando las características rayas horizontales en su pelaje.

1.2 Introducción del jabalí en Argentina

El jabalí euroasiático es el único suido exótico silvestre que se ha introducido en Argentina, donde se encuentra perfectamente aclimatado; el propósito de esta introducción fue promover la actividad cinegética, a principios del siglo XX (Godoy, 1963; Daciuk, 1978).

Si bien se desconoce el número exacto de eventos de introducción que ha tenido esta especie en nuestro país, existen tres documentados. Pedro Luro introdujo en 1906, siete ejemplares (dos machos y cinco hembras) originarios de Francia a su estancia San Huberto, en la provincia de La Pampa actualmente Reserva Provincial Parque Luro. Posteriormente se

cruzaron con ejemplares de menor tamaño, de origen desconocido, en un refuerzo del núcleo original (Navas, 1987; Amieva, 1993). Pedro Luro convirtió a San Huberto en un coto de caza mayor, manteniendo a los animales en una superficie de 500 hectáreas cercadas con alambre tejido; las fuertes lluvias de 1914 abrieron boquetes bajo el alambrado, lo que permitió el escape de numerosos jabalíes que se refugiaron en los montes vecinos, iniciando el proceso de dispersión (Godoy, 1963).

El segundo evento ocurrió en la provincia de Río Negro, por Aarón de Anchorena, quien trasladó algunos ejemplares de su estancia “La Barra de San Juan” de Colonia, Uruguay, a la estancia “Huemul” también de su propiedad, ubicada sobre la costa del lago Nahuel Huapi, entre 1924 y 1925 (Daciuk, 1978). Estos últimos, descienden de jabalíes del Cáucaso, traídos al Uruguay por el mismo Anchorena, responsable de la introducción de esta especie en el país vecino, también con propósitos cinegéticos a principios de la década de 1920 (Baccino Ponce de León, 1998; García *et al.*, 2011).

El último evento ocurrió en la provincia de Entre Ríos, departamento de Colón, a fines de la década de 1940, aunque el origen de estos jabalíes permanece desconocido (Navas, 1987). Es probable que algunos ejemplares que escaparon de su cautiverio en Colonia (Uruguay), hayan migrado bordeando el curso del Río Uruguay y cruzado hacia Entre Ríos, invadiendo la zona donde actualmente se encuentra el Parque Nacional El Palmar en la región de Colón. Al carecer de glándulas sudoríparas, esta especie no puede termorregular eficientemente por lo que generalmente se la encuentra cerca de cursos de agua (Rosell *et al.*, 2001; Oliver, 2008). Otras fuentes sostienen que también fueron introducidos en esta zona con fines cinegéticos, en la década de 1950 (Zelich, comunicación personal).

Estos tres núcleos conforman la piedra fundamental para la expansión del jabalí en Argentina (Figura 1.4).

1.3 Jabalí como especie invasora

Una invasión biológica es un evento en el que por acción del hombre una especie es trasladada a una región que se encuentra por fuera de su rango natural de distribución. Este concepto es distinto al de colonización, que refiere a expansiones del rango natural (Lee, 2002). Se define como especie exótica a la que no es nativa de un área y que fue introducida como resultado de la actividad humana, una especie invasora es aquella que ha sido introducida, se ha aclimatado y presenta una expansión no dependiente del hombre que causa un impacto negativo en el ambiente, o en las actividades humanas o en la salud pública (Coblentz, 1990; Lee, 2002).

Las especies invasoras raramente ocuparán el nicho esperado lo que puede devenir en consecuencias como el desplazamiento de especies nativas por competencia, la eliminación de especies nativas por predación o transmisión de enfermedades, y la reducción de la biodiversidad por degradación del hábitat, entre otras (De Voos *et al.*, 1955; Coblentz, 1990). Williamson y Fitter (1996) definieron una terminología específica para distinguir entre distintos tipos de especies no nativas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Terminología utilizada para distinguir diferentes tipos de especies no nativas. Adaptado de Williamson y Fitter, 1996

Término	Definición
<i>Especie Importada</i>	Trasladada a un país que no es el de origen
<i>Especie Introducida</i>	Se encuentra en forma silvestre o feral
<i>Especie Establecida</i>	Que tiene una población, naturalizada, no dependiente de la actividad del hombre
<i>Plaga</i>	Especie con un efecto económico negativo
<i>Escape</i>	Transición de especie importada a especie introducida
<i>Establecimiento</i>	Transición de especie introducida a especie establecida
<i>Conversión en Plaga</i>	Transición de especie establecida a plaga

Los autores también definen una regla estadística conocida como la "*Regla del 10*" que aplica para varios grupos de plantas y animales, según la regla cada transición tiene una probabilidad de ocurrencia de aproximadamente el 10%.(Holdgate, 1986; Williamson y Brown, 1986; Williamson, 1993)

Los efectos ecológicos de las poblaciones de jabalí varían en cada región, dependiendo de la densidad poblacional y de la sensibilidad de los ecosistemas. La especie puede ocupar una gran variedad de hábitats, desde regiones costeras hasta zonas montañosas donde la especie migra, moviéndose hacia las cumbres en primavera y verano y trasladándose hacia el valle en otoño, a diferencia de los cerdos ferales que no son migratorios (Singer, 1981).

Su dieta omnívora le permite consumir una gran variedad de raíces y tubérculos, plantas herbáceas, granos, frutos, pequeños vertebrados e invertebrados. Además presenta la mayor tasa reproductiva entre los ungulados, llegando incluso a duplicar su densidad en un año. A pesar de esto, la densidad de las poblaciones fluctúa ampliamente, dependiendo de la disponibilidad de alimentos y de los niveles de agricultura (Massei y Genov, 2004). Debido al impacto que genera en el ambiente, el jabalí ha sido declarado una de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo por la Unión Mundial para la Naturaleza (Lowe *et al.*, 2004).

En Europa, lugar de origen del jabalí, el depredador natural es el lobo (*Canis lupus*), que depreda animales jóvenes y jabatos regulando el tamaño poblacional (Gérard *et al.* 1991). En Argentina, el único depredador es el puma (*Puma concolor*), que posee un alto nivel de prelación del jabalí, principalmente de los animales jóvenes de menos de dos años de edad (Novaro *et al.*, 2000).

El mayor impacto de este felino sobre las poblaciones de jabalí se da principalmente en el otoño, cuando las poblaciones se agregan, y en invierno cuando las condiciones climáticas son desfavorables y se reducen las fuentes de alimento (Pescador *et al.*, 2009).

1.4 Proceso de dispersión del jabalí en Argentina

En Argentina, las características mencionadas anteriormente le han permitido a la especie expandirse a partir de los tres centros de introducción, ocupando actualmente: hacia el oeste, un cordón cordillerano que llega desde la provincia de Chubut hasta el sur de la provincia de Mendoza. Hacia el centro la totalidad de las provincias de Río Negro, La Pampa y San Luis, como también el norte de las provincias de Córdoba, Entre Ríos y Buenos Aires; y hacia el este la costa del río Uruguay en la provincia de Entre Ríos, y la costa atlántica de

la provincia de Buenos Aires, desde el partido de Magdalena hasta el de Patagones (Merino, y Tognelli, 2009). Dentro de este territorio se encuentran los Parques Nacionales Los Alerces, Lago Puelo, Nahuel Huapi, Lihue-Calel, Sierra de las Quijadas, El Palmar, y las reservas El Leoncito y Ñacuñán, donde el jabalí representa una amenaza para la integridad de estos ambientes valiosos para la conservación (Fonseca *et al.*, 2003; Novillo y Ojeda, 2008; Merino y Tognelli, 2009; Cuevas *et al.*, 2010).

Se han registrado otros focos de introducción por dispersión activa por el hombre, dado su uso como especie de caza mayor (Godoy, 1963). Por ejemplo, el núcleo que se estableció en la provincia de Neuquén y que posteriormente invadió el parque nacional Lanín procede de ejemplares traídos de la estancia San Huberto de la provincia de La Pampa entre 1917 y 1922 por el administrador de la estancia "Collun-Có", Roberto Hohmann (Daciuk, 1978; Chevez y Rodríguez, 2014). Estos ejemplares se aclimataron y posteriormente se dispersaron cruzando los Andes hasta llegar a Chile (Daciuk, 1978).

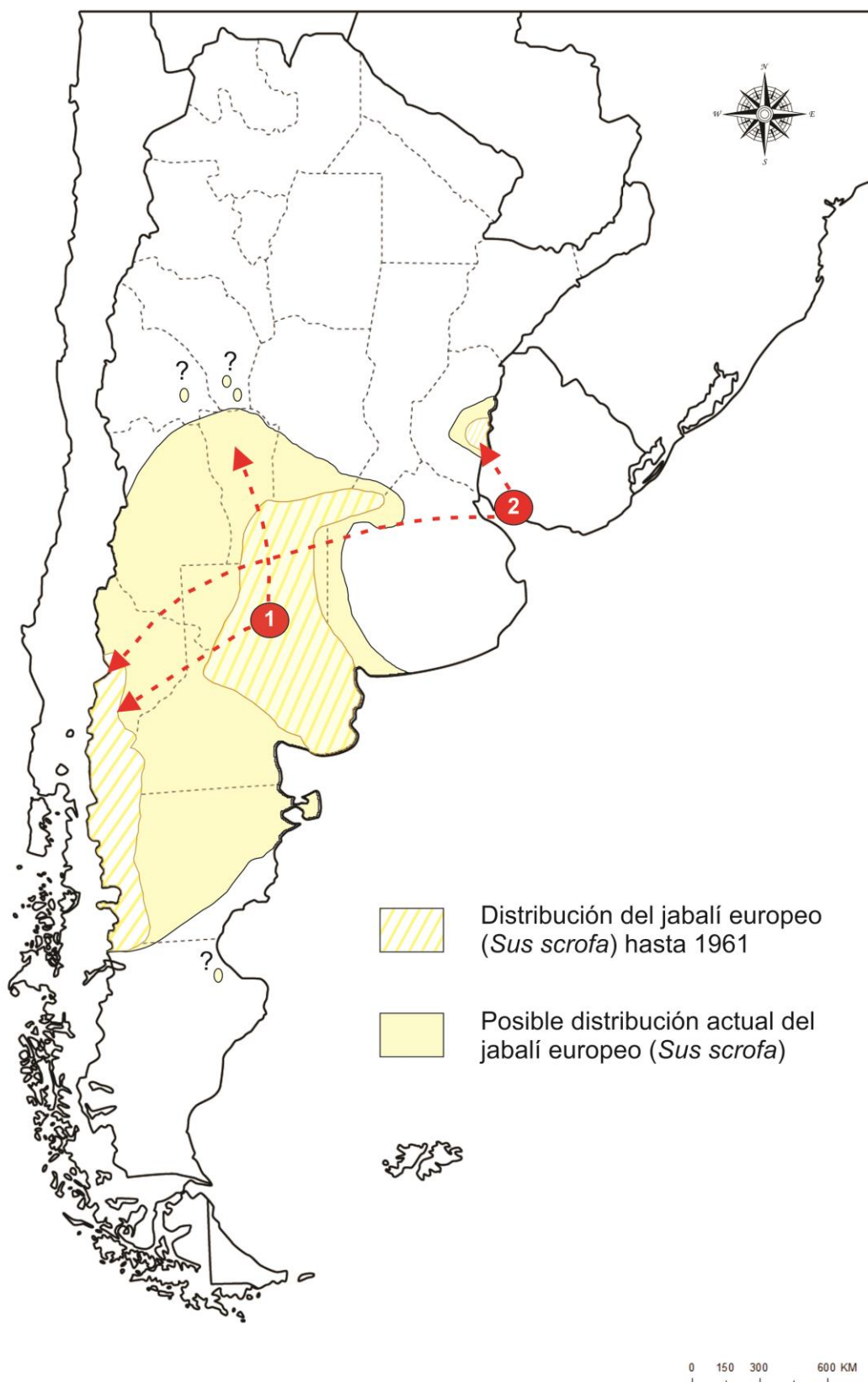


Figura 1.4 Mapa de la distribución actual del jabalí en Argentina. 1: indica el sitio de la primera introducción en provincia de La Pampa. 2: Colonia (Uruguay), el punto de origen de la segunda introducción a la provincia de Río Negro y la tercera a la provincia de Entre Ríos. Los signos de pregunta indican posible presencia de jabalí en esos puntos.

1.5 Impacto de la especie en Argentina

En nuestro país el jabalí constituye una amenaza para las actividades agropecuarias y para la estabilidad de muchos ecosistemas, especialmente por la destrucción del suelo, producida por su hábito de hozar, especialmente en zonas donde se cultivan hortalizas, cereales y forrajeras (Navas, 1987). Además afecta la estructura y composición de las plantas y depreda las semillas (Campos y Ojeda, 1997). Un ejemplo de esto ocurre en el parque nacional El Palmar, donde el jabalí no sólo come el fruto de la palmera yatay (*Butia yatay*), cuya protección condujo a la creación del parque, sino que también destruye su semilla, como se pudo comprobar mediante análisis de contenidos estomacales (Maranta, 2004). Otros efectos de la especie también incluyen: facilitar la expansión de especies exóticas de plantas como el cardo ruso (*Salsola kalii*), generar un efecto negativo en las especies de aves que anidan en el suelo como la lechucita vizcachera (*Athene cunicularia*) y la perdiz (*Eudromia elegans*), y consumir huevos de lagartos (*Tupinambis merianae*) y tortugas (*Chelonidis chilensis*) (Novillo y Ojeda, 2008).

El impacto de esta especie en Argentina llevó a que en 1951 se declare perjudicial al jabalí, y por decreto del Poder Ejecutivo Nacional N° 14638 se lo incluyó en el plan de lucha contra los animales depredadores de la ganadería para las provincias de La Pampa, Río Negro y Chubut (Godoy, 1963).

A pesar de esto, el jabalí constituye un recurso de alto valor económico dada la calidad de su carne, valorada por poseer menor cantidad de grasa, calorías y colesterol que las carnes tradicionales de cerdo, y de alto valor cinegético, como lo demuestran los centenares de cotos de caza existentes en el país, así como dentro de algunos parques nacionales (Skewes y Morales, 2006).

Para entender la dinámica de las poblaciones de Argentina, es importante considerar las posibles relaciones con las poblaciones de Uruguay, principalmente, y de Brasil.

En Uruguay, el jabalí se introdujo a principios del siglo XX a Colonia con fines cinegéticos. La dispersión comenzó en el oeste, la principal zona de agricultura, extendiéndose desde allí hacia el centro y este del país, y al norte lindando con la frontera del estado brasileño de Rio Grande do Sul (García *et al.* 2011). En este país, se observa una gran variabilidad fenotípica con predominio de características de jabalí (Herrero y Fernández de Luco, 2003).

En Brasil, la especie se introdujo a fines del siglo XX primero desde Argentina y posteriormente desde Francia y Canadá, con el propósito de cruzarlo con el cerdo doméstico para obtener híbridos, y satisfacer la demanda de carnes exóticas, a pesar de que la hibridación para aumentar los niveles productivos es valorada negativamente por los mercados internacionales, ya que se pierden las características de la carne de jabalí y se produce un mayor engrasamiento de los animales (Lui, 2000; Grossi *et al.*, 2006; Skewes y Morales, 2006) En este país también existe una población feral llamada "Monteiro", que descende de los cerdos domésticos llevados durante el período inicial de la colonización española (Silva y Mauro, 2002). Posteriormente los híbridos atravesaron la frontera e invadieron el norte de Uruguay (Lui, 2000; Grossi *et al.*, 2006; García *et al.*, 2011).

1.6 Marcadores moleculares y filogeografía

Se define como filogeografía al conocimiento y la aplicación de marcadores moleculares genéticos para responder preguntas de ecología y evolución. Esta disciplina engloba aspectos temporales como son las relaciones evolutivas de los linajes y aspectos espaciales como la distribución geográfica. Al comparar ambos, permite entender cuáles son

los factores que han influenciado la distribución de la variación genética. La construcción de árboles filogenéticos para entender los patrones filogeográficos resulta fundamental, ya que a partir de ellos se realizarán e interpretarán los análisis siguientes (Hernández-Baños *et al.*, 2007).

Las secuencias nucleotídicas acumulan gran cantidad de información genética, y los genes mitocondriales, al tener alta tasa de evolución, gran variación intraespecífica, herencia materna (a través de los ovocitos) y recombinación nula, permiten describir la historia matrilineal de organismos coespecíficos (Randi, 1995; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). La transmisión clonal de los haplotipos de ADN mitocondrial (ADNmt) facilita la discriminación de matrilineas intraespecíficas; y el análisis de las regiones más variables de las secuencias es útil para determinar el origen genético de poblaciones y de razas animales (Bradley *et al.*, 1996; Luikart *et al.*, 2001).

El marcador molecular mitocondrial citocromo b es un gen codificante de proteínas, que se encuentra estructuralmente conservado entre las especies debido a restricciones evolutivas. En los Suidos evoluciona aproximadamente a una tasa del 2% de sustituciones nucleotídicas cada millón de años, de acuerdo con una tasa intermedia de evolución de secuencia en mamíferos, y baja variación de secuencia en *Sus scrofa* (Randi, 1995).

Por otra parte se lo ha utilizado tanto en análisis filogenéticos como filogeográficos de esta especie, lo que lo convierte en una herramienta útil y simple para obtener relaciones filogenéticas confiables (Watanobe *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2003; Mona *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011). Además es el marcador molecular más representado para el género *Sus* en la base de datos GenBank (Mona *et al.*, 2007)

1.7 Antecedentes de los estudios moleculares en jabalí en países limítrofes

García y colaboradores (2011) utilizaron un fragmento de 661 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo b para analizar las poblaciones de jabalí de Uruguay, y encontraron que éstas tienen dos orígenes, europeo y asiático. Los jabalíes europeos corresponden a los departamentos de Rocha, Tacuarembó, Durazno y Florida ubicados en el sur, centro y noreste del país. Esta distribución es consistente con la introducción histórica del jabalí europeo en el departamento de Colonia y su dispersión a partir de ese punto. Los jabalíes con origen asiático se ubican en el este, en los departamentos de Lavalleja y Rocha.

El hallazgo de este origen asiático resultó inesperado, y propusieron que debería estar relacionado con un segundo evento introductorio, ocurrido en el sudeste de Uruguay cerca del río Cebollatí, en la cuenca del lago Merín, que forma la frontera entre Uruguay y el estado brasileño de Rio Grande do Sul. Postulan que esta introducción fue intencional y que ocurrió desde Brasil hacia Uruguay, pero carecen de datos suficientes para afirmar esta teoría (García *et al.*, 2011).

Grossi y colaboradores (2006) realizaron un análisis de diversidad genética para las poblaciones silvestres, ferales y domésticas de *Sus scrofa* en Brasil, utilizando como marcador un fragmento de 330 pb. de la región D-loop del ADN mitocondrial. Encontraron que los cerdos domésticos presentaban haplotipos asiáticos, y que los jabalíes silvestres y los cerdos ferales pertenecían a haplotipos europeos, lo que apoya el origen del cerdo Monteiro. Actualmente las poblaciones de cerdo silvestre y feral ocupan cerca del 50% de la superficie del estado de Rio Grande do Sul (Guadagnin *et al.*, 2014)

En este trabajo se buscará caracterizar las relaciones filogenéticas entre las distintas poblaciones de jabalí silvestre de la Argentina, con el fin de determinar el patrón de dispersión que tuvo esta especie en nuestro país, y sentar las bases para la búsqueda de un marcador genético molecular que permita discriminar al jabalí de sus variantes domésticas (y los híbridos entre ambas), requisito indispensable para comercializar su carne a la Unión Europea (Oliva, 2011).

Por lo tanto, a través de estos estudios de cuño genético se pretende aportar mayor conocimiento sobre esta especie, que constituye un recurso económico y cinegético para la Argentina y que por su carácter de invasora es una amenaza para la biodiversidad.

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS

En la actualidad, las poblaciones silvestres de jabalí (*Sus scrofa scrofa*) de nuestro país descienden de los ejemplares traídos a principios del siglo XX con fines cinegéticos a las provincias de La Pampa, Río Negro y Entre Ríos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo es caracterizar las relaciones filogenéticas entre las distintas poblaciones de jabalí silvestre de la Argentina, con el fin de determinar el patrón de dispersión que tuvo esta especie en nuestro país.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Identificar la estructura genética y polimorfismos de ADN utilizando marcadores moleculares mitocondriales.
- ii. Identificar las diferencias y similitudes genéticas entre los individuos de diferentes regiones de Argentina, y su dinámica de hibridación.
- iii. Caracterizar genéticamente al jabalí en los tres núcleos de introducción en la Argentina.

Materiales y Métodos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

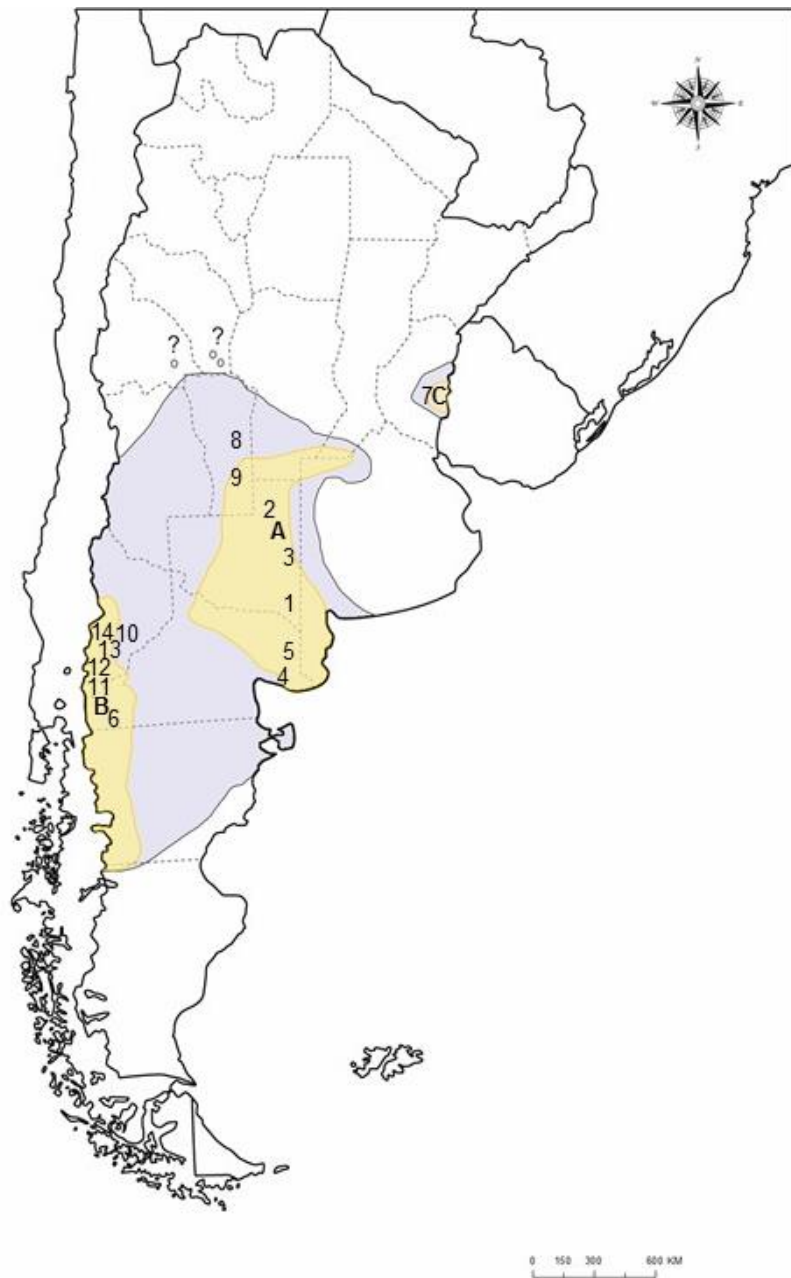
4.1 Obtención de las muestras

Se analizaron 23 muestras tanto de tejido como de ADN, representativas del rango geográfico de expansión del jabalí en Argentina, estas están depositadas en el Banco de Muestras de Tejido del Centro de Bioinvestigaciones perteneciente a la UNNOBA. Se contó con muestras de tejido que comprendieron porciones de pabellón auditivo, músculo y piel con pelo, fijadas en etanol 95%, así como con muestras de ADN ya extraído, conservados a -20°C.

Las muestras incluyeron a los tres núcleos de introducción del jabalí en Argentina, correspondientes a las provincias de La Pampa, Río Negro y Entre Ríos y su rango de expansión, incluyendo muestras de las provincias de Neuquén y San Luis. La procedencia de cada una se detalla en la tabla 4.1. En la figura 4.1 se detalla la localización geográfica de las mismas.

Tabla 4.1 Procedencia y características de las muestras de jabalí analizadas

ID	Provincia	Localidad	Ejemplar	Tipo de Tejido
LP_CALEU	La Pampa	Caleu-Caleu	Jabalí	Cuero y Pelo
LP_CONHELO	La Pampa	Conhelo	Jabalí	Pabellón auditivo
LP_RUTA1	La Pampa	Ruta 1 Km. 340	Jabalí	Cuero y Pelo
RN_CALETA	Río Negro	Caleta de los Loros	Jabalí	Cuero y Pelo
RN_CONESA1	Río Negro	Ruta 250, sur de Conesa	Jabalí	Tegumento y Pelo
RN_CONESA2	Río Negro	Ruta 250, sur de Conesa	Jabalí	Tegumento y Pelo
RN_CONESA3	Río Negro	Conesa	Jabalí	ADN
RN_NORQUINCO1	Río Negro	Ñorquinco	Jabalí	Músculo
RN_NORQUINCO2	Río Negro	Ñorquinco	Jabalí	Músculo
ER_ELPALMAR1	Entre Ríos	Parque Nacional El Palmar	Jabalí	ADN
ER_ELPALMAR2	Entre Ríos	Parque Nacional El Palmar	Jabalí	ADN
SL_BATAVIA	San Luis	Batavia	Jabalí	Músculo
SL_CENTENARIO1	San Luis	Estación El Centenario	Jabalí	Músculo
SL_CENTENARIO2	San Luis	Estación El Centenario	Jabalí	Músculo
SL_CENTENARIO3	San Luis	Estación El Centenario	Jabalí	Músculo
SL_CENTENARIO4	San Luis	Estación El Centenario	Jabalí	Músculo
NQN_CATATUN	Neuquén	Catatún	Jabalí	Músculo
NQN_ELESPEJO	Neuquén	Lago El Espejo	Jabalí	Cuero y Pelo
NQN_PEHUENIA	Neuquén	Villa Pehuenia	Jabalí	Músculo
NQN_PILOLIL1	Neuquén	Pilolil	Jabalí	Músculo
NQN_PILOLIL2	Neuquén	Pilolil	Jabalí	Músculo
NQN_QUILLEN1	Neuquén	Quillén	Jabalí	Músculo
NQN_QUILLEN2	Neuquén	Quillén	Jabalí	Músculo



#	Localidad	Provincia
1	Caleu-Caleu	La Pampa
2	Conhelo	La Pampa
3	Ruta 1 km. 340	La Pampa
4	Caleta de los Loros	Río Negro
5	Conesa	Río Negro
6	Ñorquinco	Río Negro
7	P.N. El Palmar	Entre Ríos
8	Batavia	San Luis
9	Est. El Centenario	San Luis
10	Catatún	Neuquén
11	Lago El Espejo	Neuquén
12	Villa Pehuenia	Neuquén
13	Pilolil	Neuquén
14	Quillén	Neuquén
A	Parque Luro	La Pampa
B	S.C. Bariloche	Río Negro
C	P. N. El Palmar	Entre Ríos

Figura 4.1 Localidad de procedencia de las muestras de jabalí colectadas en Argentina. El sombreado naranja indica la distribución de jabalí europeo registrada hasta 1961, el gris muestra la posible distribución actual de la especie. Las letras A, B, C indican los 3 núcleos de introducción documentados, y los números la localización de las muestras analizadas.

4.2 Extracción de ADN

A partir de cada muestra de tejido se extrajo el ADN mediante los siguientes protocolos:

- i. Extracción de ADN con sal (NaCl) (Medrano *et al.*, 1990)
- ii. Extracción con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Sambrook y Russel, 2001)

La eficiencia de extracción de ADN fue verificada mediante un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. Las muestras se sembraron junto con el *buffer* de siembra DNA Dye (EZ-Vision Three, Amresco)

4.3 Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para cada muestra de ADN se amplificó un fragmento de 661 pb. entre los sitios 14695 y 15355 correspondiente al gen citocromo b mediante PCR utilizando los siguientes *primers* descritos por Alves y colaboradores (2003):

Forward: 5'TCTTCGCCTTCCACTTTATCCTG3'

Reverse: 5'TGGCCCTCCTTTTCTGGTTTA3'

Se preparó la mezcla de reacción con volumen final de 20 μ L, conteniendo 25-100 nanogramos de ADN; Cl₂Mg 1,5mM; *primer forward* 0,2 μ M; *primer reverse* 0,2 μ M; dNTPs 0,2mM, *Buffer* de reacción 1X; Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) 0,5U y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final.

El programa de PCR se programó para un primer paso de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno contando con una fase de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, una de ligado del *primer* al ADN molde (*annealing*) a 56°C por 45

segundos y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con 10 minutos a 72°C para una extensión final (Alves *et al.*, 2003). Para llevar a cabo las reacciones se utilizó el termociclador Gene Pro Thermal Cyclor (Bioer Technology CO., LTD).

Los productos amplificados fueron purificados utilizando 10U de Exonucleasa I (Thermo Scientific) y 1U de FastAP Fosfatasa alcalina termosensible (Thermo Scientific). Las muestras se incubaron a 37°C durante 15 minutos y luego a 85°C por otros 15 minutos para detener la reacción enzimática.

El resultado de amplificación se verificó en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta (Figura 4.2). Como parámetro del tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de 100 pares de bases (PB-L). Las muestras se sembraron junto con el buffer de siembra DNA Dye (EZ-Vision Three, Amresco).

Posteriormente a la siembra se realizó la cuantificación de ADN para cada fragmento amplificado, tomando fotografías de alta resolución que se analizaron utilizando el programa informático ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004)

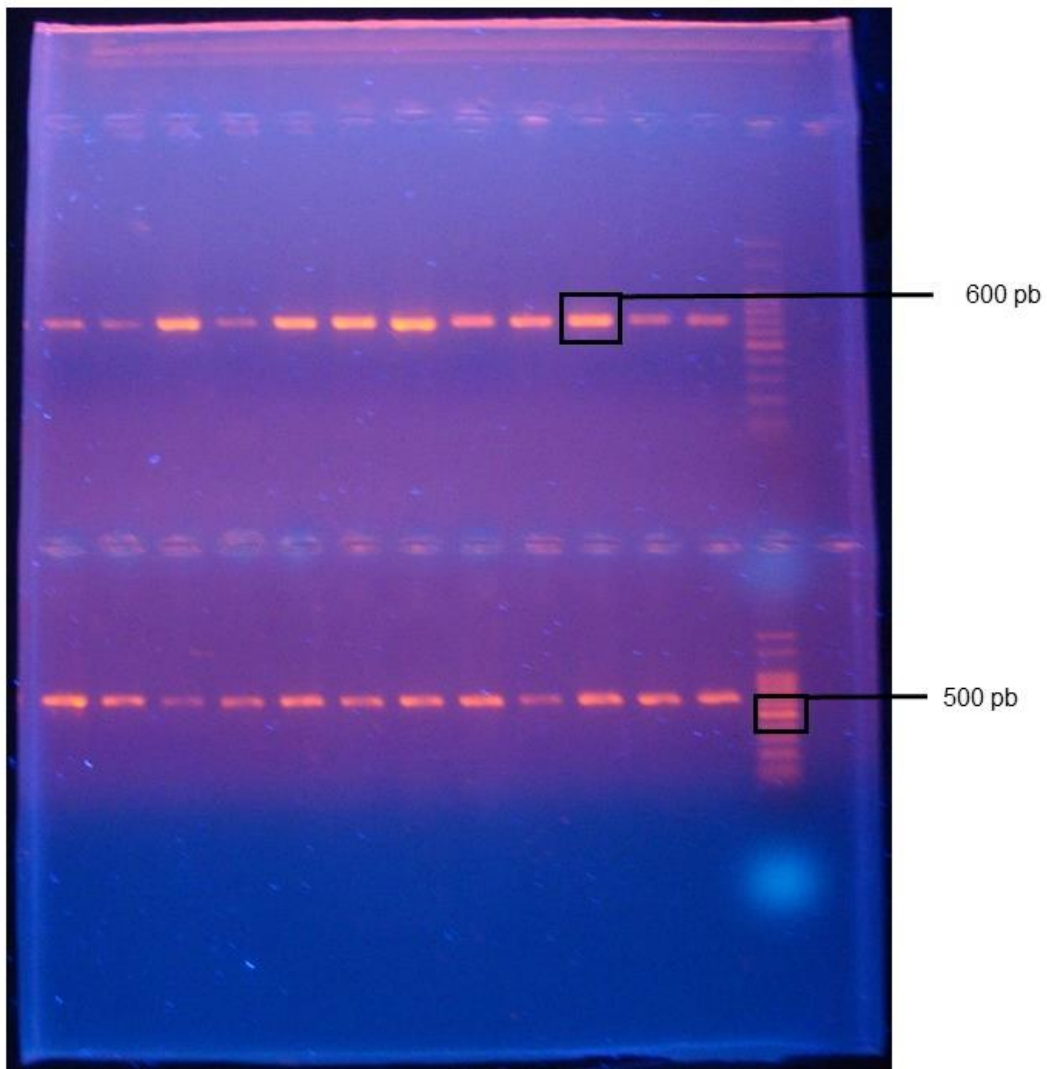


Figura 4.2 Gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Se indican las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados de 600 pb y la banda perteneciente al marcador de peso molecular de 500 pb.

4.4 Obtención de las secuencias

Se realizó secuenciación estándar de los productos de amplificación utilizando el secuenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), mediante el servicio MACROGEN (Korea).

4.5 Análisis de los datos

Las 23 secuencias obtenidas se analizaron y corrigieron mediante el programa BioEdit (Hall, 2004). Posteriormente se utilizó el algoritmo ClustalX del programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) para realizar un alineamiento múltiple de las 23 secuencias pertenecientes a las muestras de Argentina, junto con 21 secuencias obtenidas de la base de datos GenBank pertenecientes al gen citocromo b de jabalíes españoles, italianos, búlgaros, portugueses, rusos, chinos, israelíes, japoneses, cingaleses y uruguayos (Tabla 4.2). También se incluyó la secuencia de este gen para el cerdo verrugoso de Java *Sus verrucosus* que se tomó como *outgroup* en el árbol filogenético.

A partir del alineamiento múltiple se tomó un fragmento de 560 pb. para la realización de los análisis posteriores y se generó un árbol filogenético a partir de las metodologías de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud (MV), bajo el modelo Tamura-Nei, empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La determinación de los límites de confianza para monofilia de cada nodo, se realizó a través de un análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

El número de sitios variables (polimórficos), singletons y haplotipos, como también la diversidad nucleotídica y haplotípica se calculó usando el programa informático DnaSP5 (Librado y Rozas, 2009). Este último análisis se realizó solamente para las 23 secuencias obtenidas a partir de las muestras colectadas.

Para determinar las relaciones haplotípicas se utilizó el algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa Network 4.6.1.2 (www.fluxus-engineering.com).

Tabla 4.2 Secuencias obtenidas de GenBank incluidas en el análisis. Se indica el número de acceso correspondiente a cada una. (n=21)

<i>Identificación</i>	<i>Origen</i>	<i>Número de Acceso</i>	<i>Ejemplar</i>
BUL_WB1	Bulgaria	AJ314556	Jabalí
BUL_WB2	Bulgaria	AM492592.1	Jabalí
BUL_WB3	Bulgaria	AM492593.1	Jabalí
CHINA_HAINAN1	China - Hainan	GU135819.1	Jabalí
ESP_WB1	España	AY237511	Jabalí
ESP_WB2	España	AY237514.1	Jabalí
ESP_WB3	España	AY237515.1	Jabalí
ISR_WB1	Israel	AF163100	Jabalí
IT_CER	Italia - Cerdeña	AJ314558.1	Jabalí
JAP_WB1	Japón	AF136550	Jabalí
POR_WB1	Portugal	AM492653.1	Jabalí
RUS_WB1	Rusia	HM010473	Jabalí
RUS_WB2	Rusia	HM010472.1	Jabalí
RUS_WB3	Rusia	HM010471.1	Jabalí
SRI_CeyLAN	Sri Lanka - Ceylán	AM492594.1	Jabalí
URU_ARIAS	Uruguay - Arroyo Arias	GU937813	Jabalí
URU_LAVALLEJA	Uruguay - Río Cebollatí	GU937814	Jabalí
URU_ROCHA	Uruguay - Lascano	GU937815	Jabalí
URU_SANJOSE1	Uruguay - San José	GU937807.1	Jabalí
URU_SANJOSE2	Uruguay - San José	GU937819.1	Jabalí
SUS_VERR	Java	AJ314553.1	<i>Sus verrucosus</i>

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Variación de secuencia

En primer lugar se analizó un fragmento de 560 pb. para 44 secuencias del gen citocromo b, correspondientes a todas las secuencias obtenidas de las muestras de Argentina (n=23), junto a las secuencias obtenidas de GenBank (n=20) y el *outgroup* *Sus verrucosus* (n=1). Para ello se utilizó el software DnaSP, que agrupó el conjunto de secuencias en 17 haplotipos, uno de los cuales, hap_5, pertenecía al *outgroup*. (Tabla 5.1)

Tabla 5.1 detalle de los haplotipos obtenidos al analizar un fragmento de 560pb en la totalidad de las secuencias de *Sus scrofa* analizadas (n=44)

Haplotipo	Frecuencia	Secuencias
Hap_1	2	URU_SANJOSE2, URU_SANJOSE1
Hap_2	4	URU_ROCHA, SL_BATAVIA, RUS_WB1, ER_ELPALMAR3
Hap_3	1	URU_LAVALLEJA
Hap_4	1	URU_ARIAS
Hap_5	1	SUS_VERR
Hap_6	2	SRILANKA_Ceylan1, CHINA_HAINAN1
Hap_7	19	SL_CENTENARIO4, SL_CENTENARIO2, SL_CENTENARIO1, RN_NORQUINCO2, RN_NORQUINCO1, RN_CONESA2, RN_CONESA1, NQN_QUILLEN2, NQN_QUILLENQ, NQN_PILOLIL2, NQN_PILOLIL1, NQN_PEHUENIA, NQN_ELESPEJO, LP_RUTA1, ISR_WB1, ESP_WB3, ESP_WB2, BUL_WB3, BUL_WB2
Hap_8	1	SL_CENTENARIO3
Hap_9	1	RUS_WB3
Hap_10	1	RUS_WB2
Hap_11	4	RN_CONESA3, RN_CALETA, LP_CALEU, ER_ELPALMAR1
Hap_12	2	PORTUGAL_WB1, ESP_WB1
Hap_13	1	NQN_CATATUN
Hap_14	1	LP_CONHELO
Hap_15	1	JAP_WB1
Hap_16	1	IT_CER
Hap_17	1	BUL_WB1

Luego, se realizó un segundo análisis para el mismo grupo de secuencias pero excluyendo al *outgroup* (n=43), identificándose 28 sitios variables (polimórficos) para un total de 31 mutaciones y 13 sitios de mutación única (*singletons*). El análisis haplotípico reveló la presencia de 16 haplotipos, con un valor de diversidad haplotípica (Hd) de 0,794. La diversidad nucleotídica (Pi) fue 0,00923, mientras que el promedio de diferencias nucleotídicas (k) fue 5,134.

A continuación se restringió el análisis a las 23 secuencias obtenidas a partir de las muestras de Argentina, también utilizando el programa DnaSP. En este caso las secuencias se agruparon en 6 haplotipos, de los cuales 3 se encontraron representados por un solo individuo (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Detalle de los haplotipos obtenidos al analizar un fragmento de 560pb para las muestras colectadas de Argentina (n=23)		
<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Secuencias</i>
Hap_1	14	SL_CENTENARIO4, SL_CENTENARIO2, SL_CENTENARIO1, RN_NORQUINCO2, RN_NORQUINCO1, RN_CONESA2, RN_CONESA1, NQN_QUILLEN2, NQN_QUILLEN1, NQN_PILOLIL2, NQN_PILOLIL1, NQN_PEHUENIA, NQN_ELESPEJO, LP_RUTA1
Hap_2	1	SL_CENTENARIO3
Hap_3	2	SL_BATAVIA, ER_ELPALMAR3
Hap_4	4	RN_CONESA3, RN_CALETA, LP_CALEU, ER_ELPALMAR1
Hap_5	1	NQN_CATATUN
Hap_6	1	LP_CONHELO

Además se encontraron 15 sitios variables (polimórficos) con un total de 16 mutaciones, con 3 sitios de mutación única. El valor de diversidad haplotípica (Hd) fue de 0,613, con una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,00595 y promedio de diferencias nucleotídicas k=3,316. En la tabla 5.3 se detallan los sitios variables para cada haplotipo.

Tabla 5.3 Posiciones variables encontradas para un fragmento de 560pb del citocromo b, correspondientes a los 6 haplotipos encontrados para las 23 muestras de jabalí de Argentina utilizadas en el análisis. En la parte superior se muestra la ubicación de los sitios variables. Los puntos indican secuencias idénticas.

	2	3	11	15	116	263	297	299	302	306	344	363	461	497	557
Haplotipo 1	A	G	T	C	A	T	T	G	C	G	A	G	G	C	A
Haplotipo 2	T	T	.	.	G	C	C	A	T	A	.	A	A	T	G
Haplotipo 3	G	C	C	A	T	A	.	A	A	T	G
Haplotipo 4	.	.	.	A	G
Haplotipo 5	G
Haplotipo 6	.	.	C

5.2 Análisis filogenético

Se construyó el árbol filogenético a partir del método cladístico de Máxima verosimilitud (MV) (Figura 5.1). El árbol muestra dos clados, uno mayor (*bootstrap* 0,92) y uno menor (*bootstrap* 0,99). En el nivel basal el clado mayor comprende 19 secuencias lo que concuerda con el haplotipo 6, pertenecientes a jabalí español, búlgaro, israelí y portugués, junto con 6 de las 7 secuencias originarias de la provincia de Neuquén, 4 de las 6 secuencias de Río Negro y 3 de las 5 secuencias de San Luis. Luego se encuentran 7 subclados diferenciados del basal, uno compuesto por dos secuencias procedentes de Portugal y España, otro con cuatro secuencias, dos de Río Negro, una de La Pampa, cercanas geográficamente entre sí, y llamativamente una proveniente de Entre Ríos. Otro subclado incluye a tres secuencias de Uruguay, dos en el nivel basal, pertenecientes al departamento de San José, cercano a la ciudad de Colonia y otra más separada, que pertenece a Arroyo Arias (Departamento de Florida). Luego se observan 4 subclados, cada

uno compuesto por un haplotipo de secuencia única, Cerdeña (Italia), Conhelo (La Pampa), Catatún (Neuquén) y Bulgaria.

El clado menor está formado por dos subclados bien diferenciados, uno comprendiendo a una única secuencia de Japón, y el otro incluyendo en el nivel basal a una secuencia originaria de Rusia, otra secuencia del mismo origen separada del nivel basal y dos grupos más diferenciados comprendiendo el primero una secuencia de Ceylán (Sri Lanka), una de Hainan (China) y una más diferenciada de Lavalleja (Uruguay), y el segundo 4 secuencias provenientes de Rocha (Uruguay), Batavia (San Luis), El Palmar (Entre Ríos) y Rusia y una más diferenciada perteneciente a Centenario (San Luis). (Figura 5.1).

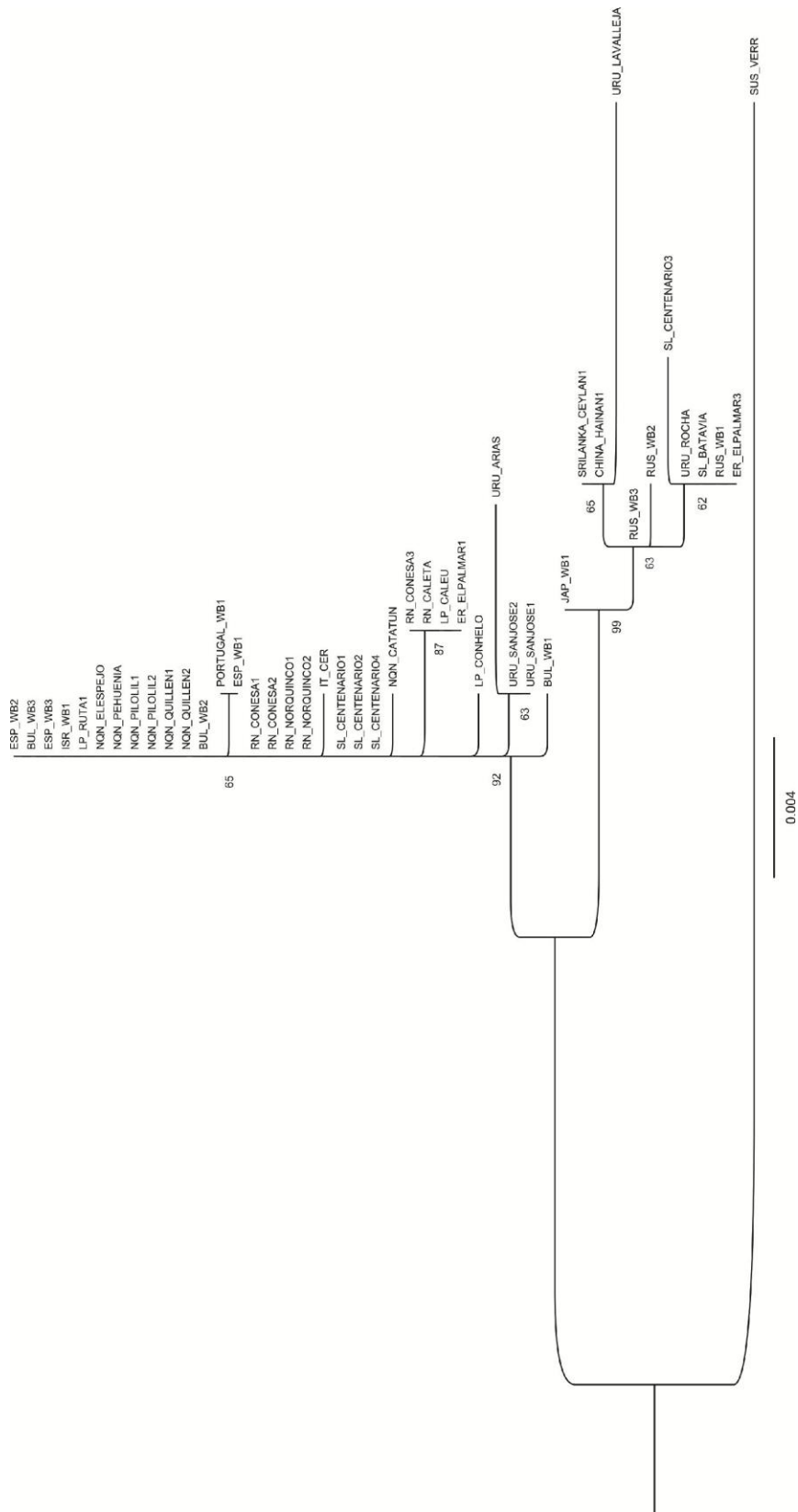


Figura 5.1: Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido para un fragmento de 560 pb. del gen citocromo b (n=44 incluido el *outgroup*). Los números en las ramas indican el valor de *bootstrap* de cada nodo.

5.3 Relaciones haplotípicas para las muestras de jabalí

Los resultados obtenidos para el análisis de relaciones haplotípicas (a partir de un abordaje de parsimonia) son concordantes con los resultados mostrados previamente. Muestran al haplotipo 1 con mayor frecuencia, del que se desprenden los haplotipos 5 y 6 más cercanos por poseer 1 mutación de diferencia, y el haplotipo 4, apenas más lejano por diferenciarse en 2 mutaciones. Los cuatro pertenecen al clado mayor observado en el árbol filogenético. Los haplotipos 2 y 3 se diferencian notablemente de este grupo, con 12 y 10 mutaciones respectivamente, a las que pertenecen muestras originarias de San Luis y Entre Ríos. Esta diferencia es consistente con el clado menor encontrado en la filogenia, relacionado con un perfil asiático (Figura 5.2).

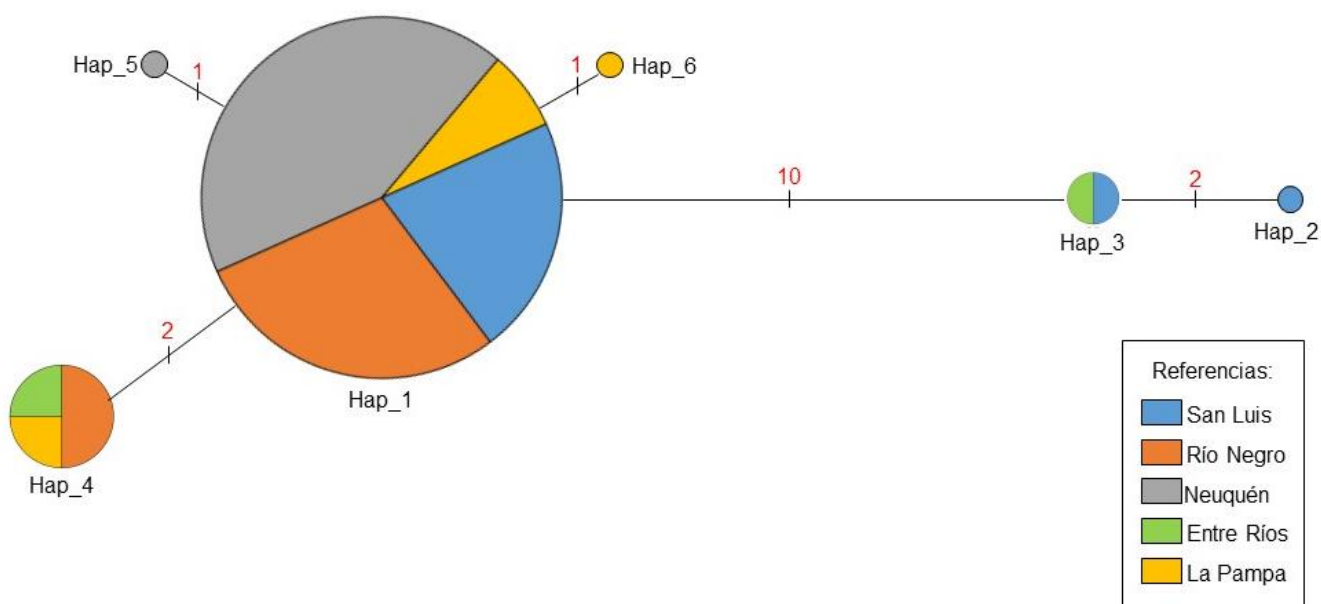


Figura 5.2: Relaciones haplotípicas observadas para las secuencias pertenecientes a las muestras (n=23). El diámetro de los círculos refleja la frecuencia de cada haplotipo. La longitud de las líneas de unión es proporcional al número de mutaciones existentes entre cada haplotipo.

Discusión

6. DISCUSIÓN

El presente estudio ofrece una primera aproximación al conocimiento de la variabilidad genética existente y del patrón de dispersión del jabalí en Argentina, a partir de los puntos de introducción.

Al analizar la variabilidad genética de las poblaciones argentinas se encontró que sólo el 2,6% del fragmento de citocromo b analizado (560pb.) resultó polimórfico, lo que podría traducirse en el bajo número de haplotipos encontrados en comparación con el trabajo de García y colaboradores (2011). El análisis haplotípico ($n=23$ secuencias), reveló la presencia de 15 sitios variables y 6 haplotipos, con valores de diversidad haplotípica y de diversidad nucleotídica de 0,613 y 0,00595 respectivamente. Estos resultados difirieron de los obtenidos por García y colaboradores (2011), quienes para $n=19$ secuencias, encontraron 39 sitios polimórficos y 14 haplotipos, la mayoría de los cuales incluían a un único individuo. También obtuvieron un valor alto de diversidad haplotípica ($Hd=0,97$) con niveles intermedios de diversidad nucleotídica ($Pi=0,014$). Estos autores plantearon dos hipótesis para explicar el alto valor de diversidad haplotípica obtenido: la existencia de polimorfismos ancestrales y/o la ocurrencia de múltiples eventos de hibridación e introgresión, éstos últimos sostenidos por análisis de caracterización fenotípica realizados por Herrero y Fernández de Luco (2003), quienes encontraron una alta diversidad de fenotipos que demostrarían el entrecruzamiento entre el jabalí y el cerdo doméstico. Teniendo en cuenta esto último, los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica encontrados para las muestras de Argentina, podrían explicarse porque la mayoría de las muestras provienen de zonas incluidas dentro de Parques Nacionales, donde el jabalí tendría menos posibilidades de cruzarse con el cerdo doméstico, tanto intencional como accidentalmente. No obstante, no debe descartarse la existencia de

entrecruzamiento, ya que la hibridación para las especies invasoras podría aliviar la pérdida de variabilidad genética ocurrida durante los eventos fundadores (Lee, 2002).

El árbol filogenético de máxima verosimilitud construido para la totalidad de las muestras (n=44) reveló dos clados: uno donde se ubicaban gran parte de las muestras junto con las secuencias de jabalí europeo; y uno de menor tamaño, que comprende el resto de las muestras y secuencias de jabalí asiático. Como era de esperarse, el *outgroup* se ubicó en un grupo separado.

En el clado mayor coinciden muestras de los ejemplares estudiados de las provincias de La Pampa, Río Negro, Entre Ríos, Neuquén y San Luis con la totalidad de las secuencias provenientes de los ejemplares europeos. De esto se desprende que la mayor parte de las poblaciones de Argentina pertenecerían a la subespecie *Sus scrofa scrofa*.

En este clado también se ubicaron tres secuencias de Uruguay, pertenecientes a jabalíes de localidades próximas a Colonia, el punto de introducción de la especie en ese país. Las tres secuencias se agruparon separadas del nivel basal, formando los haplotipos 1 y 4, que no son compartidos con secuencias de otro origen, lo que indica que las poblaciones argentinas y uruguayas de jabalí europeo originario del Cáucaso se han diferenciado, aunque tienen un pasado común. En la introducción de este trabajo se hizo mención a la posibilidad de que ejemplares de jabalí hayan escapado de su cautiverio en Colonia (Uruguay) y migrado bordeando el río Uruguay hasta cruzar a Entre Ríos invadiendo el Parque Nacional El Palmar. Los resultados obtenidos aquí no permiten apoyar o refutar esta hipótesis.

Al analizar en detalle los haplotipos presentes en el clado mayor, destaca el haplotipo 6 compuesto por 19 secuencias que comprenden a la región centro-este de la provincia de La Pampa, las localidades de Centenario (San Luis) y Conesa (Río Negro), junto con la zona cordillerana de Río Negro y de Neuquén. También se encuentran secuencias de jabalí israelí, español y búlgaro, lo que demuestra que este haplotipo pertenece al jabalí europeo/medio

oriente. La parte sur de esta amplia zona geográfica, se encuentra atravesada horizontalmente por el río Limay, que nace en el lago Nahuel Huapi (Río Negro), y que al confluir con el río Neuquén da origen al río Negro, que cruza la provincia homónima hacia el océano Atlántico. Las muestras provenientes del extremo cordillerano se encuentran a menos de 150 kilómetros del río Limay, y las del extremo costero directamente son atravesadas por el río Negro. Es probable que la migración se haya dado bordeando el margen de estos ríos, aunque todavía se desconoce la dirección en que ocurrió.

En el haplotipo 6 también se ubicaron tres secuencias de Centenario (San Luis); esto indica la presencia de jabalí europeo en esa provincia, y la posibilidad de que se hayan trasladado intencionalmente ejemplares desde la Patagonia hasta allí.

El haplotipo 10 comprende 4 secuencias provenientes del sudeste de La Pampa cercanas al límite con Río Negro, como así también de la localidad de Conesa (incluida también en el haplotipo 6) y de la reserva Caleta de los Loros. Como el punto de introducción fue La Pampa, es probable que algunos jabalíes hayan migrado hacia el sur, en dirección a la costa atlántica de Río Negro. En este haplotipo también se ubicó una secuencia del Parque Nacional El Palmar, lo que da indicios de la introducción deliberada en la provincia de Entre Ríos.

Los haplotipos 12 y 13 pertenecen a Catatún (Neuquén) y Conhelo (La Pampa) respectivamente, si bien ahora se conoce que tienen origen europeo, al ser de secuencia única, no se pueden inferir más detalles. La secuencia de Conhelo es de todas las muestras analizadas, la que se encuentra más próxima al punto original de introducción de la especie en el país.

El árbol filogenético también mostró un clado de menor tamaño al que pertenecen 6 haplotipos, dividido en dos subclados. En uno se ubicó una única secuencia proveniente de Japón, y en el otro las secuencias provenientes de jabalíes asiáticos, junto con dos

secuencias de jabalí ruso, dos secuencias provenientes de San Luis y una de Entre Ríos. Al igual que en García y colaboradores (2011), este clado resultó un hallazgo sorprendente, ya que tanto para Argentina como para Uruguay, no se esperaba que las poblaciones de jabalí tuvieran también un origen asiático. En el subclado que posee la mayor cantidad de secuencias se tienen cuatro subgrupos, dos de ellos formados por los haplotipos 8 y 9, cada uno incluyendo una única secuencia de origen ruso. Los otros dos subgrupos están compuestos por más de una secuencia. Uno formado por el haplotipo 3 correspondiente a una secuencia de río Cebollatí, departamento de Lavalleja (Uruguay) coincidiendo con el haplotipo 4 conformado por secuencias de China y Sri Lanka. El otro subgrupo está compuesto por dos haplotipos: el haplotipo 7 formado por una única secuencia de Centenario (San Luis), y el haplotipo 2 formado por secuencias pertenecientes a Batavia (San Luis), El Palmar (Entre Ríos), Rusia y Lascano (Departamento de Rocha, Uruguay). García y colaboradores (2011) obtuvieron los mismos resultados, con las secuencias de río Cebollatí y Lascano en el clado menor, formando un único haplotipo cada una, en este aspecto se diferencia de lo encontrado en nuestros análisis en donde ambas conforman haplotipos compartidos con más de una secuencia.

Para explicar este resultado en Argentina, se debe tener en cuenta que bordeando el curso del río Uruguay hacia el norte, la distancia que separa al Parque Nacional El Palmar de la frontera con Brasil es de aproximadamente 180 kilómetros. Una posible explicación para la aparición de este haplotipo en Entre Ríos es que jabalíes originarios de Brasil hayan migrado hacia el Sur, bordeando el río, aunque se necesitan más datos provenientes de Brasil para aceptar o rechazar esta hipótesis. Como se mencionó en la introducción, en Rio Grande do Sul, los haplotipos de origen asiático, por lo menos para la región D-loop indican la presencia de híbridos entre cerdos silvestres y domésticos, por lo que la aparición de haplotipos

asiáticos junto con las secuencias de Entre Ríos podría indicar la presencia de híbridos en esta provincia.

Con respecto a las secuencias de San Luis, se pueden sacar dos conclusiones. A partir del haplotipo 2 se puede inferir que se habrían trasladado intencionalmente jabalíes e híbridos desde El Palmar (Entre Ríos) hasta Centenario (San Luis), y del haplotipo 7 que aparentemente hay una población con origen asiático pero más diferenciada. De acuerdo con lo observado para esta provincia en los dos clados, se puede concluir la presencia de jabalí europeo y de híbridos de jabalí con el cerdo doméstico. Es posible que el entrecruzamiento entre estos ejemplares lleve con el tiempo a la pérdida de pureza de jabalí. Todo esto puede observarse con mayor claridad en la red haplotípica presentada en la figura 5.2.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

El análisis aquí realizado, basado en un fragmento del gen mitocondrial citocromo b confirma la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, comprobándose que las poblaciones silvestres de jabalí (*Sus scrofa*) de Argentina efectivamente surgen a partir de los tres centros de introducción, ubicados en las provincias de La Pampa, Río Negro y Entre Ríos. También hecha luz sobre el origen de la población entrerriana, que a diferencia de lo que se pensaba en un principio, posee dos orígenes, uno europeo y otro asiático, aunque no se sabe a ciencia cierta el proceso de hibridación de los dos linajes.

Otro aspecto importante a destacar es que hasta el presente, se creía que los jabalíes argentinos pertenecían a la especie *Sus scrofa scrofa*, es decir, jabalí europeo. La aparición de este clado de origen asiático indicaría la presencia de híbridos con el cerdo doméstico. A pesar de esto, los resultados obtenidos podrían indicar que en Argentina el jabalí no ha formado híbridos en gran medida con el cerdo doméstico y el feral, sobre todo en las poblaciones patagónicas, lo que indicaría mayor pureza de la especie, por lo tanto posee un mayor valor económico y cinegético, que puede potenciar internacionalmente los cotos argentinos.

El presente análisis, es solo introductorio y parcial, por lo que en el futuro se deberá realizar un análisis a mayor escala, a partir de la secuencia completa del gen citocromo b, y con un mayor número de muestras, de forma de representar el rango completo de expansión de esta especie en el país.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff, MD. Magalhaes, PJ. Ram, SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7): 36-42
- Alves, E. Ovilo, C. Rodriguez, MC. Silió, L. 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and Wild Pig populations. *Animal Genetics* 34: 319-324.
- Amieva, E. 1993. El Parque Luro. Su origen,- Su historia- Su presente. Fondo Editorial Pampeano. Pp 77-79.
- Aravena, P. Skewes, O. 2007. European Wild Boar purebred and *Sus scrofa* intercrosses. Discrimination proposals. A review. *Agro-Ciencia* 23(3): 133-147.
- Baccino Ponce de León, N. 1998. Aarón de Anchorena. Una vida privilegiada. Montevideo. Editorial Sudamericana. Pp 157-164.
- Bandelt, HJ. Foster, P. Rohl, A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraespecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37.48
- Berg, F. 2006. Genetic Analysis of Fat Metabolism in Domestic Pigs and their Wild Ancestor. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 164, Uppsala University, Uppsala, Sweden
- Bergmann, C. 1847. Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien* 3 (1): 595–708.
- Bradley, DG. MacHugh, DE. Cunningham, P. Loftus, RT. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European Cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5131-5135.
- Boisaubert, B. Klein, F. 1984. Contribution a l'étude de l'occupation de l'espace chez le sanglier (*Sus scrofa*) par capture et recapture. En: Les colloques de l'INRA n° 22. Ed. INRA Publ.Toulouse
- Campos, CM. Ojeda, RA. 1997. Dispersal and germination of *Proposis flexuosa* (Fabaceae) seeds by desert mammals in Argentina. *Journal of Arid Environments*, 35: 707-714
- Chebez, J.C. Rodriguez, G.O. 2013. La Fauna Gringa: especies introducidas en la Argentina. Primera edición. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. Buenos Aires
- Coblentz, B. 1990. Exotic Organisms: A dilemma for conservation biology. *Conservation Biology* 4(3): 261-265.
- Cuevas, M.F. Novillo, A. Campos, C. Dacar, M.A. Ojeda, R.A. (2010). Food habits and impact of rooting behaviour of the invasive wild boar, *Sus scrofa*, in a protected area of the Monte Desert, Argentina. *Journal of Arid Environments* 74:458-463

Daciuk, J. 1978. Estado actual de las especies de mamíferos introducidos en la subregión Araucana (República Argentina) y grado de coacción ejercido en algunos ecosistemas cordilleranos. *Anales de Parques Nacionales (Argentina)* 14: 105-130.

De Voos, A. Manville, R.H. Van Gelder, R.G. 1955. Introduced mammals and their influence on native biota. *Scientific Contributions of the New York Zoological Society*. 1956; N°16-19. *Zoologica* 41(4) 163-194.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

Fonseca, V. Saad, D. Da Silva, M.L. Reta, C. 2003. Programa de control del jabalí (*Sus scrofa*) dentro del Parque Nacional Lanín. Comunicación de la Administración de Parques Nacionales. Argentina.

García, G. Vergara, J. Lombardi, R. 2011. Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced in Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 34(2): 329-337.

Genov, PV. 2004. Craniometric characteristics of the subgenus *Sus* Linnaeus, 1758 and a systematic conclusion. *Galemys* 16: 9-23

Giuffra, E. Kijas, JMH. Amarger, V. Carlborg, Ô. Jeon, JT. Andersson, L. 2000. The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154(4): 1785-1791.

Godoy, JC. 1963. Fauna Silvestre. Serie: Evaluación de los recursos naturales de Argentina Tomo VIII. Consejo Federal de Inversiones (CFI). Buenos Aires. Pp 212-213.

Grossi, SF. Lui, JF. García, JE. Meirelles, FV. 2006. Genetic Diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA. *Genetics and Molecular Research*, 5(4): 564-568

Groves, CP. Grubb, P. 1993. The Eurasian suids, *Sus* and *Babyrousa* taxonomy and description. En: Oliver, WLR. (Ed.). *Pigs, Peccaries and Hippos, Status Survey and Conservation Action Plan*. International union for the Conservation of Nature. Gland. Pp. 107-111

Grubb, P. 2005. *Artyodactyla* en: *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed). Don E. Wilson & DeeAnn M. Reeder (editors). Johns Hopkins University Press, 2,142 pp

Guadagnin, DL. Carvalho Perello, KF. Gomes de Moura, R. 2014. Distribuição atual do javali (*Sus scrofa*) no Rio Grande do Sul, seus impactos na produção rural e nos ambientes naturais. *Federação Gaúcha de Caça e Tiro*.

Hall, T. 2004. BioEdit 6.0.7. Department of Microbiology, North Carolina State University. De <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Hernández-Baños, BE. Escandón, MG. Cortés-Rodríguez, MN. García Deras, G. 2007. Filogeografía de Aves Mexicanas en Eguiarte, L. Souza, V. Aguirre X. 2007. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

Herrero, J. Fernández de Luco, D. 2003. Wild boars (*Sus scrofa* L.) in Uruguay: Scavengers or predators?. *Mammalia* 90:666-674

Holdgate, MW. 1986. Summary and conclusions: characteristics and consequences of biological invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 314(B): pp 733-742

Lee, CE. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *TRENDS in Ecology & Evolution* 17(8).

Librado, P. Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Long, J. 2003. Introduced mammals of the world. Their history, distribution and influence. Csiro Publishing, Collingwood, Australia.

Lowe, S. Browne, M. Boudjelas, S. De Poorter, M. 2004. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Grupo de Especialistas de Especies Invasoras (GEEI), Comisión de Supervivencia de Especies (CSE). Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN). *Aliens*, Vol.12.

Lui, JF. 2000. Estudio cigenético de javalis (*Sus scrofa scrofa*) e híbridos nas regioes sudeste e sul do Brasil. *Revista da Educação continuada do CRMV-SP*, 3:43-48

Luikart, G. Gielly, L. Excoffier, L. Vigne, JD. Bouvet, J. Taberlet, P. 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5927-5932.

Maranta, A. 2004. Intensificación del control del jabalí en el Parque Nacional El Palmar. Comunicación de la Administración de Parques Nacionales. Argentina.

Massei, G. Genov, P. 2004. The Environmental impact of wild boar. *Galemys* 16: 135-145

Mayer, J. Brisbin, JR. 1991. Wild pigs in the United States: their history, comparative morphology, and current status. University of Georgia Press, Athens, USA

Medrano, JF. Aasen, E. Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*. 8(1): 43

Merino, ML. Tognelli, M. 2009. Assessing the invasive potential of wild boar and feral pig (*Sus scrofa*) in the southern cone of South America using predictive models of species distribution. 10th International Mammalogical Congress. Mendoza 9-14. August, 2009.

- Mona, S. Randi, E. Tommaseo-Ponzetta, M. 2007. Evolutionary history of the genus *Sus* inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45(2): 757-762.
- Navas, J. 1987 Los vertebrados exóticos introducidos en la Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales*. Tomo XIV, Nº2: 7-38.
- Novaro, AJ. Funes, MC. Walker, RS. 2000. Ecological extinction of native prey of a carnivore assemblage in Argentine Patagonia. *Biological Conservation*, 92: 25-33
- Novillo, A. Ojeda, RA. 2008. The exotic mammals of Argentina. *Biological Invasions*, 10: 1333-1344
- Oliva, E. 2011. “¿36... o no 36?... esa es la *une question*” Dirección de Ovinos, Porcinos, Aves Granja y Pequeños Rumiantes (DNPG). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. www.minagri.gob.ar
- Oliver, W. Leus, K. 2008. *Sus scrofa*. IUCN Red List of Threatened Species. International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) 2013 (Version 2013.1).
- Pescador, M. Sanguinetti, J. Pastore, H. Peris, S. 2009. Expansion of the introduced wild boar (*Sus scrofa*) in the Andean region, Argentinean Patagonia. *Galemys* 21: 121-132
- Randi, E. 1995. Conservation genetics of the genus *Sus*. *IBEX Journal of Mountain Ecology*. 3: 6-12.
- Rosell, C. Fernández-Llario, P. Herrero, J. 2001. El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys* 13(2)
- Rothschild, MF. Ruvinsky, A. 1998. *Genetics of the Pig*. Oxon, UK: CABI Press
- Sambrook, J. Russel, DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. En Sambrook J. y Russel DW. (Eds). *Molecular cloning, a laboratory manual* (pp 631-632). New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Silva, MP. Mauro, R. 2002. Utilización de pasturas nativas por mamíferos e herbívoros en el pantanal. *Archiva Zootechnica*, 51: 161-173
- Singer, FJ. 1981. Wild Pig Populations in National Parks. *Environmental Management*: 5(3), pp. 263-270
- Skewes, O. Morales, R. 2006. Crianza de jabalí (*Sus scrofa* L.) en Chile, distribución, tamaño y aspectos básicos de manejo. *Agro-Ciencia* 22(1): 29-36.
- Spitz, F. Janeau, G. Valet, G. 1984. Éléments de démographie du sanglier (*Sus scrofa*) dans la région de Grésigne. *Acta Aecologica, Aecologia applicata*

- Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipski, A. Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30(12): 2725-2729
- Vázquez-Domínguez, E. Castañeda-Rico, S. Garrido-Garduño, T. Gutiérrez-García, T. 2009. Avances metodológicos para el estudio en conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de Historia Natural* 82: 277-297.
- Watanobe, T. Okumura, N. Ishiguro, N. Nakano, M. Matsui, A. Sahara, M. Komatsu, M. 1999. Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 8: 1509-1512.
- Williamson, M. 1993. Invaders, weeds and the risk from genetically modified organisms. *Experientia* 49: pp. 219-224
- Williamson, M. Fitter, A. 1996. The Varying success of invaders. *Ecology* 77(6): pp 1661-1666
- Williamson, MH. Brown, KC. 1986. The analysis and modelling of British invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 314(B): pp. 505-522

Resumen

9. RESUMEN

El jabalí euroasiático *Sus scrofa* pertenece al género *Sus*, originario del sudeste asiático. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y puede presentarse en cuatro morfotipos distintos: jabalí silvestre, cerdo feral, cerdo doméstico (producto de la domesticación del jabalí) y como combinaciones híbridas de las anteriores.

En Argentina, el jabalí euroasiático es el único suido exótico silvestre introducido. La primera introducción data de 1904, cuando Pedro Luro introdujo siete ejemplares originarios de Francia a la estancia San Huberto de la provincia de La Pampa. El segundo evento ocurrió en la provincia de Río Negro, por Aarón de Anchorena quien trasladó algunos ejemplares de una estancia de su propiedad ubicada en Colonia, Uruguay, a otra estancia ubicada sobre la costa del lago Nahuel Huapi. El último evento ocurrió en la provincia de Entre Ríos a fines de la década de 1940, aunque el origen de estos jabalíes permanece desconocido. A partir de estos tres núcleos, las características de la especie sumadas a las condiciones adecuadas dieron origen a la expansión de la especie en el país, ocupando actualmente casi la totalidad de la región pampeana, el norte de la región patagónica y el sur de la región de Cuyo. Dentro de esta zona se encuentra un gran número de parques nacionales, donde el jabalí representa una amenaza para la integridad de estos ambientes valiosos para la conservación. Se han registrado otros focos de aparición, pero están relacionados a la dispersión activa del hombre. En Argentina el jabalí constituye una amenaza para las actividades agropecuarias y para la estabilidad de muchos ecosistemas, pero a pesar de esto constituye un recurso de alto valor económico, por la calidad de su carne y por su valor cinegético.

Para entender la dinámica de las poblaciones de Argentina, se deben considerar las posibles relaciones con las poblaciones de Uruguay, donde el jabalí se introdujo con fines

cinogénicos a principios del siglo XX, y del sur de Brasil, donde el jabalí se introdujo a fines del siglo XX con el fin de obtener híbridos con el cerdo doméstico para comercializar carnes exóticas.

Para caracterizar las relaciones filogenéticas entre las distintas poblaciones de jabalí silvestre de Argentina, y con el fin de determinar el patrón de expansión que esta especie tuvo en el país, se utilizó como marcador al gen mitocondrial citocromo b para el análisis filogenético como filogeográfico de esta especie en el país.