



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Caracterización genotípica del biotipo bovino “Pizan” mediante la utilización de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO EN ZOOTECNIA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

2. Ambiente y Biodiversidad.

2.1. Recursos Genéticos.

AUTOR: Juan David Arenas Garzón

ASESORA: MVZ. Mónica Patricia Velástegui Moreno. MsC.

IBARRA, SEPTIEMBRE – 2018



CERTIFICACIÓN DE ASESOR

Ibarra, septiembre, 2017

Mgs. Mónica Patricia Velástegui Moreno

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

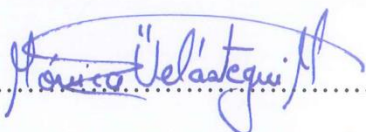
Mgs. Mónica Patricia Velástegui Moreno

C.C.: 0503323024



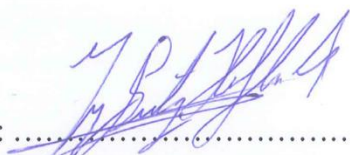
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f): 

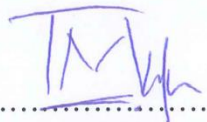
MVZ. Mónica Patricia Velástegui Moreno

C.C.: 0503323024

(f): 

MCs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

(f): 

MVZ. Tito Jorge Mendoza Cadena

C.C.: 1002802294



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Juan David Arenas Garzón, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 18 de septiembre de 2018

f): 

Juan David Arenas Garzón.

C.C.: 1.085.942.110



AUTORÍA

Yo, Juan David Arenas Garzón, portador de la cédula de ciudadanía N° 1.085.942.110, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f):

Juan David Arenas Garzón

C.C.: 1.085.942.110



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Juan David Arenas Garzón, con CC: 1.085.942.110, autor del trabajo de grado intitulado: “Caracterización genotípica del biotipo bovino ‘Pizan’ mediante la utilización de Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniero en Zootecnia, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 18 de septiembre de 2018

(f.).....

Juan David Arenas Garzón

C.C. 1.085.942.110



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: **“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL BIOTIPO BOVINO “PIZAN” MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP).”**, lo propuesto en el código de Ética de la Investigación y Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Para constancia firma:

(f).....

Juan David Arenas Garzón

C.I: 1.085.942.110

Ingeniería en Zootecnia



DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico con gran humildad a Dios por llenarme cada día de bendiciones y permitirme cumplir mis objetivos. A mi familia por apoyarme siempre, especialmente a mi madre, quien es mi ejemplo a seguir y mi más grande motivación. A mi novia, por ser mi motor, amigos, y demás personas que me acompañaron a lo largo de esta travesía estudiantil.

Juan David Arenas Garzón



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, Rosa Garzón, por guiar mis pasos para ser una persona de bien, por no dejarme caer en la lucha por conseguir este título, por ser mi más grande motivación y mi ejemplo a seguir.

A mi familia, que me ha acompañado en esta travesía y me ha brindado su apoyo incondicional para la consecución de este logro.

A mis compañeros con quienes compartí tantos años de aprendizaje, y que con su compañía hicieron que tanto esfuerzo pareciera un poco más llevadero.

A mis amigos de toda la vida, por apoyarme y respaldarme en todo momento.

Agradezco a mis docentes, quienes supieron impartir su conocimiento y me enseñaron a mejorar, no solo en el ámbito de la profesión, sino en el ámbito personal también. Especialmente a mi asesora: Mvz. Mónica Velástegui; y a mis lectores: Mvz. Tito Mendoza, MCs. Santiago Mlafla; quienes con su conocimiento, apoyo y entrega hicieron posible la realización del presente trabajo de titulación.

Juan David Arenas Garzón



RESUMEN

La presente investigación caracteriza genotípicamente el biotipo bovino Pizan, cuya buena producción de leche, alta rusticidad y adaptabilidad a condiciones adversas lo convierte en una excelente línea para la producción láctea del norte del país. Además tiene gran importancia genética ya que fue creado y desarrollado para las características geográficas y climáticas de la zona. Se realizaron muestreos en toda la provincia del Carchi, tomando puntos GPS para georreferenciar los sitios de muestreo. Se realizó un examen bovinométrico para estandarizar las características físicas del biotipo. Además se realizó una caracterización molecular utilizando Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) para conocer qué porcentaje de la genética original del biotipo se conserva aún en el ganado de la provincia. Se muestrearon en total 131 animales, de los cuales 27 tienen el 100% de similitud con el biotipo original (20.61%), lo cual indica que la genética se está perdiendo.

PALABRAS CLAVE

Pizan, biotipo, polimorfismo, caracterización, fenotipo, genotipo, Carchi.



ABSTRACT

The present investigation characterizes genotypically bovine biotype Pizan, whose good milk production, high rusticity and adaptability to adverse conditions makes it an excellent line for dairy production in the north of the country. It also has great genetic importance because it was created and developed for the geographic and climatic characteristics of the area. Samples were taken throughout the province of Carchi, taking GPS points to georeference the sampling sites. A bovinometric examination was performed to standardize the physical characteristics of the biotype. In addition, a molecular characterization was performed using Polymorphic Length Restriction Fragments (RFLP) to know how much of the original biotype genetics is still conserved in the province's cattle. A total of 131 animals were sampled, of which 27 have 100% similarity to the original biotype (20.61%), which indicates that genetics is being lost.

KEY WORDS

Pizan, biotype, polimorfism, characterization, fenotype, genotype, Carchi.

INDICE

RESUMEN	x
PALABRAS CLAVE	x
ABSTRACT	xi
KEY WORDS	xi
CAPITULO I	18
1.1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. EL PROBLEMA	18
1.1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.2. JUSTIFICACIÓN	19
1.3. OBJETIVOS	20
1.3.1. Objetivo General	20
1.3.2. Objetivos Específicos	20
1.4. PREGUNTAS DIRECTRICES	20
CAPÍTULO II	21
2.1. ESTADO DEL ARTE	21
2.1.1. El Biotipo Bovino Pizan	21
2.1.2. Caracterización fenotípica	23
2.1.2.1. Zoometría	24
2.1.2.2. Bovinometría	24
2.1.3. Caracterización genotípica	25
2.1.3.1. La caseína bovina:	26
2.1.3.2. El gen de la Kappa caseína bovina:	26
2.1.3.3. La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.1.3.4. Primers	27
2.1.3.5. Enzimas de restricción	28
2.1.3.6. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs):	29
2.1.3.7. Electroforesis	30
CAPÍTULO III	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Tipo de investigación	32

3.2.	Materiales	33
3.2.1.	Materiales físicos	33
3.2.2.	Materiales biológicos	33
3.2.3.	Materiales químicos	33
3.3.	Metodología desarrollada en el trabajo de campo	34
3.4.	Metodología desarrollada en laboratorio	41
3.4.1.	REACCIÓN EN LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	43
3.4.2.	SELECCIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	46
3.4.3.	DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	47
3.4.3.1.	Hind III	47
3.4.3.2.	HphI	48
3.4.4.	ELECTROFORESIS	48
CAPÍTULO IV		50
4.1.	RESULTADOS	50
4.1.1.	Caracterización fenotípica	54
4.1.2.	Caracterización genotípica	61
4.1.2.1.	Polimorfismos	61
4.1.2.2.	Similitud de muestras con el Biotipo Puro	63
4.1.3.	Socialización	77
4.2.	CONCLUSIONES	80
4.3.	RECOMENDACIONES	82
4.4.	ANEXOS	83
BIBLIOGRAFÍA		96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fenotípicas del bovino Pizan.....	22
Tabla 2. Posición de cebadores y enzimas de restricción en el gen de la Kappa caseína bovina (Csn3).....	47
Tabla 3. Muestreo realizado en diferentes puntos de la provincia del Carchi.....	50
Tabla 4. Puntos GPS y etiquetas de propietario para cartografía.....	52
Tabla 5. Medidas zoométricas y peso vivo. Datos promedio y con desviación para machos y hembras del biotipo bovino Pizan.	60
Tabla 6. Medidas obtenidas en la investigación de Alvear (2008).....	61
Tabla 7. Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HindII y datos de animales y propietarios.	66
Tabla 8. Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HphI y datos de animales y propietarios.	71
Tabla 9. Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HindIII y HphI y datos de animales y propietarios.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primers para PCR. Bogliolo, (2004).....	28
Figura 2. Análisis de and mediante RFLP. Dasgupta (2014).....	30
Figura 3. Elementos necesarios para realizar electroforesis. Salazar, Sandoval & Armendáriz, (2013).....	31
Figura 4. Toma de muestras en manga para inmovilizar los animales muestreados.....	34
Figura 5. Medición de altura a la cruz con Hipómetro.....	35
Figura 6. a. Alzada a la cruz; b. alzada a la grupa; c. largo de cuerpo.....	36
Figura 7. Medidas miembro anterior bovino. a. Escápula; b. húmero; c. radio; d. carpo; e. metacarpo; f. dedos; g. Perímetro torácico.....	37
Figura 8. a. Perímetro abdominal o barril. Medidas miembro posterior. b. Fémur; c. tibia; d. tarso; e. metatarso; f. dedos.....	37
Figura 9. a. Largo de cuello; b. alto de tórax; c. alto de barril.....	38
Figura 10. Distancia entre Ilión a Ilión; Distancia entre Isquion a Isquion.....	38
Figura 11. Perímetro escrotal en macho joven.....	38
Figura 12. Conformación de la ubre; vista lateral.....	39
Figura 13. Conformación de la ubre; vista posterior.....	39
Figura 14. Longitud de pezones delanteros.....	40
Figura 15. Muestreo de sangre en vena coccígea con kit vacutáiner y tubo de tapa lila.....	41
Figura 16. Mezcla de reactivos para la Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).....	44
Figura 17. Programación del termociclador para amplificar los fragmentos con los primers Csn3: f3-r3.....	45
Figura 18. Ingreso de muestras al termociclador.....	45
Figura 19. Mapa de georreferenciación de sitios de muestreo en la provincia del Carchi. Fuente: ArcGis.....	53
Figura 20. a. Alzada a la cruz: 1.33m; b. alzada al sacro: 1.39m; c. largo de cuerpo: 1.64m.....	55
Figura 21. Medidas miembro anterior bovino. a. Escápula: 0.62m; b. húmero: 0.4m; c. radio: 0.4m; d. carpo: 0.12m; e. metacarpo: 0.28m; f. dedos: 0.09m; g. Perímetro torácico: 1.96m.....	55
Figura 22. a. Perímetro abdominal o barril: 2.18m. Medidas miembro posterior. b. Fémur: 0.50m; c. tibia: 0.50m; d. tarso: 0.12m; e. metatarso: 0.42m; f. dedos: 0.10m.....	56
Figura 23. a. Largo de cuello: 0.58m; b. alto de tórax: 0.78m; c. alto de barril: 0.75m.....	56
Figura 24. Distancia entre Ilión a Ilión: 0.4m; Distancia entre Isquion a Isquion: 0.21m.....	57
Figura 25. Perímetro escrotal en macho joven: 0.32m.....	57
Figura 26. Conformación de la ubre; vista lateral.....	58
Figura 27. Conformación de la ubre; vista posterior.....	58
Figura 28. Longitud de pezones delanteros: 0.08m; longitud de pezones traseros: 0.05m.....	59

Figura 29. Electroforesis de digestión con enzima Hind III. Carril 1: MPM: Marcado de peso molecular (PCR Markers 50 loans-Promega); Carril 2: BP: Biotipo Pizan Puro; Carril 3-6: Muestras de animales presumiblemente Pizan; Carril 5: Presencia de polimorfismo.	62
Figura 30. Electroforesis de digestión con enzima HphI. Carril 1: MPM: Marcado de peso molecular (PCR Markers 50 loans-Promega); Carril 2: Biotipo Pizan puro; Carril 3-7 Muestras de animales presumiblemente Pizan. Carril 3: Presencia de polimorfismo.	63
Figura 31. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 61 muestras con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser cortadas con la enzima HindIII.	65
Figura 32. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 50%, 70% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HindIII.....	66
Figura 33. Grupo de muestras obtenidas del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 49 muestras con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser cortadas con la enzima HphI.....	70
Figura 34. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 40%, 60%, 80% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HphI.	70
Figura 35. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 27 muestras con la muestra denominada “BP” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser evaluadas las dos enzimas utilizadas en el estudio; HindIII y HphI.....	74
Figura 36. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 40%, 60%, 80% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HindIII y HphI.	75
Figura 37. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la comunidad?	77
Figura 38. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?	78
Figura 39. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?.....	79
Figura 40. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿en función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que estos se cumplieron?	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de punto GPS.....	83
Anexo 2. Ganado Pizan muestreado en el Ángel-Carchi	83
Anexo 3. Extracción de sangre a ternero Pizan en San Gabriel-Carchi	84
Anexo 4. Macho Pizan	84
Anexo 5. Extracción de sangre a macho adulto.	85
Anexo 6. Propietario junto a ejemplar muestreado	85
Anexo 7. ADN extraído de muestras de sangre	86
Anexo 8. Corte con enzimas de restricción.....	86
Anexo 9. Mezcla de reactivos para reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).....	87
Anexo 10. Solidificación de gel de agarosa al 1%.....	88
Anexo 11. Elaboración de gel de agarosa al 1%	88
Anexo 12. Muestras cortadas con enzima HindIII en Csn3 f3-r3	89
Anexo 13. Cebador Csn3 r3.....	89
Anexo 14. Enzima de restricción HindIII	90
Anexo 15. Microcentrífuga	90
Anexo 16. Transiluminador Uv.....	91
Anexo 17. Cámara de electroforesis	91
Anexo 18. Kit de extracción de ADN	92
Anexo 19. Cámara de flujo laminar	93
Anexo 20. Asistencia a socialización.....	93

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El biotipo bovino Pizan fue creado específicamente para las condiciones de la provincia del Carchi, norte del Ecuador. Su excelente adaptabilidad a pisos altitudinales altos y a temperaturas muy bajas, así como su resistencia a parásitos y su gran capacidad de producción de leche hacen que este biotipo tenga una gran importancia en la producción de leche de la zona norte del país; de allí surge la importancia de preservar y conservar su genética pura. Lastimosamente debido a cruza indiscriminadas de dichos animales con semovientes de otras razas, la genética de este biotipo bovino se ha ido perdiendo con el pasar de los años. Los productores y personas que han llegado a tener el biotipo, lo han cruzado sin control alguno, obteniendo cruza que; si bien les pueden dar buenos resultados; han ido propiciando que existan cada vez menos ejemplares puros de este biotipo bovino (Almeida, y otros, 2003).

A esto se suma que en la actualidad no existe quien almacene sin fines comerciales la genética de estos animales; por tanto, no existe un lugar donde dichos genes se encuentren resguardados y puedan ser utilizados para beneficio de los productores lecheros de la provincia del Carchi. Además, en los últimos años no han existido estudios acerca de cuál es la situación del genotipo de este biotipo bovino a nivel de la provincia del Carchi, por lo cual no se sabe si aún existen o no animales puros de dicha genética; o si existen animales cuya genética se asemeje a la del biotipo puro (Alvear, 2008).

Por estas razones es de vital importancia realizar la descripción fenotípica y genotípica del biotipo. La descripción fenotípica permitirá conocer más de las características físicas que tiene el biotipo, no solo en apariencia, sino también en cuanto a características productivas, reproductivas, fisiológicas y demás. La descripción genética podrá permitirnos saber cuáles son los ejemplares más puros. La conservación del ADN de éstos ejemplares tiene gran significancia, ya que dicho ADN podrá ser utilizado para posteriores investigaciones o trabajos que permitan que la producción de leche en el Carchi se vea beneficiada, ya sean los grandes productores, así como los pequeños productores de la provincia.

1.1. EL PROBLEMA

1.1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El problema radica principalmente en que la genética de este biotipo bovino se ha ido perdiendo en los últimos años, debido a las cruas indiscriminadas con individuos de otras razas. A esto se suma que en la actualidad no existe quien almacene sin fines comerciales la genética de estos animales; por tanto no existe un lugar donde dichos genes se encuentren resguardados y puedan ser utilizados para beneficio de los productores lecheros de la provincia del Carchi.

Además, desde los años 60 no han existido estudios acerca de cómo se encuentra el genotipo de este biotipo bovino a nivel de la provincia del Carchi, por lo cual no se sabe si aún existe o no animales puros de dicha genética; o si existen animales cuya genética se asemeje a la del biotipo puro.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El biotipo bovino Pizan fue creado específicamente para las condiciones de la provincia del Carchi. Su excelente adaptabilidad a pisos altitudinales altos y a temperaturas muy bajas, así como su resistencia a parásitos y su gran capacidad de producción de leche hacen que este biotipo tenga una gran importancia en la producción de leche de la provincia del Carchi; de allí surge la importancia de preservar y conservar su genética pura.

Lastimosamente debido a cruas indiscriminadas de dichos animales con semovientes de otras razas, la genética de este biotipo bovino se ha ido perdiendo con el pasar de los años. Los productores y personas que han llegado a tener el biotipo, lo han cruzado sin control alguno, obteniendo cruas que; si bien les pudieron haber dado buenos resultados; han ido propiciando que existan cada vez menos ejemplares puros de este biotipo bovino.

Por estas razones es de vital importancia realizar la descripción fenotípica y genotípica del biotipo. La descripción fenotípica permitirá conocer más de las características físicas que tiene el biotipo, no solo en apariencia, sino también en cuanto a características productivas, reproductivas, fisiológicas y demás. La descripción genética podrá permitirnos saber cuáles son los ejemplares más puros. La conservación del ADN de dichos ejemplares tiene gran significancia, ya que dicho ADN podrá ser utilizado para posteriores investigaciones o trabajos que permitan que la producción de leche en el Carchi se vea beneficiada, ya sean los grandes productores así como los pequeños productores de la provincia.

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Caracterizar genotípicamente el biotipo bovino “Pizan” mediante la utilización de Fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) para encontrar los ejemplares más puros.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Georreferenciar el biotipo bovino Pizan en la provincia del Carchi, por medio de coordenadas GPS para conocer la localización exacta de los ejemplares.
- Caracterizar fenotípicamente el biotipo bovino Pizan mediante descripción física para encontrar la bovinometría característica del biotipo.
- Caracterizar genotípicamente el biotipo bovino Pizan mediante la utilización de Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) con primers específicos.

1.4. PREGUNTAS DIRECTRICES

¿Cuál ha sido la distribución geográfica del biotipo bovino “Pizan” a nivel de la provincia del Carchi?

¿Cuáles son los rasgos físicos que caracterizan al biotipo bovino “Pizan”?

¿Cuáles de los ejemplares muestreados y caracterizados genéticamente tienen más porcentaje de pureza del biotipo bovino “Pizan”?

CAPÍTULO II

2.1. ESTADO DEL ARTE

2.1.1. El Biotipo Bovino Pizan

El biotipo bovino Pizan es un tipo de ganado creado en la comunidad de Pizan, parroquia de la Paz del cantón Montufar en la provincia del Carchi, por el genetista Manuel J. Bastidas junto a su hijo Germán Bastidas Vaca. Bastidas G. (2010) relata en su blog la vida de Manuel J. Bastidas, sus obras y trabajos; los cuales lo llevaron a ser considerado el primer genetista ecuatoriano, además de ser reconocido por el Instituto de Ciencias Agrícolas de Moscú como el más grande genetista de Sudamérica.

Durante muchos años Manuel J. Bastidas se dedicó al estudio de la genética, empezando a principios del siglo XX, tuvo que aprender francés para poder estudiar la poca literatura que existía en la época, por cuanto ésta sólo se encontraba en dicho idioma. Trabajó siempre de la mano de su hijo Germán, con quien compartió grandes trabajos y fue quien tomó la posta de los trabajos en genética después de su fallecimiento.

Estos dos grandes genetistas, padre e hijo, lograron un sinnúmero de cruza genéticas de diferentes especies tanto de animales como de plantas. Entre sus trabajos más reconocidos se encuentra la creación de 90 variedades de papas, de entre las cuales destaca la famosa *Curipamba* o la *Súper Chola*; esta última se ha posicionado como líder del mercado y además, es la favorita de la mayoría de productores y consumidores. Adicionalmente estos dos investigadores documentaron y crearon alrededor de 17 nuevas variedades de trigo; la más reconocida es la variedad *Mútico Azul 150*. (Bastidas, 2010)

Sin duda alguna, uno de los más grandes trabajos de estos dos genetistas carchenses es la creación del biotipo Bovino Pizan, el cual es reconocido por su increíble adaptabilidad a zonas altas con temperaturas muy bajas, propias de la provincia del Carchi y la zona norte de la Sierra Ecuatoriana. Este biotipo es capaz de adaptarse tan bien a estas condiciones extremas que aparte de su rusticidad frente al frío, enfermedades y parásitos, se reconoce también su excelente producción de leche, tanto en volumen como en calidad.

En su informe final de tesis Cuasapás (2012) expresa que en el año de 1945 Manuel J. Bastidas seleccionó el mejor ganado criollo de color barroso en cuanto a producción de leche, y los cruzó con un toro Holstein Americano. Mediante cruas controladas, para el año de 1955, ya tenía 10 vacas de color barroso, de la línea que él denominó Pizan.

Almeida y otros (2004) definen a las vacas del biotipo Pizan como animales de mediana estatura, los toros son grandes (herencia de sexo ligado), algunos de ellos han sobrepasado las 2.200 libras de peso vivo. Las vacas son de temperamento dócil y de carácter vigoroso, tienen pecho amplio, costillar arqueado y aplomos bien insertados y robustos, ubre globosa y bien insertada, cabeza femenina, ojos apacibles, piel oscura con pelos claros de color barroso; típico de este biotipo. Otras características del biotipo bovino Pizan se muestran a continuación en la tabla 1.

Tabla 1.

Características fenotípicas del bovino Pizan

CARACTERÍSTICAS		%
PIEL	Rosado	95.65
	Café	4.35
PELAJE	Café con blanco	73.91
	Café oscuro	7.83
	Café claro	13.04
	Café medio	5.22
LENGUA	No pigmentado	92.17
	Pigmentado	5.22
MORRO	No pigmentado	5.22
	Pigmentado	94.78
MUCOSAS	No pigmentadas	35.65
	Pigmentadas	63.48

CUERNOS	No pigmentados	3.48
	Pigmentados	1.74
PEZUÑAS	Blancas	53.04
	Negras	16.52
	Pigmentadas	30.43
Almeida y otros (2004)		

En su investigación Vidal (2009) estimó que la producción de leche diaria de las vacas Pizan era en promedio $11,53 \text{ lt} \pm 3.975$ al día; presentando un mínimo de 7 L y un máximo de 19.5 L. Cabe recalcar que las vacas evaluadas en dicha investigación estaban en diferentes etapas de lactancia (unas en lactancia normal y otras por secar) por lo que se observa bastante variabilidad en la producción lechera diaria de las mismas.

Dichos valores en producción son bastante buenos si consideramos que la producción de leche en el Carchi va desde los 7.4 hasta los 15,6 L (Bonifaz & Riquelme, 2012).

2.1.2. Caracterización fenotípica

Se refiere a la realización de un examen físico del animal, en el cual se identifican todas sus características, las cuales diferencian a una variedad, biotipo o raza de otra. Dichas características son importantes a la hora de identificar animales que sean dispares de otros de su misma especie para encasillarlos en categorías como líneas o razas. Una de las herramientas más útiles a la hora de realizar una caracterización fenotípica es la zoometría, y dentro de ésta, la bovinometría.

Para efectos del desarrollo de la presente investigación a partir de las observaciones, mediciones y análisis de resultados, se llega a la determinación de las características fenotípicas del ganado Pizan, por lo tanto, se tendrán en consideración aspectos relevantes que aportan la zoometría y la bovinometría, a saber (Almeida, y otros, 2003):

2.1.2.1. Zoometría

Para Flores, J. (1985), la zoometría es la rama de la Zootecnia que estudia las medidas de las diversas regiones corporales susceptibles de poderse tomar, aplicándolas a relaciones existentes entre estas y el valor económico de su explotación. Todo esto con el objetivo de estandarizar las características físicas del ganado Pizan.

2.1.2.2. Bovinometría

Alvear, F. (2008) expresa en su tesis de grado que la bovinometría es el estudio de la conformación exterior de los bovinos, para poder así determinar las principales medidas corporales y sus relaciones mediante índices; pudiendo así evaluar el crecimiento, desarrollo corporal, capacidades productivas, etc. Es una herramienta supremamente útil en la comparación de medidas tomadas dentro de una raza para saber si dichas medidas se han visto afectadas a lo largo del tiempo, aumentando, disminuyendo, o permaneciendo iguales.

Dentro de las más importantes medidas anatómicas podemos destacar:

- Alzada a la cruz
- Alzada a la grupa
- Longitud del cuello
- Anchura del cuello
- Largo del cuerpo
- Diámetro dorso-esternal
- Diámetro bicostal
- Longitud de grupa
- Perímetro torácico
- Perímetro de la caña
- Altura de la ubre
- Perímetro escrotal

El doctor Gordon Atkins (2006) expresa que las características de conformación más importantes relacionadas con la supervivencia funcional de la vaca lechera son:

- **La conformación de la ubre:** la forma, posición y fuerza de las inserciones de la ubre son muy importantes, ya que existe una estrecha relación entre dichas características y la longevidad y salud de la glándula mamaria bovina. Esto repercutirá directamente en la cantidad y calidad de la leche que el animal produzca, no resulta rentable tener animales con baja producción, ni tampoco animales con alta producción pero con inserciones del ligamento suspensorio de la ubre débiles que la hagan más propensa a lesiones y obligue a un descarte temprano de los animales.
- **Conformación de pies y patas:** la conformación morfo estructural de los miembros del animal, así como la biomecánica del movimiento al caminar con normalidad tienen un impacto grande en la supervivencia funcional del ganado lechero; dicho impacto radica en la imprescindible necesidad de locomoción de los animales para buscar alimento o satisfacer todas sus necesidades básicas, como buscar sombra, agua, etc.
- **Conformación torácica y abdominal:** esta conformación nos da las pautas para conocer la capacidad productiva del ganado. La conformación torácica ayudará a oxigenar y bombear la sangre necesaria para la producción de leche. La conformación abdominal dicta la capacidad de ingesta de alimento del animal; dicho alimento se convierte en la materia prima para suplir las necesidades de supervivencia corporal y para la producción láctea.
- **Estructura de la grupa y lomo:** la grupa y lomo es la zona de convergencia de muchas estructuras importantes de la región pélvica, las patas traseras se articulan con la pelvis y la posición de los iliones e isquiones define la anchura permisible de la pelvis para adaptar la ubre trasera lo más ancha y grande posible. Una grupa ancha y con una correcta inclinación es característica de un canal de parto deseable, que permite que el ternero nazca con facilidad y reduciendo la incidencia de distocias e infecciones como metritis.

2.1.3. Caracterización genotípica

El **genotipo** se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN¹. El genotipado se usa para determinar qué variaciones específicas existen

¹ El **ácido desoxirribonucleico**, abreviado como **ADN**, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus, también es responsable de su transmisión hereditaria. La función principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información para construir otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de ARN. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, pero las otras secuencias de ADN tienen propósitos estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética.

en el individuo. El genotipo, junto con factores ambientales que actúan sobre el ADN, determina las características intrínsecas e inherentes que diferencian al organismo, es decir, su fenotipo.

Algunos de los aspectos relevantes a tener en cuenta dentro de la caracterización genotípica son los referentes a la caseína bovina y el gen de la Kappa caseína

2.1.3.1. La caseína bovina:

La leche bovina tiene alrededor del 3.5% de proteínas en su composición (de 2.9% al 3.9%), según Agudelo & Bedoya (2005). Este porcentaje de proteína puede ser dividido en dos segmentos significativos, los cuales son: caseínas y proteínas séricas.

Las proteínas séricas representan el 20% del total de la proteína láctea, y se pueden dividir en albúminas y globulinas. Las albúminas son susceptibles a los cambios de temperatura, en especial al calor, por lo cual al elevar bastante la temperatura se degrada la gran mayoría de dicho compuesto. Las globulinas, por su parte, varían mucho su concentración a lo largo del periodo de lactación, siendo mucho más abundantes en el calostro (16% del total de la proteína de la leche) y disminuyendo drásticamente con el pasar los días de lactancia (9% del total de la proteína de la leche).

Las caseínas componen la mayor cantidad de la proteína presente en la leche, aproximadamente el 80%. De este grupo de proteínas se derivan: α 1-caseína (CSN1S1), α 2-caseína (SCN1S2), β -caseína (CSN2) y K-caseína (CSN3) además de γ -caseína (γ -CN) la cual se encuentra en menor proporción, y se deriva de la degradación de β -caseína (CSN2). (Pacheco, 2010)

Tal como indica Trujillo, Noriega & Camargo et al. (2000) La Kappa caseína es una proteína compuesta por 169 aminoácidos que presentan dos importantes variantes, kappa-caseína A y kappa caseína B, dadas por los alelos A y B respectivamente. Estas variantes alélicas difieren en la composición de aminoácidos de la kappa-caseína. La variante A, en la posición 136, tiene treonina (T); mientras que la variante B tiene isoleucina (I). De igual manera, en la posición 148, la kappa-caseína A tiene asparagina (N); y la kappa-caseína B tiene alanina (A).

2.1.3.2. El gen de la Kappa caseína bovina:

El gen responsable de la producción de k-caseína es el Csn3, que se ubica en el cromosoma 6 (Zepeda, 2013), su tamaño completo es de 13 kb y está formado por cinco exones y cuatro intrones (Pacheco, 2010), además posee 11 variantes alélicas generadas por el cambio de un

aminoácido en un codón. Los alelos de Csn3 más encontrados en los bovinos son el A, B y E. La variante alélica más común en la ganadería de leche es la A, a excepción del ganado Jersey, en el que la variante de mayor frecuencia es la B.

Pacheco también indica que la razón por la cual este gen es uno de los más utilizados en la caracterización genética de razas de ganado es que la caracterización de sus polimorfismos ha ayudado a deducir su gran influencia para la industria lechera, principalmente la quesera. Además el gran papel que desempeña el gen Csn3 en la regulación del tamaño de las micelas y en propiciar la suspensión de las caseínas en la leche, ha conducido al amplio estudio que se le ha dado a este gen en la investigación de razas lecheras.

2.1.3.3. La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de la cadena de la polimerasa, como indica Watson y otros (2008), es un método de amplificación de segmentos específicos de ADN muy poderoso. Es un método *in vitro*, ya que solo utiliza procedimientos bioquímicos para realizar la amplificación. La PCR toma la ADN polimerasa, que forma un enlace fosfodiéster entre nucleótidos (Pérez & Noriega, 2008), dirigiendo la síntesis de ADN tomando como base sustratos desoxinucleótidos y actuando sobre una plantilla de ADN monocatenario.

El primer paso para la PCR es desnaturalizar la plantilla de ADN con calor, posterior a ello se unen los cebadores o primers sintéticos que marcarán los límites de replicación del fragmento de ADN que se desea amplificar. Luego se emplea ADN polimerasa para duplicar la plantilla monocatenaria por medio de su extensión con cebadores. El segundo paso es desnaturalizar nuevamente la cadena de ADN, se unen cebadores y se usa como plantilla fresca de replicación de ADN, es importante señalar que en esta segunda ronda la síntesis de ADN se da tanto de la plantilla original, como de la plantilla resultante de la amplificación anterior. De este modo se repite el proceso durante 32 ciclos. La cantidad de ADN aumenta en forma geométrica con cada ciclo de la reacción en cadena.

2.1.3.4. Primers

Un primer (partidor, cebador, iniciador), es una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta que contiene un grupo 3'hidroxilo libre, que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

La secuencia y posición de los nucleótidos que conforman el primer se relaciona directamente con la especificidad del fragmento de ADN que se intenta replicar. Se necesitan dos primers para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para la otra hebra y se componen de aproximadamente 20 nucleótidos. (Clin, 1999)

La Figura 1 indica el modo en que los primers se unen al segmento diana de ADN, tanto en forward (de 5' a 3') como en reverse (de 3' a 5').



PCR Primers

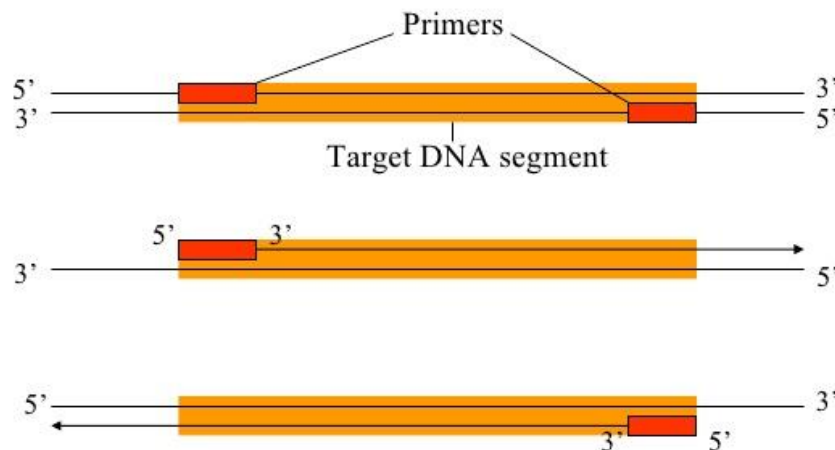


Figura 1. Primers para PCR. Bogliolo, (2004)

2.1.3.5. Enzimas de restricción

Izquierdo (2014) expresa que las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen dianas específicas en el ADN, estas dianas son conocidas como sitios de restricción, y cada enzima tiene uno específico. Por la sucesión en el tiempo de su descubrimiento y por sus características, las enzimas de restricción han sido clasificadas como enzimas de tipo I, II y III:

- **Enzimas de tipo I:** Las enzimas de restricción de *E. coli* fueron las primeras en aislarse, pero no por ello son las más sencillas. Al inicio de la clasificación se encasillaron ciertas enzimas que con el pasar del tiempo y con el cambio de sistema no cumplían por completo las características de clasificación.
- **Enzimas de tipo II:** estas son las que mejor se han estudiado, reconocen secuencias específicas de ADN, generalmente de 4-8 pb, y cortan ambas cadenas de ADN en un lugar concreto y coincidente entre sí. La primera enzima de restricción del tipo II en aislarse y sintetizarse fue la Hind II en 1970.
- **Enzima de tipo III:** Son relativamente raras y no se utilizan en manipulaciones genéticas.

2.1.3.6. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs):

Cheriyedath (2016) indica que el polimorfismo de longitud de fragmento de Restricción (RFLP) es una técnica desarrollada en el año de 1984 por el científico Inglés Alec Jeffreys durante su trabajo investigando enfermedades hereditarias. Se utiliza para el análisis de modelos únicos en el ADN. Dicha técnica hace fragmentos para distinguir genéticamente entre dos o más organismos.

Pavan (s.f.) define a los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) como un tipo de polimorfismo que resulta de la variación en la secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción. Estas son enzimas bacterianas que utilizan los científicos para cortar moléculas de ADN en lugares específicos. Los RFLPs se utilizan como marcadores en los mapas genéticos, por lo general, para visualizar los RFLPs se utiliza la electroforesis en gel.

Dicha técnica ayuda a identificar el mapa genético de un animal, planta o humano. En el caso de la presente investigación, nos servirá para que las enzimas corten la molécula de ADN en un lugar específico en el genoma puro del biotipo bovino Pizan; luego se comparará estos lugares de corte con los lugares de las muestras de ADN recolectadas en campo; todo esto con el fin de identificar cuál o cuáles de las muestras recolectadas en campo tienen mayor similitud en los sitios de corte con la muestra del biotipo puro.

La Figura 1 muestra un resumen del proceso de análisis de ADN mediante los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs)

DNA Analysis by RFLP

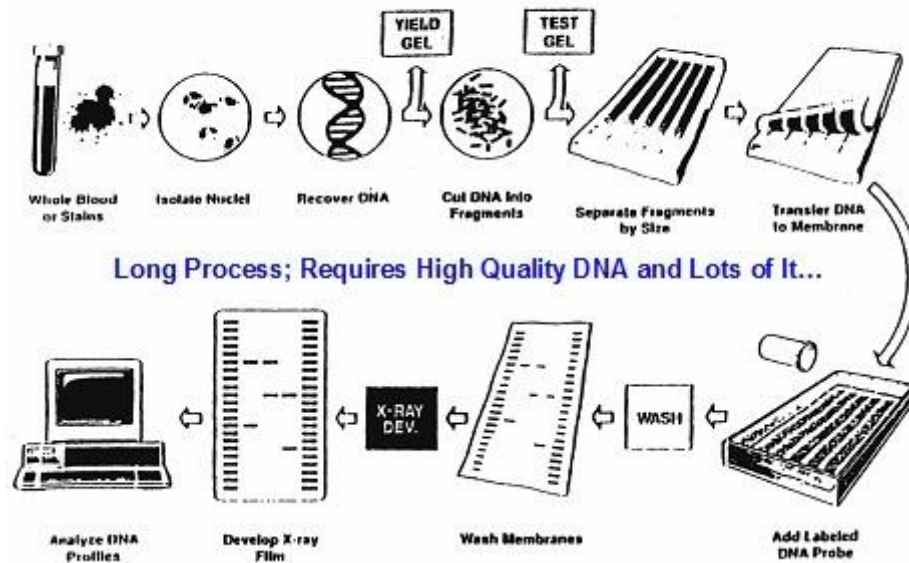


Figura 2. Análisis de and mediante RFLP. Dasgupta (2014)

2.1.3.7. Electroforesis

La electroforesis es una técnica muy importante, ya que la gran mayoría de los procedimientos utilizados en biología molecular requieren del uso de la electroforesis para la observación de sus resultados; tal como indican Salazar, Sandoval y Armendáriz (2013). La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica; la electroforesis consiste en utilizar dichas cargas para desplazar las moléculas al crear un campo electromagnético hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. (Yábar, 2003) Expresa que para realizar electroforesis son necesarios los siguientes elementos, observados también en la figura 3:

- **Cámara de electroforesis:** es un dispositivo que permite crear un campo electromagnético alrededor de un gel donde se depositan las muestras a correr.
- **Gel:** puede ser de agarosa, poliacrilamiada u otro material que sirva de medio de soporte para las muestras a correr. Mientras menor sea la concentración del gel, más fácil se desplazarán las muestras sobre el mismo.
- **Buffer de corrimiento:** es una sustancia con el mismo pH y composición con la que se elabora el gel de electroforesis.
- **Marcador de peso molecular:** son moléculas que permiten determinar el tamaño de las muestras de las muestras por comparación.
- **Buffer de carga:** tiene como fin dar peso, densidad y color a la muestra que se va a correr.
- **Transiluminador Uv:** es un dispositivo que permite transmitir luz ultra violeta, excitando la molécula cromo génica que emite energía fluorescente y permite observarla.

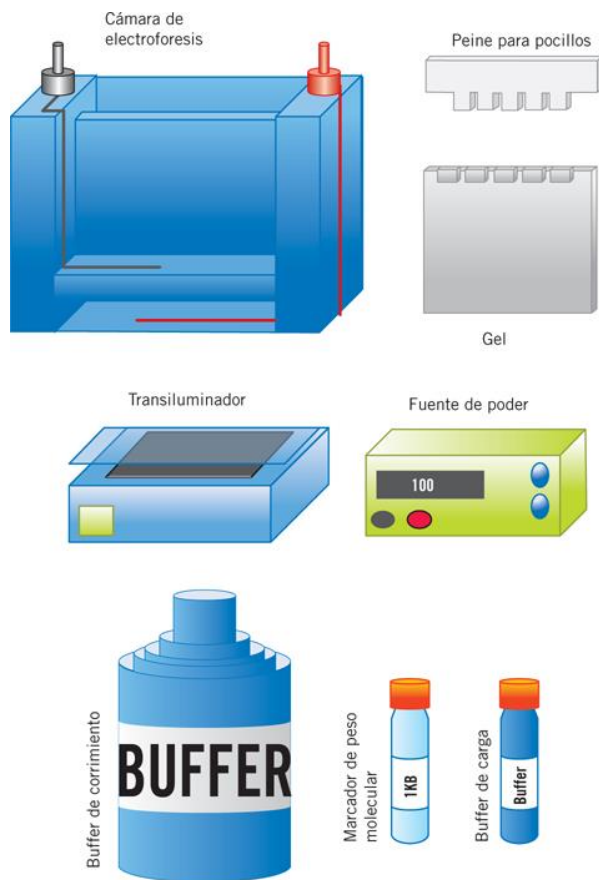


Figura 3. Elementos necesarios para realizar electroforesis. Salazar, Sandoval & Armendáriz, (2013)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

En el presente proyecto, al realizar un análisis de su propósito u objeto de estudio, la metodología aplicada para lograr los objetivos planteados y los instrumentos aplicados para conseguir los resultados; se llega a la determinación del tipo de investigación en el que se halla enmarcado.

El objetivo de esta investigación es llegar a la caracterización genotípica del biotipo bovino “Pizan” mediante la utilización de Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), para ello se planifican y ejecutan procedimientos en dos ambientes de aprendizaje; el primero es el trabajo de campo realizado en la provincia del Carchi, en el cual se realizan acciones encaminadas a la ubicación de los animales, toma de muestras y preservación de las mismas a través de la aplicación de protocolos preestablecidos y otros planteados en virtud de los conocimientos adquiridos durante la formación profesional de la carrera.

Las actividades consiguientes corresponden a procesos de extracción de ADN y el análisis y comparación de evidencias que conducen a la caracterización genotípica. Estos procesos también se soportan en protocolos, uso de software específico y se desarrollan en el laboratorio de biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCEI.

Por todo lo anterior, se puede establecer que el tipo de investigación utilizada para la consecución de los objetivos planteados corresponde una investigación descriptiva. Según lo precisa Mario Tamayo (2014), “comprende descripción, registro, análisis e interpretación de la naturaleza actual y la composición o procesos de los fenómenos; trabaja sobre realidades de hecho, y su característica fundamental es la de presentar una interpretación correcta de los fenómenos observables” (pág. 44-45)

Según lo expresado por el autor:

La tarea del investigador en este tipo de investigación tiene las siguientes etapas:

- Descripción de la necesidad, problema o situación.
- Fundamentación teórica y establecimiento de referentes investigativos
- Selección de técnicas de recolección de datos

- Categorización datos a fin de facilitar relaciones
- Verificación de validez de instrumentos
- Descripción, análisis e interpretación de datos
- Inferencia de resultados relevantes

El énfasis se aplica al análisis de los datos con los cuales se presentan los fenómenos o hechos de la realidad que, dada su similitud, es necesario describir sistemáticamente a fin de evitar un posible error en su manejo. (Tamayo y Tamayo, 2014, pág. 60)

3.2. Materiales

3.2.1. Materiales físicos

- Ropa de trabajo
- Guantes de examinación
- Agujas descartables
- Capuchones de vacutainers
- Tubos vacutainers de tapa lila
- GPS
- Hojas de campo
- Sogas
- Micro centrífuga
- Placa térmica
- Vórtex
- Micro pipetas
- Puntas de pipeta
- Micro tubos
- Guantes de Nitrilo
- Transiluminador UV
- Cámara de electroforesis
- Termociclador

3.2.2. Materiales biológicos

- 131 ejemplares del biotipo bovino Pizan
- Muestras de sangre
- Pajillas de semen

3.2.3. Materiales químicos

- Kit de extracción de ADN invitrogen
- Agarosa
- Buffer TAE

- Primers Csn3 Invitrogen
- Enzima de restricción HindIII Thermo Fisher Scientific
- Enzima de restricción HphI Thermo Fisher Scientific
- Marcador de peso molecular Pcr Markers 50 loans Promega
- Intercalante fluorescente Orange Diamond Thermo Fisher Scientific)

3.3. Metodología desarrollada en el trabajo de campo

Se realizaron contactos con los propietarios del ganado Pizan, dicho contacto se hizo mediante averiguaciones, visitas a haciendas, preguntando a ganaderos y visitando la feria ganadera realizada en la ciudad de San Gabriel cada fin de semana. Al no conocer una población determinada de ganado Pizan en la provincia del Carchi, se logró contactar con los propietarios de ganado del biotipo, obteniendo 17 puntos de muestreo en toda la zona. Al hablar con los propietarios se solicita permiso para realizar los muestreos de sangre y un examen físico para la caracterización fenotípica.

Al momento del muestreo se inmoviliza a los animales metiéndolos en mangas para evitar posibles accidentes o golpes, como se muestra en la figura 4, en lugares donde no se cuenta con manga, se procede a inmovilizarlos con sogas para una mayor seguridad. En el sitio de muestreo se toman los puntos con un GPS.



Figura 4. Toma de muestras en manga para inmovilizar los animales muestreados.

Para lograr estimar un tamaño de muestra significativo a la hora de realizar la bovinometría se utiliza las siguientes fórmulas que toman como referencia la media y la varianza:

$$n_{\infty} = \frac{k^2 \chi \sigma^2}{e^2}$$

Dónde: k^2 =valor nominal para nivel de confianza

σ^2 = Varianza

e^2 = error máximo estimado de acuerdo a la media

$$n = \frac{n_{\infty}}{1 + \frac{n_{\infty}}{N}}$$

Dónde: N=Población total (Aguilar-Barojas, 2005)

Luego de esto se mide la altura a la cruz de los animales adultos como se muestra en la figura 5, (altura registrada desde el suelo hasta la parte más alta, posterior al cuello del animal), dicha medición se realiza con una regla especial llamada Hipómetro, la cual fue facilitada por el Centro de Remonta del Ejército para éste propósito, en virtud del convenio que sostiene la PUCESI, con esta institución.



Figura 5. Medición de altura a la cruz con Hipómetro.

Además se toman demás medidas zoométricas del cuerpo del animal. Mismas que ayudan a la fenotipificación del ganado Pizan. En la figura 6 se observa las mediciones de la alzada a la cruz y a la grupa, además del largo del cuerpo, que es tomado desde el encuentro de la escápula con el húmero, hasta la tuberosidad isquiática.

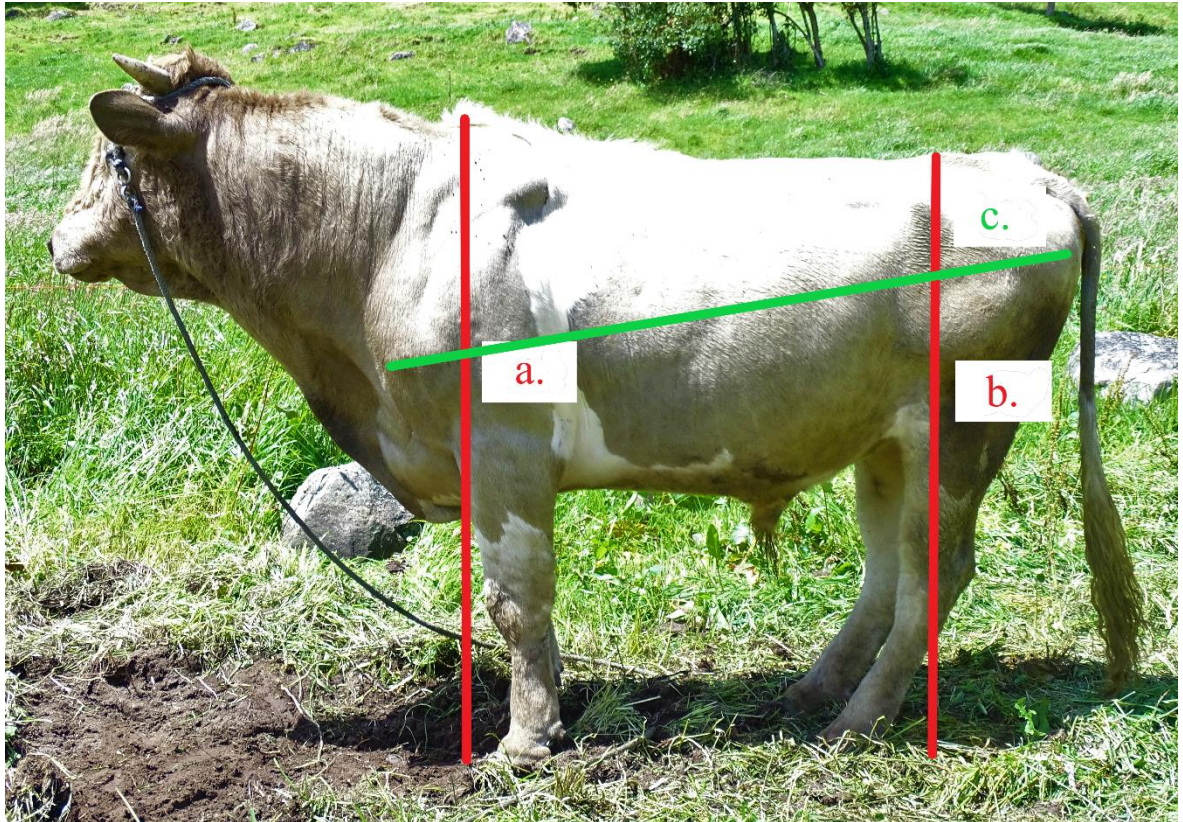


Figura 6. a. Alzada a la cruz; b. alzada a la grupa; c. largo de cuerpo.

Así mismo se toman las medidas de las extremidades anteriores, para saber la conformación morfo estructural de los animales Pizan. Dichas medidas se aprecian en la figura 7, así como el perímetro del tórax, que sirve para conocer la capacidad cardíaca y pulmonar ya que es un parámetro muy importante en la producción de leche, por la cantidad de sangre que se debe bombear para la producción láctea (Escalona, 2011).

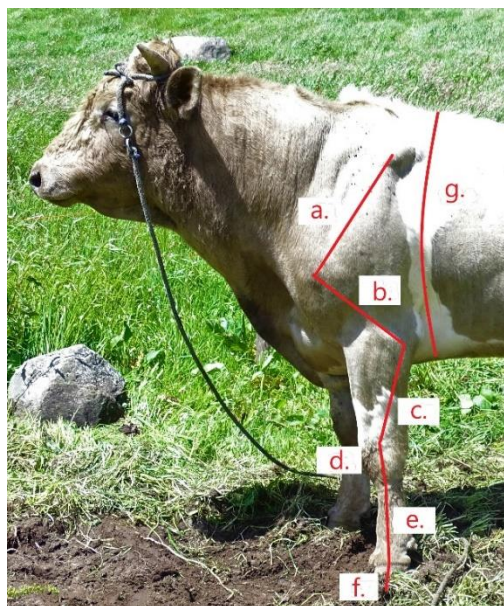


Figura 7. Medidas miembro anterior bovino. a. Escápula; b. húmero; c. radio; d. carpo; e. metacarpo; f. dedos; g. Perímetro torácico.

Se toman las medidas de las extremidades posteriores, como se muestra en la figura 8, para evaluar la conformación del animal, así como el perímetro abdominal o barril; dicha medida es muy importante ya que nos da una idea de la capacidad de ingesta del animal, es decir, cuanta comida puede ingerir, ya que dicho alimento se convierte en la materia prima para la producción láctea. (Valerio, 2009)

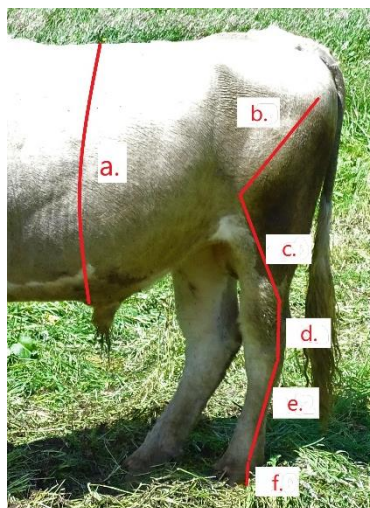


Figura 8. a. Perímetro abdominal o barril. Medidas miembro posterior. b. Fémur; c. tibia; d. tarso; e. metatarso; f. dedos.

Se toma también medidas del alto del tórax y del alto del barril, así como del largo del cuello; tal como se muestra en la figura 9.

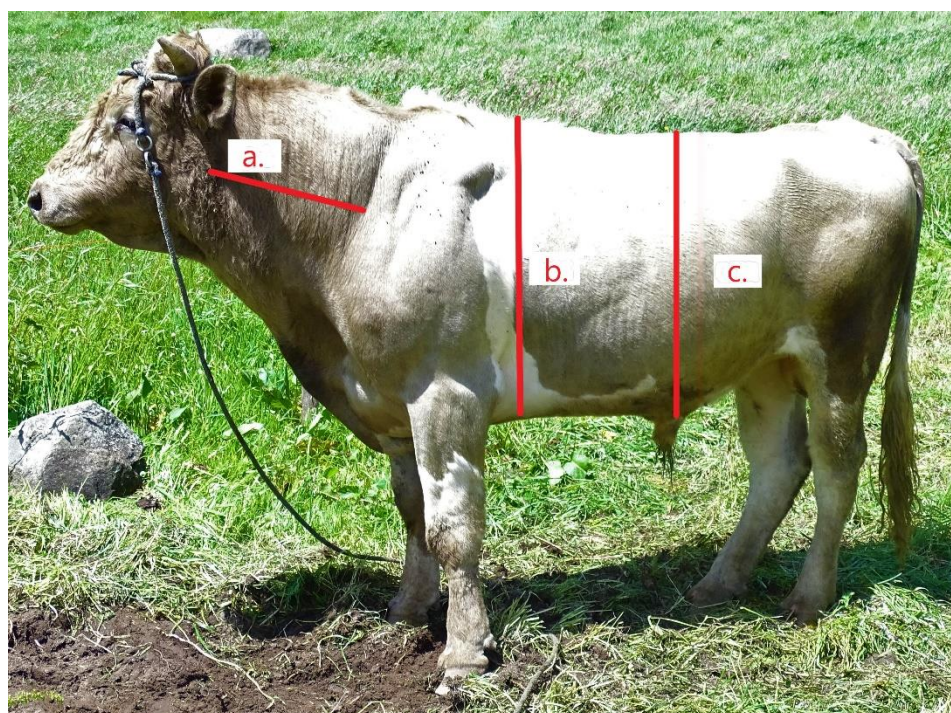


Figura 9. a. Largo de cuello; b. alto de tórax; c. alto de barril.

En la parte posterior se toman las medidas entre ilion e ilion y la medida entre isquion e isquion, como se ilustra en la figura 10, estas son importantes para darnos una idea del ancho del canal de parto así como la facilidad que tendrá la vaca para parir. (Sanín, Maldonado, Carillo, & Rodríguez, 2014)

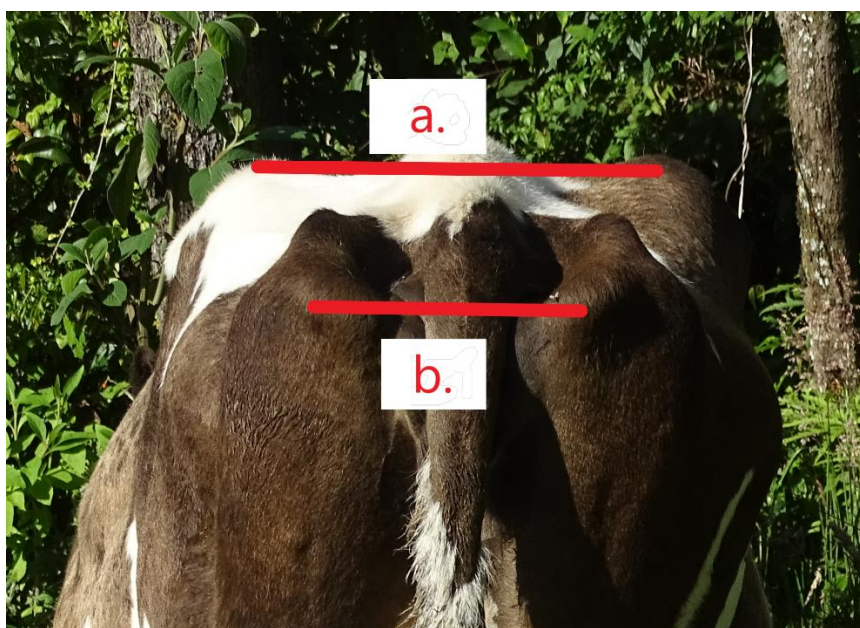


Figura 10. Distancia entre Ilión a Ilión; Distancia entre Isquion a Isquion.

En los machos se toma la medida del perímetro escrotal, indicada en la figura 11, muy importante en el ámbito reproductivo del ganado lechero.



Figura 11. Perímetro escrotal en macho joven.

Se hace una calificación de la conformación de la ubre, ya que este es el órgano encargado de la producción láctea, es importante conocer la anatomía de la misma, esto se verá reflejado en la cantidad y calidad de la leche producida, en la figura 12 y 13 se observa la conformación lateral y posterior de la ubre. (Elizondo, 2010)

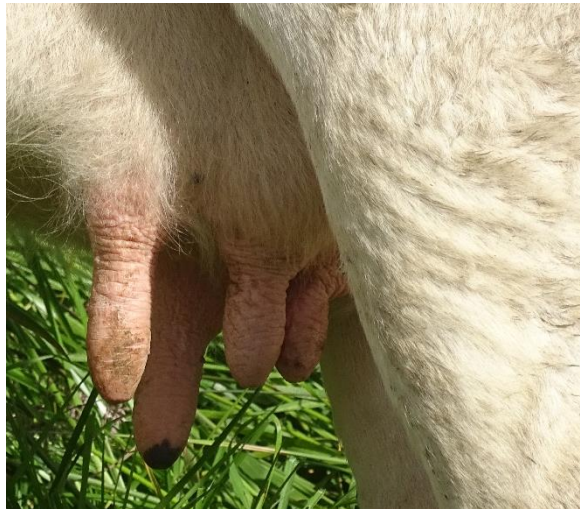


Figura 12. Conformación de la ubre; vista lateral.



Figura 13. Conformación de la ubre; vista posterior.

Se mide también la longitud de los pezones, como indica la figura 14, para saber la facilidad de ordeño que se tiene en éstas vacas, además de la facilidad que tendrá el ternero para lactar. (Elizondo, 2010)



Figura 14. Longitud de pezones delanteros.

Posterior a ello se procede a la extracción de la muestra de sangre, para lo cual se utilizan guantes de látex para proteger las manos del contacto con la sangre de los animales, ya que estos pueden tener enfermedades que pueden llegar a afectar la salud humana. Se limpia y desinfecta la zona de las vértebras coccígeas de donde se toma las muestras en bovinos; este procedimiento se describe a continuación:

- Se conecta la aguja del kit vacutáiner al capuchón, luego con el dedo pulgar se palpa la zona de la cola hasta encontrar una pequeña hendidura entre las vértebras coccígeas 7 y 8, por donde se ingresa la aguja. Una vez que la aguja este dentro de la vena caudal, se conecta el tubo de colección de muestra en el otro extremo de la aguja para que se llene de sangre, tal como se aprecia en la figura 15. Es importante señalar que no se debe conectar el tubo a la aguja antes de que ésta esté dentro del animal, ya que estos tubos vienen pre cargados con un pequeño vacío que se perdería.
- Se espera a que se llene el tubo de colección de muestra hasta la marca indicada en el mismo, la cual es de, 4 ml. Para este procedimiento se utilizan tubos de tapa lila, los cuales contienen el aditivo que se llama EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), que es un anticoagulante. (Segura, Jiménez, Llamas, & Jiménez, 1997)
- Luego se saca la aguja de la cola del animal presionando el punto de entrada para que no se generen hematomas y se agita el tubo suavemente para que la sangre se mezcle con el aditivo, pero sin hacer movimientos bruscos ya que se puede hemolizar.



Figura 15. Muestreo de sangre en vena coccígea con kit vacutáiner y tubo de tapa lila.

- Se guardan las muestras en un cooler con hielo hasta llegar a laboratorio donde se refrigeraron a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN.

3.4. Metodología desarrollada en laboratorio

La extracción de ADN se realiza con: PureLink ADN Extraction KIT de la marca Invitrogen, utilizando el protocolo para extracción de ADN de muestras de sangre fresca, el cual proporciona el fabricante del Kit en su página web. A continuación, se cita dicho protocolo, traducido del inglés:

Lisado de sangre

Use el siguiente protocolo para preparar el lisado a partir de muestras de sangre (nucleada o no nucleada).

Nota: Si está procesando > 200 µL de muestra de sangre, necesita comprar un tampón de unión de lisis / unión genómica PureLink® y proteinasa K.

1. Coloque un baño de agua o un bloque de calor a 55 ° C.

2. Para un tubo de microcentrífuga estéril, agregue $\leq 200 \mu\text{L}$ de muestra de sangre fresca o congelada (si usa $200 \mu\text{L}$ y $\leq 1 \text{ mL}$, amplíe todos los volúmenes de reactivo según corresponda).
3. Agregue $20 \mu\text{L}$ de proteinasa K (suministrada con el kit) a la muestra.
4. Agregue $20 \mu\text{L}$ de RNasa A (suministrado con el kit) a la muestra, mezcle bien mediante agitación vorticial breve e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
5. Agregue $200 \mu\text{L}$ de tampón de lisis / unión genómica PureLink® y mezcle bien mediante agitación vorticial para obtener una solución homogénea.
6. Incubar a 55°C durante 10 minutos para promover la digestión de proteínas.
7. Agregue $200 \mu\text{L}$ de etanol al 96-100% al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.
8. Proceda inmediatamente al ADN vinculante.

ADN vinculante

1. Retire una columna de centrifugación PureLink® en un tubo de recogida del paquete.
2. Agregue el lisado ($\sim 640 \mu\text{L}$) preparado con PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer y etanol a la PureLink® Spin Column.
3. Centrifugue la columna a $10,000 \times g$ durante 1 minuto a temperatura ambiente. Nota: Si está procesando $> 200 \mu\text{L}$ de material de partida, como sangre, frotis bucales o saliva preservada Oragene™, debe realizar múltiples cargas del lisado transfiriendo el lisado restante a la misma columna de centrifugación PureLink® (arriba) y centrifuga a $10,000 \times g$ por 1 minuto.
4. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugado en un tubo limpio de recolección PureLink® suministrado con el kit.
5. Proceda a lavar ADN.

ADN de lavado

1. Agregue $500 \mu\text{L}$ de tampón de lavado 1 preparado con etanol a la columna.
2. Centrifugue la columna a temperatura ambiente a $10,000 \times g$ por 1 minuto.
3. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna giratoria en un tubo de recolección PureLink® limpio que se suministra con el kit.
4. Agregue $500 \mu\text{L}$ de tampón de lavado 2 preparado con etanol a la columna.

5. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de recolección.

6. Proceda a ADN de elución.

ADN eluyente

1. Coloque la columna giratoria en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.

2. Agregue 25-200 µL de tampón de elución Genomic PureLink® a la columna. Consulte Parámetros de elución para elegir el volumen de elución adecuado para sus necesidades.

3. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN genómico purificado.

4. Para recuperar más ADN, realice una segunda etapa de elución utilizando el mismo volumen de tampón de elución que la primera elución en otro tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.

5. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 1,5 minutos a temperatura ambiente.

El tubo contiene ADN purificado. Eliminar y descartar la columna. (Invitrogen, 2018)

El ADN del biotipo puro con el que se van a contrastar las muestras recolectadas en la provincia del Carchi es extraído de pajuelas de semen del toro llamado “Pedro”, propiedad de la casa de genética animal BIOGENSA. Este semen fue proporcionado por dicha empresa, ya que es un toro Pizan puro, de la ganadería de la hacienda El Carmen, de la ciudad de San Gabriel. El mencionado toro aparece en el catálogo de sementales nacionales de BOSSGEN como un semoviente puro del biotipo bovino Pizan, propiedad de BIOGENSA. (BOSSGEN, 2012)

3.4.1. REACCIÓN EN LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez que se seleccionan los primers a utilizar, se realiza la Reacción en la cadena de la polimerasa; para lo cual se hace la mezcla de: 5.5 µl de agua libre de nucleasas; 1 µl de cada primer; 12.5 µl de Master Mix y 5 µl de ADN, dando un total de 25 µl de volumen final; todo esto en la cámara de flujo laminar, como se observa en la figura 16, para evitar contaminación o degradación del ADN.

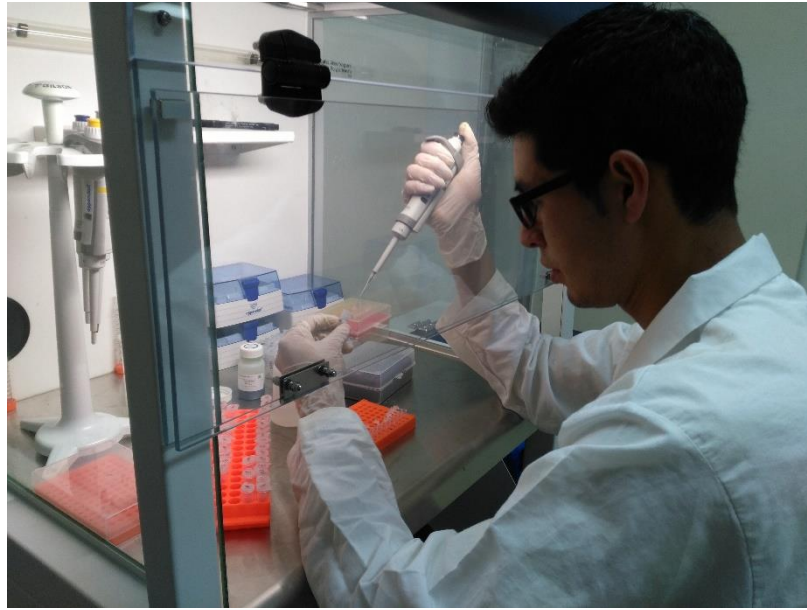


Figura 16. Mezcla de reactivos para la Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)

Luego de esto se llevan las muestras al termociclador, esta máquina eleva la temperatura de las muestras a 94°C durante 5 minutos. Luego realiza 35 ciclos, los cuales constan de 30 segundos a 94°C para la separación de las cadenas de ADN, 45 segundos a 61°C para propiciar la hibridación y 90 segundos a 84°C para la elongación. Una vez finalizados los 35 ciclos la temperatura se sitúa a 84°C durante 10 minutos, para luego bajar hasta los 4°C donde se mantiene hasta el momento de sacar las muestras de la máquina y apagar la misma.

Las figuras 17 y 18 muestran la calibración del termociclador y el ingreso de las muestras al mismo.

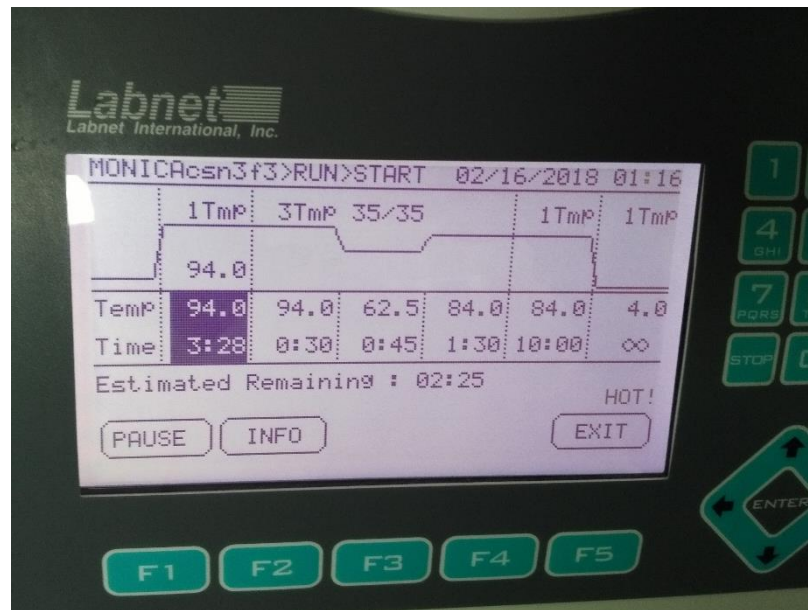


Figura 17. Programación del termociclador para amplificar los fragmentos con los primers Csn3: f3-r3

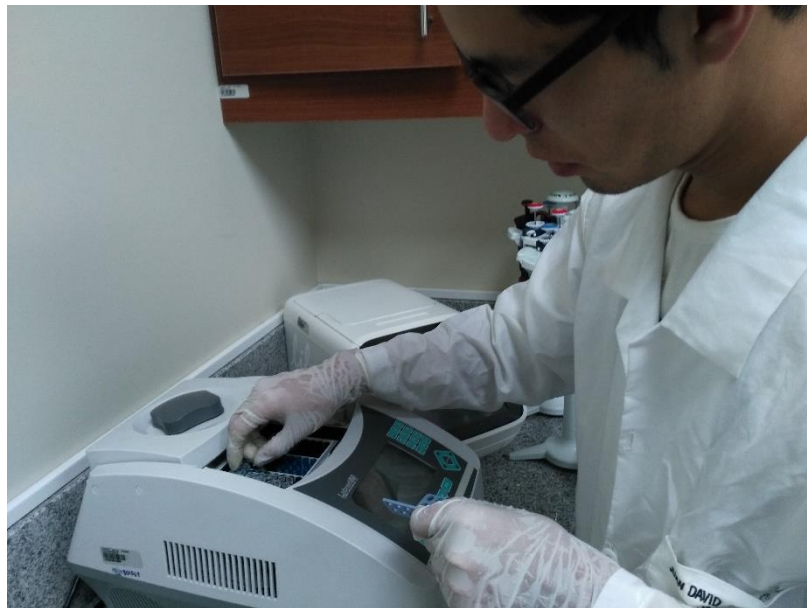


Figura 18. Ingreso de muestras al termociclador.

Para poder determinar la cantidad de copias del fragmento de ADN de interés para esta investigación que se han generado durante el proceso de trabajo de campos se debe calcular los ciclos realizados, (Pérez de Saltos, 2010) afirma que por cada ciclo de variaciones de temperatura que se completa, el fragmento de ADN de interés se duplica; por lo cual es una reacción exponencial, cuya fórmula es 2^n ; donde n es igual al número de ciclos predeterminado.

En este caso, el número de ciclos es de 35, por lo cual; al aplicar la fórmula antes mencionada obtenemos:

2^n ; $2^{35} = 34.359.738.368$ copias del fragmento de ADN de interés.

3.4.2. SELECCIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Una vez que los fragmentos de ADN de nuestro interés han sido amplificados mediante la PCR con los tres juegos de cebadores, procedimos a buscar las enzimas de restricción que puedan cortar dichos fragmentos.

En primer lugar se obtuvo la secuencia del gen completo de la Kappa caseína (Csn3) en Bos Taurus, cuyo código de acceso en el GenBank de Pubmed es: AY380229 (Robitaille, Britten, Morisset, & Petitclerc, 2005). Una vez que se obtuvo dicha secuencia se tuvo que buscar los fragmentos que se amplificaron para poder determinar cuál enzima de restricción utilizar. Cabe destacar que cada enzima de restricción tiene un sitio de restricción específico; es decir, que sólo puede digerir ciertas secuencias únicas que reconoce y corta. Por ejemplo: La enzima de restricción EcoRI reconoce y corta sólo el fragmento 5' G↓AATTC 3' 3' CTTAA↑G 5' (Promega, 2018)

Para poder realizar esto, se tiene como soporte tecnológico el uso de un software online que se denomina Basic Local Alignment Search Tool, o BLAST por sus siglas en inglés. En dicho portal se introduce la secuencia completa del gen de la Kappa caseína bovina (Csn3) y se selecciona la opción 'Encontrar en esta secuencia' (Find in this sequence); esto consecuentemente permite buscar fragmentos o secuencias dentro del gen y ver su ubicación, es decir, en qué número de par de base se encuentra dentro de la secuencia completa. Se observa la posición de los fragmentos que selecciona cada cebador, lo propio se hace con el sitio de restricción de cada enzima; dichas posiciones se confinaron en la siguiente tabla 2.

Tabla 2.

Posición de cebadores y enzimas de restricción en el gen de la Kappa caseína bovina (Csn3)

GEN	TAMAÑO	
Kappa caseína bovina (Csn3)	2554 pb.	
REACTIVO	SECUENCIA	POSICIÓN
Cebador Csn3: f1	5' ACAGAGAAGGCGAAATGGGC 3'	612-862
Cebador Csn3: f2	5' GCCCACCTGAGATCAACACA 3'	437-687
Cebador Csn3: f3	5' CCAACTACCATGGCACGTCA 3'	247-497
Enzima Hind III	5' AAGCTT 3'	413-418
Enzima HphI	5' GGTGA 3'	355-359
Enzima MspI	5' CCGGN 3'	2468-2472

Como se puede observar en la tabla 3, las únicas enzimas de restricción que sirven para cortar en el gen de la Kappa caseína bovina (Csn3) son Hind III y HphI, ambas cortando en el tercer juego de primers Csn3: f3-r3.

3.4.3. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para realizar la digestión con las enzimas de restricción es necesario realizarla a partir del fragmento de ADN de interés amplificado mediante la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR). Así mismo, se debe tener la certeza de que dichas enzimas tienen sitio de restricción en el ADN, ya que, al ser un proceso largo, tedioso y costoso, no conviene desperdiciar tiempo, recursos y reactivos en una digestión infructuosa por no haber seleccionar correctamente los fragmentos amplificados y las enzimas a utilizar.

3.4.3.1. Hind III

Para realizar el corte con la enzima Hind III se realiza la mezcla de: 16,3 µl de agua libre de nucleasas; 2 µl de Buffer RE 10x; 0,2 µl de Buffer BSA; 1 µl de ADN; se mezcla brevemente pipeteando; finalmente se agrega 0,5 µl de la enzima de restricción Hind III (Thermo Scientific™, 2018); obteniendo un volumen final de 20 µl. además de esto se centrifugaron las muestras por unos pocos segundos para que las gotas bajen al fondo del tubo y todos los reactivos estén en contacto. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar para mantener el ambiente estéril y evitar contaminación o degradación de las muestras de ADN. De esta manera se asegura un corte óptimo.

Una vez realizada la mezcla del corte, se deja incubar a temperatura ambiente de 1 a 4 horas; en este caso las muestras incubaron 2 horas y posteriormente fueron guardadas en el congelador a -32°C hasta la observación mediante electroforesis.

3.4.3.2. HphI

Al igual que con la enzima de restricción anterior, debemos realizar la mezcla en la cámara de flujo laminar para evitar degradaciones o contaminación, los instrumentos: pipetas, puntas y tubos deben estar previamente esterilizados. Se mezcla: 16 µl de agua libre de nucleasas; 2 µl de Buffer B 10X; 1 µl de ADN; 2 µl de enzima HphI (Thermo Scientific™, 2018). Se lleva a la microcentrifuga por un par de segundos para que el contenido del tubo baje al fondo, posterior a ello se deja incubando por dos horas para que la enzima realice su acción y corte el ADN.

Una vez transcurrido este tiempo se guardan las muestras en el congelador a -32°C para que el ADN no se degrade hasta realizar la observación mediante electroforesis.

3.4.4. ELECTROFORESIS

Como primer punto se debe preparar la solución TAE, esta solución es la que ayuda a la conducción eléctrica y hace que el ADN se desplace por el gel para poder observarlo. El buffer TAE viene en concentraciones de 50X o 10X, por lo que es necesario realizar una dilución en agua destilada hasta llegar a la concentración de 1X, la cual es la óptima para preparar el gel y conducir la electricidad a través de la cámara de electroforesis.

En este caso se cuenta con buffer TAE a 50 X por lo que se ponen 20 ml de la misma en un frasco Boeco y se afora a un litro con agua destilada, de esta manera se obtiene la solución

a 1X. Esta solución será utilizada en la elaboración del gel y con ella también se llena la cámara de electroforesis. Cabe recalcar que es recomendable que el buffer TAE del gel y de la cámara de electroforesis sea del mismo lote, esto ayuda a que las muestras corran de una manera más uniforme y sea más fácil observarlas.

Una vez obtenida la solución a la concentración adecuada procedemos a preparar los geles, en nuestro caso fueron geles de agarosa, aunque pueden ser de poliacrilamida. La concentración del gel también es importante, ya que a menor concentración es más fácil que las muestras corran por el gel; lo más usual es utilizar concentraciones del 2% o el 1%, por lo que decidimos utilizar esta última.

Para preparar el gel se utilizan 100 ml de solución TAE 1X añadiendo 1 gr de agarosa, para lograr la concentración deseada, se calienta en un plato magnético y una vez que hierve se deja enfriar un poco. Cuando está tibio se agrega 3 µl de agente Diamond Dye, el cual aporta fluorescencia para observar en el transiluminador UV. Posteriormente se dispersa el gel en el molde y se pone la peineta que forma los pocillos donde se depositan las muestras que van a correr. Una vez se ha gelificado por completo se retira la peineta y se introduce el molde en la cámara antes de dispensar las muestras.

Al dispensar las muestras, en cada gel, se ponen en la primera línea una mezcla de 3 µl de marcador de peso molecular (PCR Markers 50 loans de Promega) y 3 µl de buffer de carga para que tenga fluorescencia y se pueda apreciar el peso de las bandas que se han cortado. En la segunda línea se pone el corte del biotipo puro para contrastar, y en el resto de líneas o pocillos se ponen las muestras que anteriormente han sido cortadas con cada enzima.

Se configura la máquina de electroforesis a 90 volts durante 60 minutos, que es el tiempo y el voltaje recomendados. (García, 2000)

Una vez que ha pasado ese lapso, se lleva el gel al transiluminador UV para poder observar cuáles de las muestras se asemejan más al biotipo puro, o si existen polimorfismos que hagan que la genética varíe.

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

Se toman 131 muestras de sangre de ganado Pizan en diferentes zonas de la provincia del Carchi, las cuales se detallan en la tabla 3.

Tabla 3.

Muestreo realizado en diferentes puntos de la provincia del Carchi.

SITIO	PROPIETARIO	ZONA	NÚMERO DE MUESTRAS	PUNTOS GPS
1	Sr. Néstor Sarmiento	San Gabriel	8	N 0190538 UTM 0066031
2	Sr. Álvaro Hidalgo	San Gabriel	6	N 0188074 UTM 0062372
3	Sr. Joel Navarrete	La Libertad	6	N 0172938 UTM 0075497
4	Dr. Alberto Landázuri	San Gabriel	50	N 0189122 UTM 0065977
5	Sr. Néstor Sarmiento	San Gabriel	9	N 0190538 UTM 0066031
6	Sr. Néstor Sarmiento	San Gabriel	1	N 0190370 UTM 0065318
7	Sr. Néstor Sarmiento	San Gabriel	2	N 0190823 UTM 0066604
8		Huaca	10	N 0201118

	Sr. Néstor Sarmiento			UTM 0071146
9	Sr. Néstor Sarmiento	Huaca	6	N 0202548
				UTM 0072152
10	Sr. Néstor Sarmiento	Chitan de Navarretes	6	N 0189592
				UTM 0069152
11	Sr. Campo Meneses	La Libertad	1	N 0173355
				UTM 0075610
12	Sra. Sandra E.	La Libertad	1	N 0172309
				UTM 0073086
13	Sr. Juan Chandi	La Libertad	2	N 0172839
				UTM 0071781
14	Sr. Víctor de la Cruz	Pizan	1	N 0185561
				UTM 0055181
15	Sr. Víctor de la Cruz	Pizan	3	N 0186707
				UTM 0054912
16	Sr. Wilmer Morillo	Pizan	4	N 0186470
				UTM 0056055
17	Sr. Andrés Astudillo	Inhuesa	19	N 0168855
				UTM 0070674

Además de la georreferenciación se realiza la cartografía correspondiente, para lo cual, se realiza la Tabla 4 en la cual se detallan las coordenadas exactas del sitio de muestreo junto con el nombre del propietario, para etiquetar cada punto tomado con el respectivo ganadero. Los datos son ingresados al programa ArcGis para la elaboración del mapa de muestreo, que corresponde a la figura 19.

Tabla 4.

Coordenadas exactas y etiquetas de propietario para cartografía.

Sitio	X (coordenada)	Y (coordenada)	Propietario
1	0190538	10066031	Sr. Néstor Sarmiento
2	0188074	10062372	Sr. Álvaro Hidalgo
3	0172938	10075497	Sr. Joel Navarrete
4	0189122	10065977	Dr. Alberto Landázuri
5	0190538	10066031	Sr. Néstor Sarmiento
6	0190370	10065318	Sr. Néstor Sarmiento
7	0190823	10066604	Sr. Néstor Sarmiento
8	0201118	10071146	Sr. Néstor Sarmiento
9	0202548	10072152	Sr. Néstor Sarmiento
10	0189592	10069152	Sr. Néstor Sarmiento
11	0173355	10075610	Sr. Campo Meneses
12	0172309	10073086	Sra. Sandra E.
13	0172839	10071781	Sr. Juan Chandi
14	0185561	10055181	Sr. Víctor de la Cruz
15	0186707	10054912	Sr. Víctor de la Cruz
16	0186470	10056055	Sr. Wilmer Morillo
17	0168855	10070674	Sr. Andrés Astudillo

Al realizar la cartografía de los sitios de muestreo, se observa que en la comunidad Pizan, cerca de la parroquia “La Paz”, donde se creó la raza no existen muchos propietarios que tengan aun este biotipo bovino en sus ganaderías, en concreto son 3 productores los que aun la conservan; sumando un total de tan solo 8 animales Pizan en dicha zona. Esto se debe al fraccionamiento de lo que antes era la hacienda Pizan, en donde Manuel J. Bastidas creó el biotipo, en pequeñas parcelas que fueron compradas por los moradores de la comunidad. Además, los herederos de Bastidas, decidieron vender también todo el ganado, esparciendo el biotipo por toda la provincia, pero quedando pocos en la comunidad.

Se observa también hasta donde se ha extendido el biotipo a lo largo de los años, llegando a las principales zonas de producción lechera de la provincia. Zonas que a su vez tienen condiciones climáticas extremas debido a que se encuentran en altitudes bastante elevadas, lo cual pone en evidencia la excelente adaptabilidad que tiene el biotipo a situaciones adversas.

Los sitios hasta donde ha llegado el biotipo son: la ciudad de “El Ángel”, concretamente en la parroquia “La Libertad” y la parroquia “Inhuesa”; la ciudad de “Huaca”; la ciudad de “Julio Andrade”; la ciudad de “San Gabriel”, específicamente las parroquias de “Chitán de Navarrete”, “Fernández Salvador” y “Piartal”. Con un total de 6 ganaderías que tienen el biotipo y 72 animales muestreados, San Gabriel es la ciudad que más ejemplares del biotipo conserva; ya que es allí donde se encuentra una de las ganaderías que más animales Pizan conserva; la hacienda “El Carmen”, propiedad del Dr. Alberto Landázuri.

4.1.1. Caracterización fenotípica

Al realizar las visitas a las haciendas donde se encuentra ganado del Biotipo bovino Pizan, se realizan las respectivas medidas en el animal, a continuación, se detalla las medidas individuales de un semoviente macho y una hembra, para ejemplificar la bovinometría realizada.

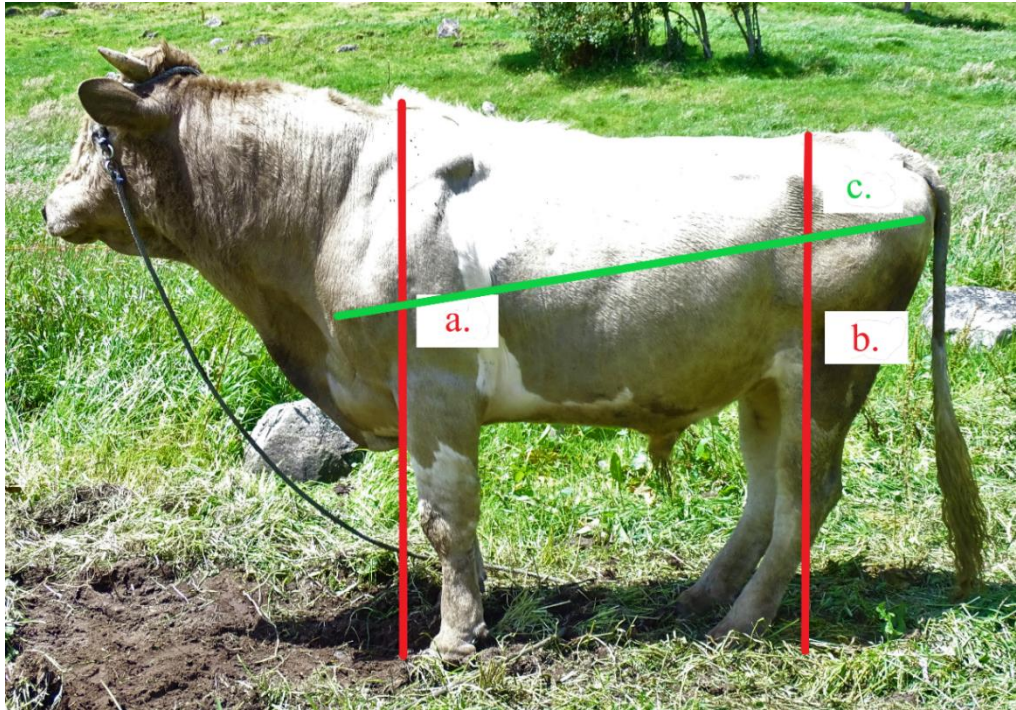


Figura 20. a. Alzada a la cruz: 1.33m; b. alzada al sacro: 1.39m; c. largo de cuerpo: 1.64m.

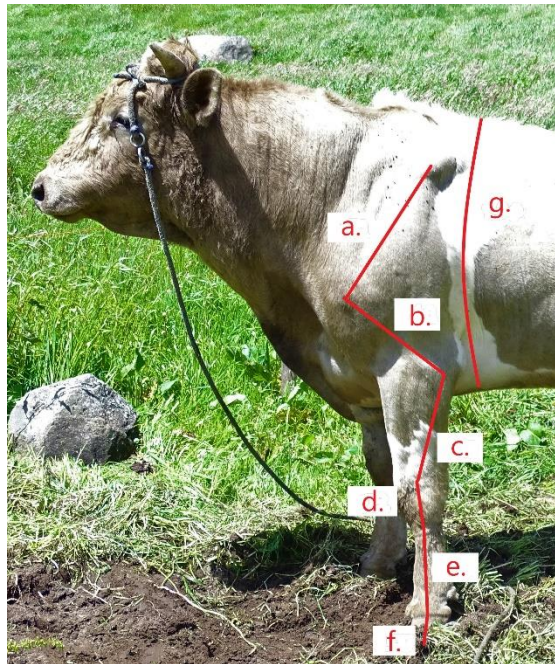


Figura 21. Medidas miembro anterior bovino. a. Escápula: 0.62m; b. húmero: 0.4m; c. radio: 0.4m; d. carpo: 0.12m; e. metacarpo: 0.28m; f. dedos: 0.09m; g. Perímetro torácico: 1.96m.

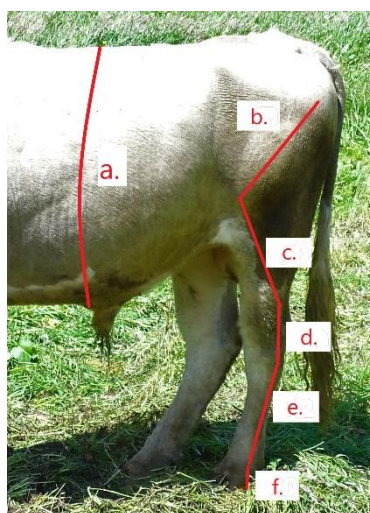


Figura 22. a. Perímetro abdominal o barril: 2.18m. Medidas miembro posterior. b. Fémur: 0.50m; c. tibia: 0.50m; d. tarso: 0.12m; e. metatarso: 0.42m; f. dedos: 0.10m.

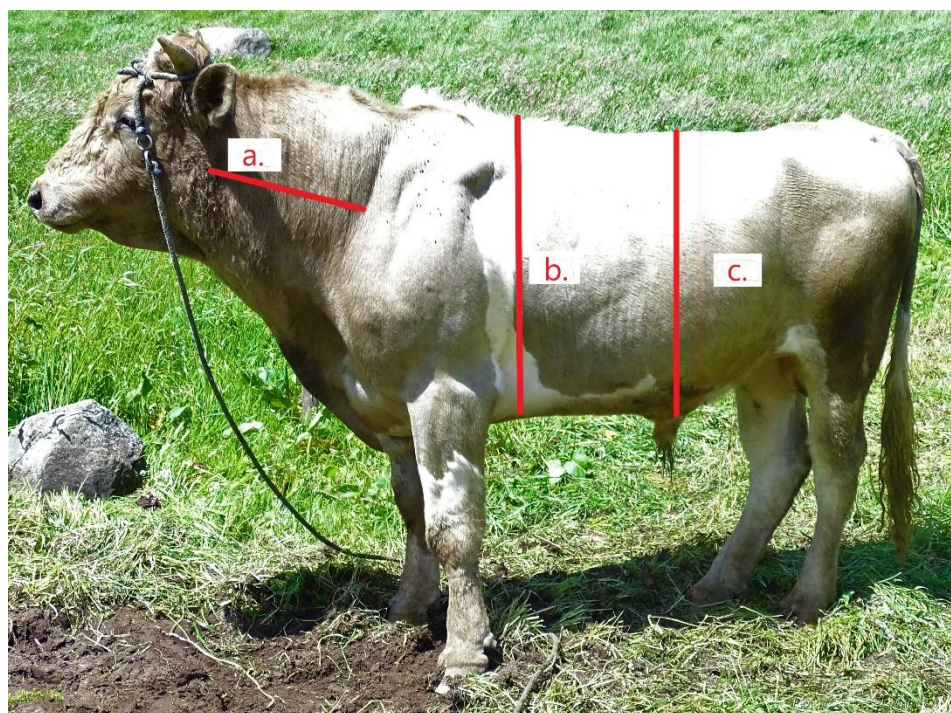


Figura 23. a. Largo de cuello: 0.58m; b. alto de tórax: 0.78m; c. alto de barril: 0.75m.

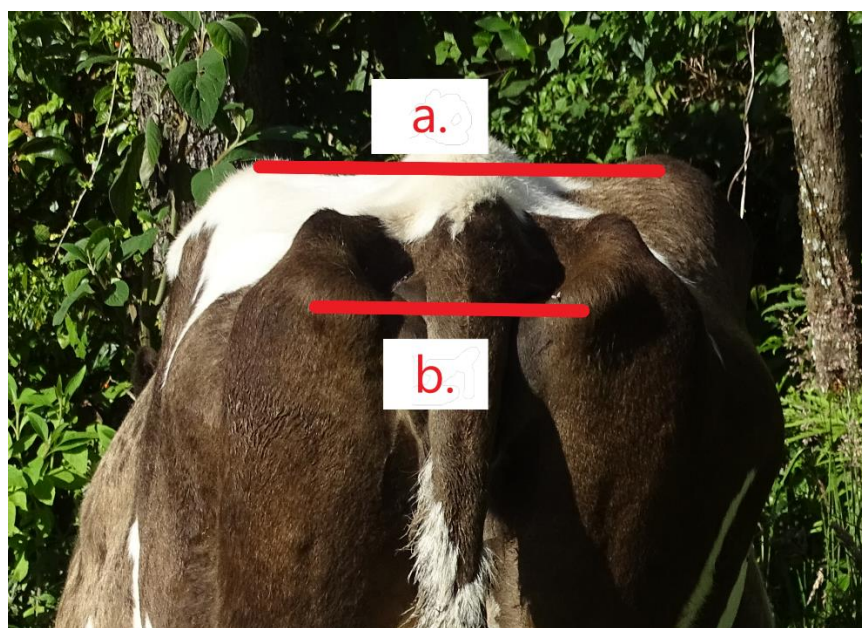


Figura 24. Distancia entre Ilión a Ilión: 0.4m; Distancia entre Isquion a Isquion: 0.21m.



Figura 25. Perímetro escrotal en macho joven: 0.32m.

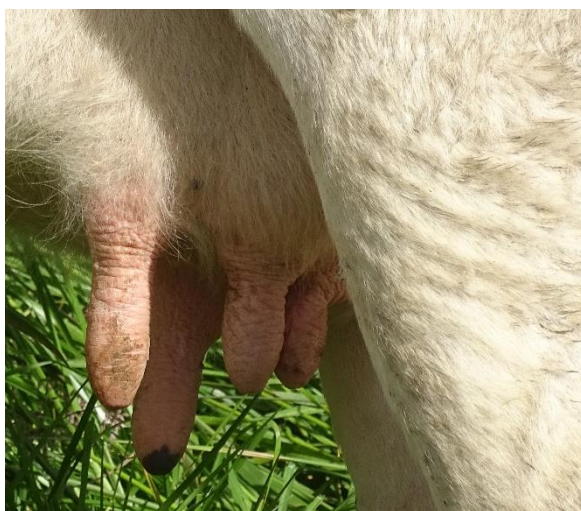


Figura 26. Conformación de la ubre; vista lateral.



Figura 27. Conformación de la ubre; vista posterior.



Figura 28. Longitud de pezones delanteros: 0.08m; longitud de pezones traseros: 0.05m.

En relación a lo establecido en la metodología, se aplican las fórmulas para los grupos de machos y hembras:

- **Machos: N=6**

$$n_{\infty} = \frac{k^2 x \sigma^2}{e^2}$$

$$n_{\infty} = \frac{1.94^2 x 0.00093333}{0.13^2}$$

$$n_{\infty} = 0.2078 \rightarrow 1$$

$$n = \frac{n_{\infty}}{1 + \frac{n_{\infty}}{N}}$$

$$n = \frac{1}{1 + \frac{1}{6}}$$

$$n = 0.8571 \rightarrow 1$$

- **Hembras: N=21**

$$n_{\infty} = \frac{k^2 x \sigma^2}{e^2}$$

$$n_{\infty} = \frac{1.94^2 x 0.01003333}{0.13^2}$$

$$n_{\infty} = 2.52 \rightarrow 3$$

$$n = \frac{n_{\infty}}{1 + \frac{n_{\infty}}{N}}$$

$$n = \frac{3}{1 + \frac{3}{21}}$$

$$n = 2.625 \rightarrow 3$$

En el caso de los machos, al ser la población solamente de 6 ejemplares, la muestra significativa es de 1 animal. No obstante, para efectos prácticos, se toman como referencia 3 animales, de esta manera se puede dar una idea más clara de la variación que tienen las medidas de cada ejemplar.

Tomando en cuenta que los rasgos fenotípicos de un biotipo permiten su estandarización desde el punto de vista morfológico. Para esta evaluación morfométrica se tomaron 22 medidas zoométricas en una muestra de seis animales, donde tres fueron hembras y tres machos adultos, lo cual se refleja en la Tabla 5:

Tabla 5.

Medidas zoométricas y peso vivo. Datos promedio y con desviación para machos y hembras del biotipo bovino Pizan.

MEDIDA	MACHOS (n=3)		HEMBRAS (n=3)	
	Promedio (m)	Desviación estándar (m)	Promedio (m)	Desviación estándar (m)
Alzada a la cruz	1,32	0,03	1,29	0,10
Alzada al sacro	1,39	0,04	1,36	0,04
Largo de cuello	0,58	0,04	0,45	0,02
Ancho de cuello	0,25	0,03	0,14	0,01
Largo de cuerpo	1,64	0,06	1,39	0,07
Escápula	0,62	0,04	0,40	0,03
Húmero	0,40	0,04	0,33	0,03
Radio y cúbito	0,40	0,01	0,32	0,01
Carpó	0,12	0,01	0,09	0,01
Metacarpo	0,29	0,01	0,21	0,03
Dedos	0,08	0,01	0,09	0,01
Alto de tórax	0,75	0,03	0,70	0,02
Ancho de tórax	0,43	0,02	0,37	0,03
Perímetro de tórax	1,94	0,08	1,85	0,09
Alto de Barril	0,73	0,03	0,65	0,03
Perímetro de barril	2,24	0,06	2,39	0,08
Fémur	0,50	0,02	0,30	0,03
Tibia y Peroné	0,49	0,02	0,46	0,01

Continuación tabla 5				
Tarso	0,12	0,01	0,09	0,01
Metatarso	0,40	0,02	0,23	0,02
Dedos	0,09	0,02	0,08	0,01
Peso Vivo	555,67	59,8	477,30	50,64

Alvear (2008) en su estudio titulado: “Valoración Biotipológica y Caracterización Zoométrica del Grupo Genético Autóctono Pizan”, expresa los siguientes valores para las medidas de Alzada a la cruz, Alzada a la grupa y Largo de cuerpo en los animales Pizan evaluados en dicha investigación (Tabla 6):

Tabla 6.

Medidas obtenidas en la investigación de Alvear (2008)

MEDIDA	MACHOS (n=3)		HEMBRAS (n=3)	
	Promedio (m)	Desviación estándar (m)	Promedio (m)	Desviación estándar (m)
Alzada a la cruz	1,47	0,07	1,39	0,10
Alzada al sacro	1,49	0,07	1,41	0,11
Largo de cuerpo	1,81	0,13	1,55	0,14

(Alvear, 2008)

Ambas investigaciones solo tienen tres índices en común, por lo cual solo se puede contrastar un porcentaje pequeño de los resultados obtenidos en cada una de las investigaciones.

Los promedios obtenidos en la presente investigación son menores a las obtenidas por Alvear, no obstante es importante mencionar que dicho proyecto fue llevado a cabo con semovientes de todo el país. Las desviaciones estándar de la investigación de Alvear también son mayores, por lo que el grupo evaluado no es homogéneo.

Las medidas obtenidas en la presente investigación están dentro de los rangos obtenidos por Alvear, lo cual indica que la selección de animales Pizan que se realiza es correcta.

4.1.2. Caracterización genotípica

4.1.2.1. Polimorfismos

Al realizar la electroforesis lo primero que se puede observar es que existe la presencia de polimorfismos. Esto indica que se han producido mutaciones o cambios en el gen de la Kappa-caseína bovina (Csn3).

Al realizar el corte con la enzima Hind III, se observa que en el biotipo puro no se presenta ningún corte, en el gel de electroforesis (figura 29) se ve una franja simple que se ubica entre la tercer y cuarta franja del marcador de peso molecular, PCR Markers 50 loans (Promega, 2018). Esto quiere decir que el fragmento se ubica entre las 300 pb y las 500 pb, lo cual concuerda con lo observado en el BLAST, ya que los cebadores Csn3 f3-r3 amplifican una secuencia de aproximadamente 368 pb.

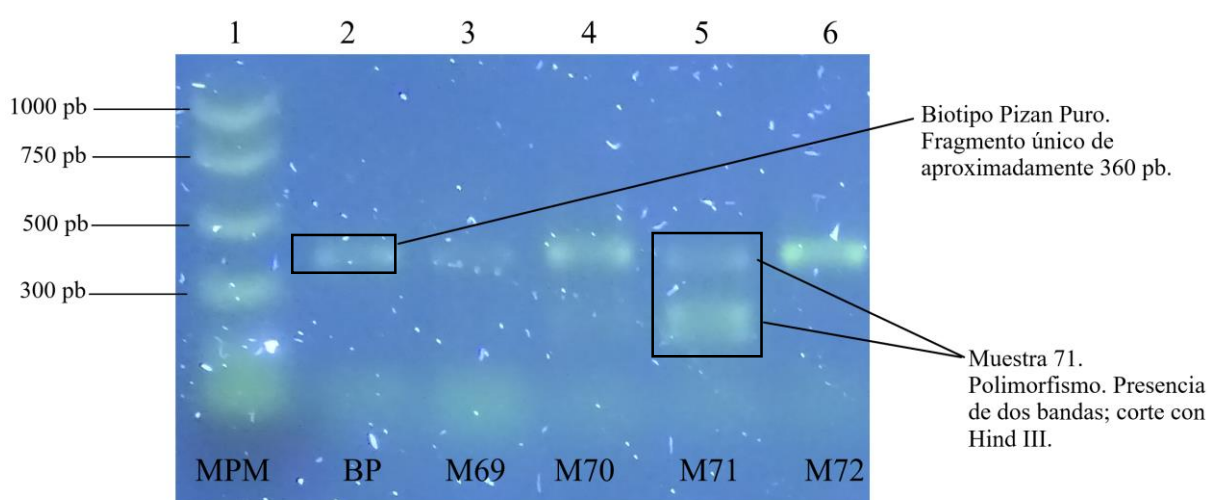


Figura 29. Electroforesis de digestión con enzima Hind III. Carril 1: MPM: Marcado de peso molecular (PCR Markers 50 loans-Promega); Carril 2: BP: Biotipo Pizan Puro; Carril 3-6: Muestras de animales presumiblemente Pizan; Carril 5: Presencia de polimorfismo.

Así mismo, en algunas muestras se observa un corte, es decir, se observan dos bandas, lo cual nos indica que existe una mutación o polimorfismo en la secuencia amplificada con los primers Csn3 f3-r3, ya que el biotipo puro no presenta la secuencia o sitio de restricción de la enzima Hind III, que es 5' A↓AGCTT 3', mientras que algunas muestras si tienen dicha secuencia, por lo que la enzima hace efecto y corta el segmento amplificado en dos bandas.

Como se menciona anteriormente, al buscar el sitio de restricción de la enzima HphI, que es 5'GGTGAN8↓3', en la secuencia del gen amplificado con los primers Csn3 f3-r3, se tiene un sitio de restricción aproximadamente a las 100 pb del segmento en cuestión. No obstante, al tratar las muestras con dicha enzima se evidencian dos cortes claros, dando como resultado tres bandas bien definidas de 150 pb, 130 pb y 50 pb respectivamente; tal como se observa a continuación en la figura 30.

En el BLAST se busca el sitio de restricción en el gen de la Kappa-Caseína bovina de los Bos Taurus en general, por lo que dicho gen puede haber sufrido cambios en su secuencia en el Biotipo Bovino Pizan. Para lo cual, se busca la secuencia del sitio de restricción de la

enzima HphI con un cambio en uno de sus nucleótidos, con el fin de buscar si la secuencia similar de la enzima ha sufrido algún cambio originando un nuevo sitio de restricción para HphI. Acorde a esto se encuentran dos secuencias propensas a posibles mutaciones, la primera es: 5'GGAGA3' a las 246 pb del fragmento de interés aproximadamente, en ésta se observa una secuencia casi idéntica al sitio de restricción de HphI, con la diferencia de que el tercer nucleótido es una Adenina (A), mientras que en la enzima es una Timina (T). La segunda posibilidad es 5'GGTAA3' a las 271 pb del segmento amplificado, del mismo modo que la anterior, es prácticamente igual a la secuencia de corte de la enzima, solo que, en este caso, el cuarto nucleótido es una adenina (A), mientras que en HphI es una guanina (G).

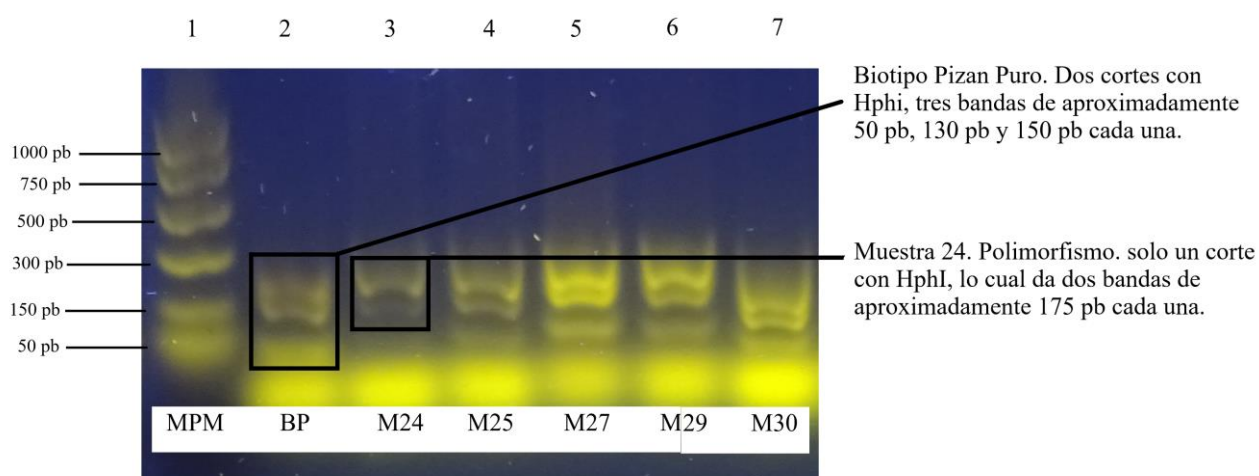


Figura 30. Electroforesis de digestión con enzima HphI. Carril 1: MPM: Marcado de peso molecular (PCR Markers 50 loans-Promega); Carril 2: Biotipo Pizan puro; Carril 3-7 Muestras de animales presumiblemente Pizan. Carril 3: Presencia de polimorfismo.

Del mismo modo, existen otros polimorfismos al comparar el Biotipo Pizan puro con las demás muestras, como las muestras que solo evidencian un corte, a diferencia de los dos cortes mencionados anteriormente, lo cual nos indica que existe un polimorfismo o mutación en la secuencia 5'GGTGA3' de la enzima HphI, lo que ocasiona que se suprima un sitio de restricción y solo se pueda observar dos bandas bien definidas.

4.1.2.2. Similitud de muestras con el Biotipo Puro

Al realizar la extracción de ADN, amplificar el fragmento del gen de la Kappa-Caseína bovina (Csn3) con los primers específicos (Csn3 f3-r3); digestar dichos fragmentos con las dos enzimas de restricción utilizadas (HindIII y HphI) y hacer una corrida de electroforesis para observar el resultado de los cortes. Se colectan los resultados de los geles de electroforesis para cuantificar la similitud genética que existe entre las muestras colectadas en la provincia del Carchi y la muestra del Biotipo Pizan Puro, cuyo ADN se extrae de

pajuelas de semen de un toro Pizan Puro, criado en la Hacienda “El Carmen” de la ciudad de San Gabriel y que es propiedad de la casa de genética animal “Biogensa”.

Para poder visualizar la similitud entre las muestras se utiliza el software “Primer 7”, el cual realiza un clúster (agrupamiento) de presencia-ausencia con las bandas de cada muestra obtenidas en el gel de electroforesis, para luego arrojar un porcentaje de similitud entre las mismas.

Se realiza el análisis de similitud de las muestras tratadas con la enzima HindIII, de las cuales el software arroja los resultados evidenciados en la figura 31 y 32, en la cual se observa el grupo de 61 muestras que tiene el 100% de similitud genética con el Biotipo Pizan puro.

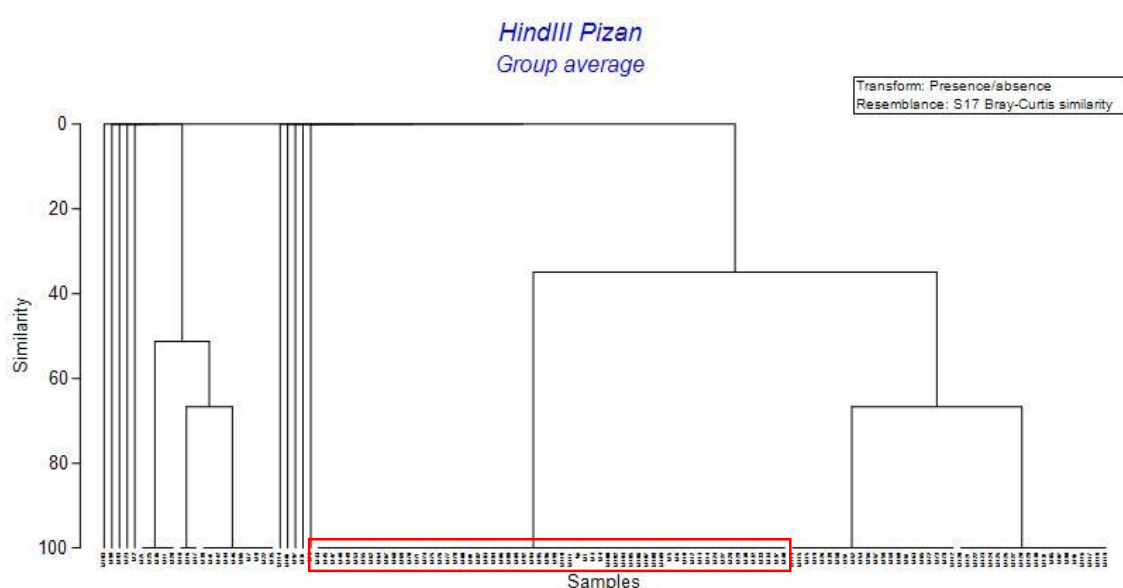


Figura 31. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa la similitud genética de las 131 muestras cortadas con la enzima HindIII. En el recuadro rojo, las 61 muestras que tienen el 100% de similitud con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro.

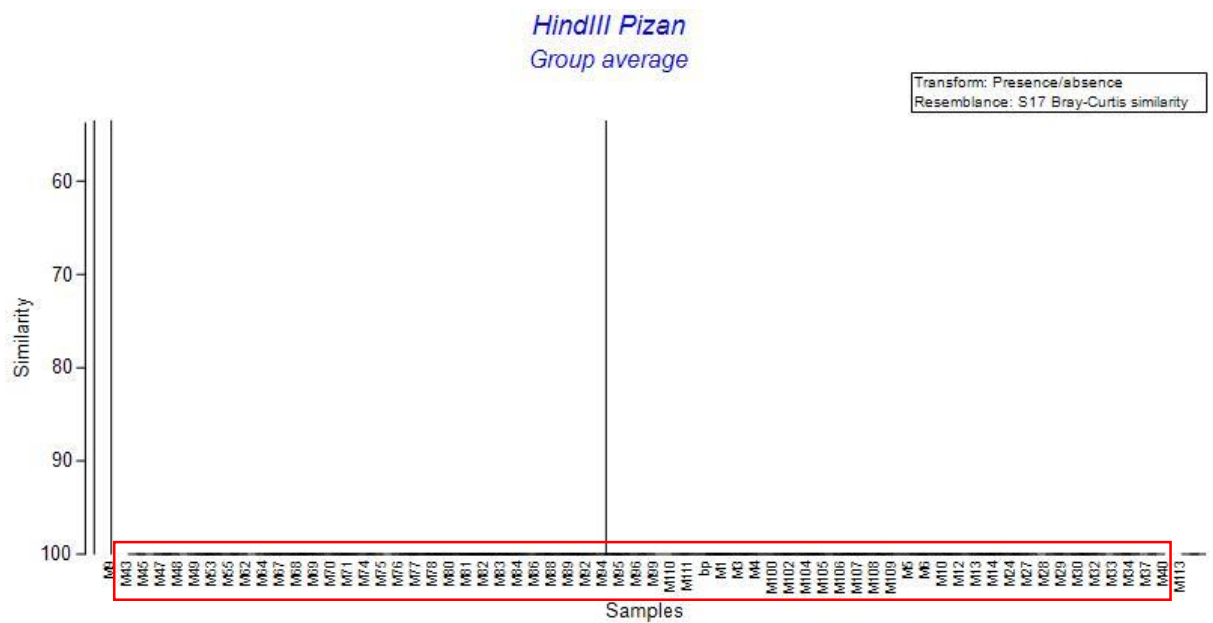


Figura 32. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 61 muestras con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser cortadas con la enzima HindIII.

Se observa que 61 muestras, de las 131 muestras tratadas con la enzima HindIII, tienen el 100% de similitud genética con el Biotipo Pizan Puro; lo cual arroja un porcentaje del 46.56% del total de muestras evaluadas. En la Figura 32 se muestra cómo están agrupadas las muestras de acuerdo a su porcentaje de similitud entre ellas, tomando como referencia el 50%, 70% y 100% de similitud.

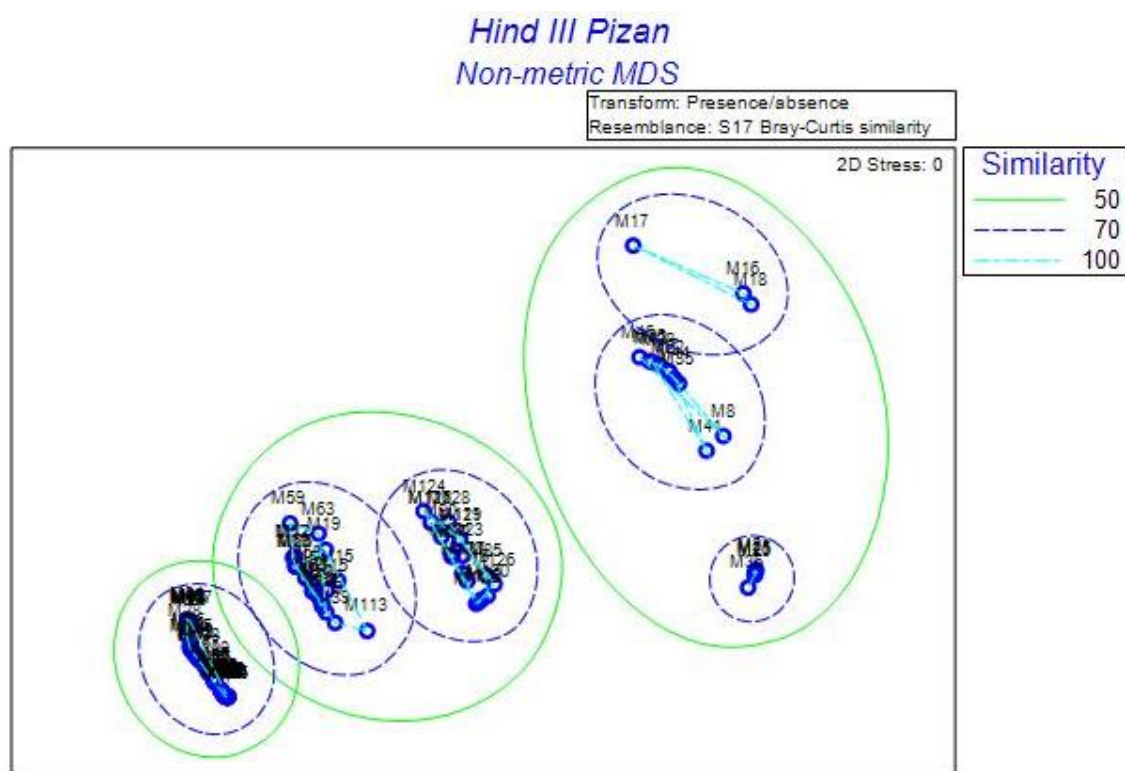


Figura 33. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 50%, 70% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HindIII.

A continuación se aprecia la tabla 7 en la cual se detallan las muestras que han tenido el 100% de similitud genética, además de los datos del animal al cual pertenecen, los nombres o números de arete, el sexo, y los propietarios de dichos animales.

Tabla 7.

Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HindII y datos de animales y propietarios.

N°	MUESTRA	IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL	SEXO	PROPIETARIO
1	M1	Andrea	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
2	M3	Karlita	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
3	M4	Berta	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento

Continuación tabla 7				
4	M5	N024	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
5	M6	Elisa	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
6	M10	0547	Hembra	Sr. Álvaro Hidalgo
7	M12	Jessy	Hembra	Sr. Álvaro Hidalgo
8	M13	0542	Hembra	Sr. Álvaro Hidalgo
9	M14	Selena	Hembra	Sr. Álvaro Hidalgo
10	M24	Marcelo 0	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
11	M27	683	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
12	M28	367	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
13	M29	354	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
14	M30	456	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
15	M32	672	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
16	M33	674	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
17	M34	317	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
18	M37	687	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
19	M40	879	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
20	M43	781	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
21	M45	630	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
22	M47	387	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
23	M48	992	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
24	M49	100	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
25	M53	152	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
26	M55	887	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
27	M62	687	Hembra	Dr. Alberto Landázuri

Continuación tabla 7				
28	M64	319	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
29	M67	86	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
30	M68	27	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
31	M69	1004	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
32	M70	Salvador	M	Sra. Doris Chafelan
33	M71	Rosita	Hembra	Sra. Doris Chafelan
34	M74	Emilio peq	Hembra	Sr. Emilio Pozo
35	M75	Emilio gran	Hembra	Sr. Emilio Pozo
36	M76	Kaluma	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
37	M77	Marbeli	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
38	M78	Raquel	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
39	M80	Valito	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
40	M81	Briceño	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
41	M82	N329	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
42	M83	N318	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
43	M84	Palma	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
44	M86	Karina	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
45	M88	Estrella	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
46	M89	Dolly	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
47	M92	Agustín	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
48	M94	Caro	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
49	M95	Arcela	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
50	M96	Barrosa	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
51	M99	Ruth	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento

Continuación tabla 7				
52	M100	Luis	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
53	M102	Servio	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
54	M104	Nena	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
55	M105	Carola	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
56	M106	Camelia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
57	M107	Jesenia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
58	M108	Pera	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
59	M109	Sabanera	Hembra	Sr. Campo Meneses
60	M110	8745	Hembra	Sra. Sandra Estupiñan
61	M111	197	Hembra	Sr. Juan Chandi

Del mismo modo se realiza el estudio de similitud del total de 131 muestras, tratadas con la enzima HphI. El corte da como resultado el 100% de similitud de un grupo de 49 muestras, con el Biotipo Pizan puro, misma que se observan en la figura 34, 35 y 36; que son los gráficos de similitud y agrupamiento de muestras arrojados por el programa “Primer7”.

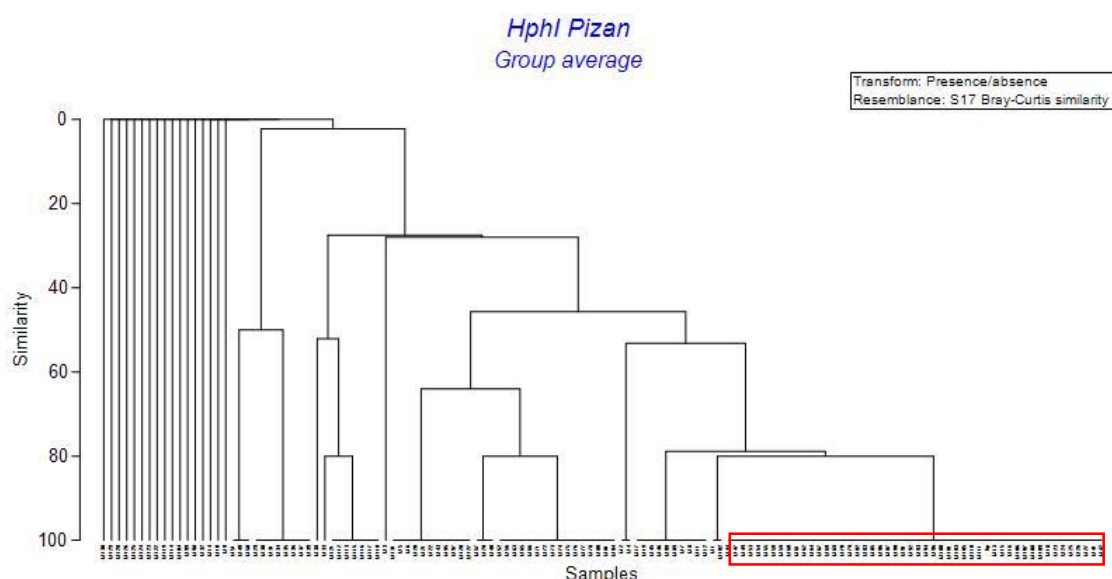


Figura 34. . Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa la similitud genética de las 131 muestras cortadas con la enzima HphI. En el recuadro rojo, las 49 muestras que tienen el 100% de similitud con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro.

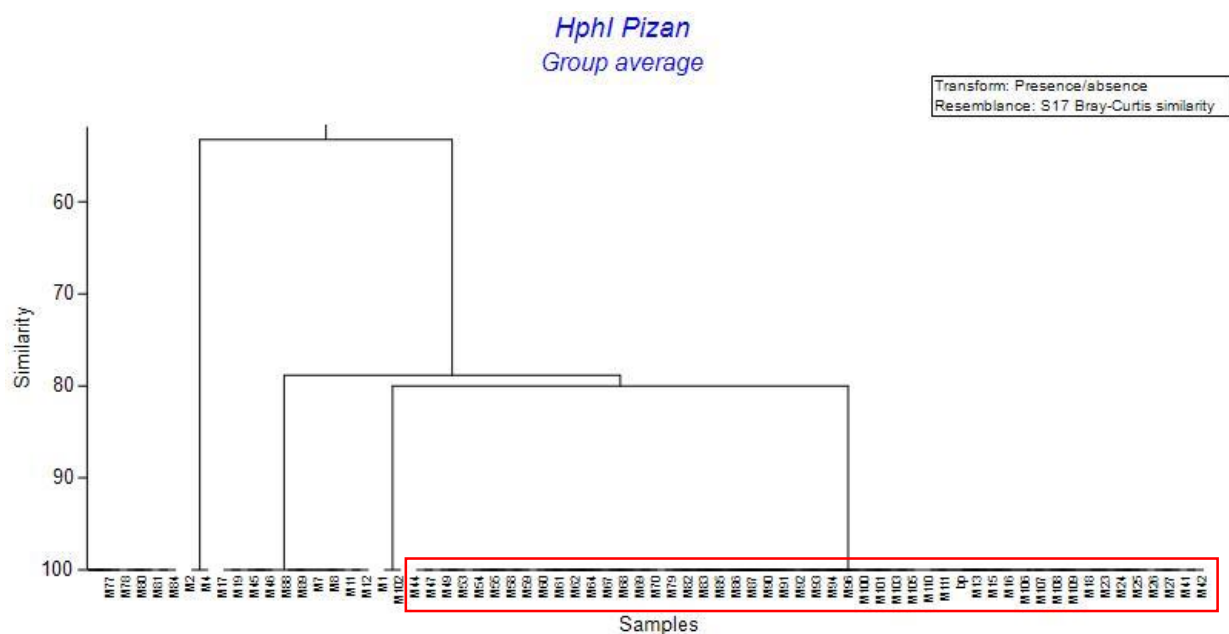


Figura 35. Grupo de muestras obtenidas del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 49 muestras con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser cortadas con la enzima HphI.

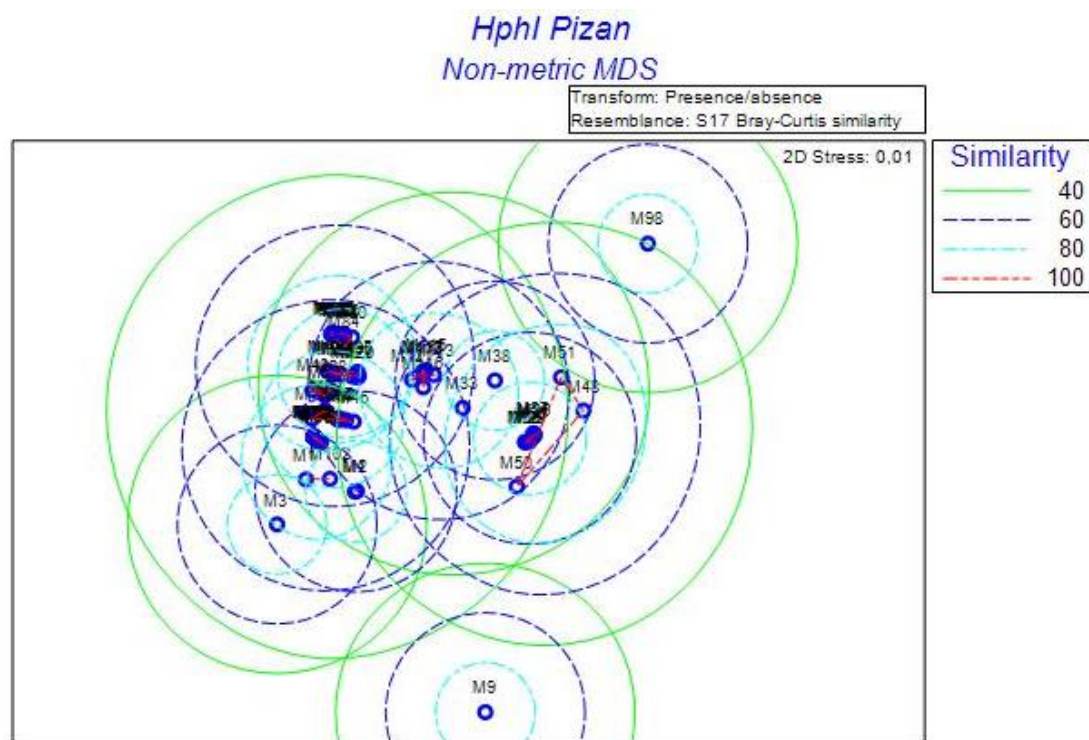


Figura 36. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 40%, 60%, 80% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HphI.

En la siguiente tabla se enlista el número de muestra con la identificación individual de los animales, además del sexo y los datos del propietario.

Tabla 8.

Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HphI y datos de animales y propietarios.

N°	MUESTRA	IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL	SEXO	PROPIETARIO
1	M13	0542	Hembra	Sr. Álvaro Hidalgo
2	M15	Dora	Hembra	Sr. Joel Navarrete
3	M16	Saleth	Hembra	Sr. Joel Navarrete
4	M18	Melany	Hembra	Sr. Anibal Cañarete
5	M23	307	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
6	M24	Marcelo 0	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
7	M25	664	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
8	M26	1005	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
9	M27	683	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
10	M41	678	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
11	M42	666	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
12	M44	969	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
13	M47	387	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
14	M49	100	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
15	M53	152	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
16	M54	448	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
17	M55	887	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
18	M58	224	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
19	M59	1003	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
20	M60	87	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
21	M61	397	Hembra	Dr. Alberto Landázuri

Continuación tabla 8				
22	M62	687	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
23	M64	319	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
24	M67	86	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
25	M68	27	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
26	M69	1004	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
27	M70	Salvador	Macho	Sra. Doris Chafuelan
28	M79	Glamour	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
29	M82	N329	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
30	M83	N318	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
31	M85	Loco Juan	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
32	M86	Karina	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
33	M87	Manta	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
34	M90	Salome	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
35	M91	N322	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
36	M92	Agustín	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
37	M93	Rosa	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
38	M94	Caro	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
39	M96	Barrosa	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
40	M100	Luis	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
41	M101	291	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
42	M103	Junior	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
43	M105	Carola	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
44	M106	Camelia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
45	M107	Jesenia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento

Continuación tabla 8

46	M108	Pera	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
47	M109	Sabanera	Hembra	Sr. Campo Meneses
48	M110	8745	Hembra	Sra. Sandra Estupiñan
49	M111	197	Hembra	Sr. Juan Chandi

El software Primer7 también nos permite realizar la evaluación de similitud de las muestras con el biotipo puro, tratadas con las dos enzimas de restricción, HindIII y HphI en simultáneo. Es decir, permite cruzar los resultados de cada muestra con cada una de las enzimas, para poder así reducir la similitud al mínimo, aumentando la especificidad del estudio.

En la figura 37 y 38 se observa el grupo de 27 muestras que han obtenido el 100% de similitud con el biotipo Pizan puro, al ser evaluados los resultados con las dos enzimas de restricción en simultáneo; lo cual aumenta la especificidad de la investigación.

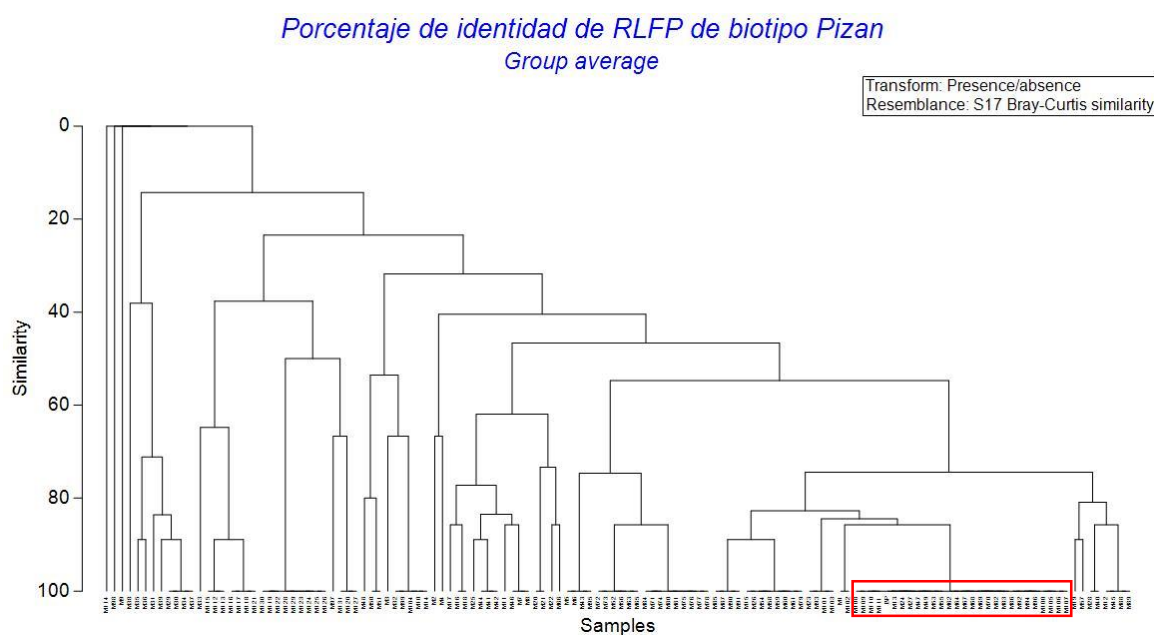


Figura 37. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa la similitud genética de las 131 muestras cortadas con las dos enzimas de restricción, HindII y HphI. En el recuadro rojo, las 27 muestras que tienen el 100% de similitud con la muestra denominada “bp” que es el Biotipo Pizan puro.

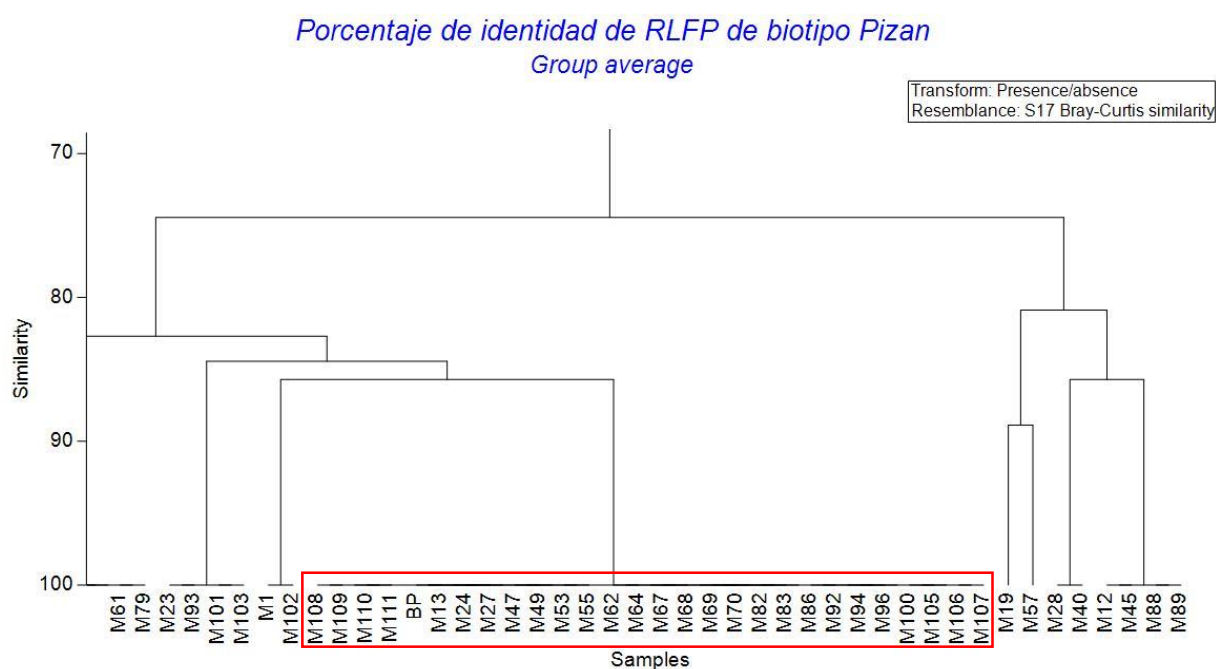


Figura 38. Resultados obtenidos del software “Primer7”, donde se observa el 100% de similitud genética de 27 muestras con la muestra denominada “BP” que es el Biotipo Pizan puro; luego de ser evaluadas las dos enzimas utilizadas en el estudio; HindIII y HphI.

Del mismo modo, en la figura 36, se observa el agrupamiento de las muestras evaluadas con las dos enzimas de restricción, mismas que tienen el 100% de similitud con el biotipo Pizan puro.

Porcentaje de identidad de RLFP de Biotipo Pizan 100%

Non-metric MDS

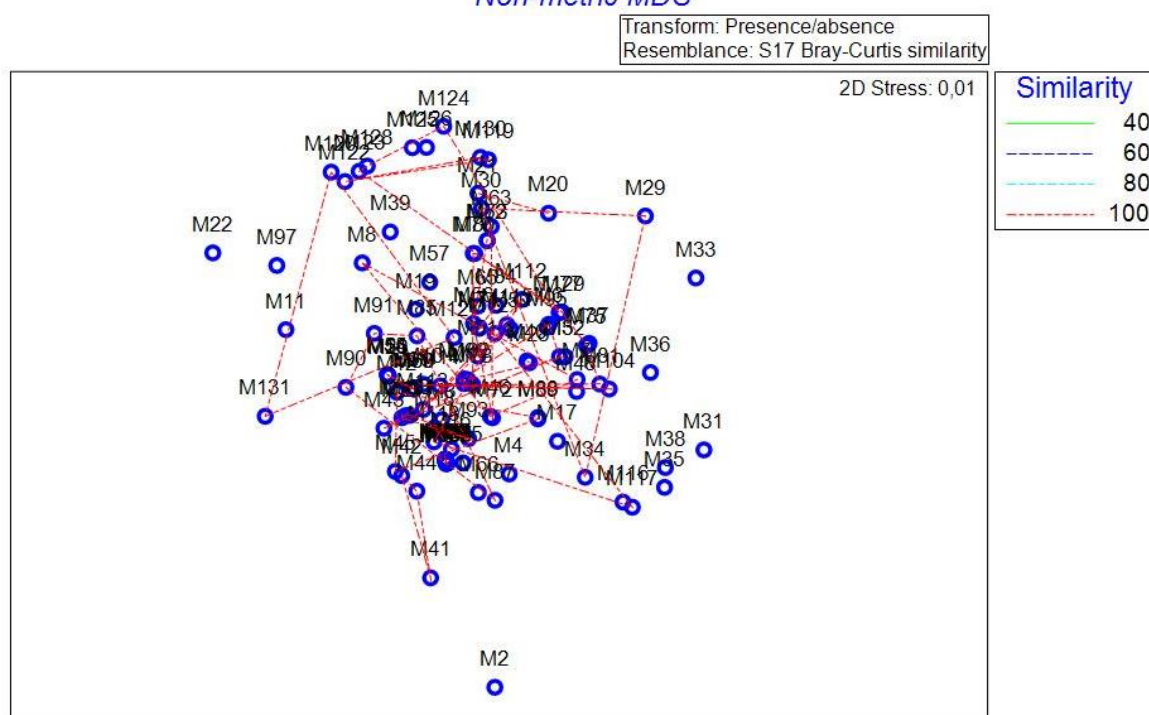


Figura 39. Agrupamiento de muestras de acuerdo al 40%, 60%, 80% y 100% de similitud con el biotipo Pizan puro luego de realizar digestión con HindIII y HphI.

En la siguiente tabla se enlista las 27 muestras que tienen el 100% de semejanza con el biotipo Pizan puro, evaluada con las enzimas de restricción HindIII y HphI. Además se incluye la identificación individual de cada animal, así como el sexo y el nombre del propietario de dichos semovientes.

Tabla 9.

Muestras con 100% de similitud al Biotipo Pizan puro, tratadas con HindIII y HphI y datos de animales y propietarios.

N°	MUESTRA	IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL	SEXO	PROPIETARIO
1	M13	0542	Hembra	Álvaro Hidalgo
2	M24	Marcelo 0	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
3	M27	683	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
4	M47	387	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
5	M49	100	Hembra	Dr. Alberto Landázuri

Continuación tabla 9				
6	M53	152	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
7	M55	887	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
8	M62	687	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
9	M64	319	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
10	M67	86	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
11	M68	27	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
12	M69	1004	Hembra	Dr. Alberto Landázuri
13	M70	Salvador	Macho	Sra. Doris Chafelan
14	M82	N329	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
15	M83	N318	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
16	M86	Karina	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
17	M92	Agustín	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
18	M94	Caro	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
19	M96	Barrosa	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
20	M100	Luis	Macho	Sr. Néstor Sarmiento
21	M105	Carola	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
22	M106	Camelia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
23	M107	Jesenia	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
24	M108	Pera	Hembra	Sr. Néstor Sarmiento
25	M109	Sabanera	Hembra	Sr. Campo Meneses
26	M110	8745	Hembra	Sra. Sandra Estupiñan
27	M111	197	Hembra	Sr. Juan Chandi

Analizando las muestras cortadas con la enzima HindIII se observa que 61 muestras, del total de 131 evaluadas, muestra un 100% de semejanza con el biotipo Pizan puro

proporcionado por la casa de genética animal “Biogensa”; lo cual nos da un porcentaje de 46.56% de la total del muestras, lo cual es bastante alto teniendo en cuenta las cruas indiscriminadas que ha tenido el biotipo a nivel del Carchi, a lo largo de los años.

Del mismo modo, al analizar las muestras digestadas con la enzima de restricción HphI, 49 muestras evidencian un 100% de similitud con el biotipo Pizan puro, lo cual arroja un porcentaje de 37.4%. Esto demuestra que ésta enzima tiene mayor grado de especificidad, con respecto a la utilizada anteriormente.

Para elevar aún más la especificidad de la prueba, se evaluaron las muestras tratadas con las dos enzimas en simultáneo, lo cual redujo las muestras semejantes a un grupo de 27; dando como resultado un 20.61% de muestras semejantes al biotipo Pizan puro, del total de muestras recolectadas; estos resultados son bastante bajos, pero alentadores, ya que se pueden hacer retro cruas con estos semovientes para lograr rescatar y conservar la genética pura del biotipo Pizan en la provincia del Carchi, Ecuador.

4.1.3. Socialización

Luego de realizar la socialización, aplicar encuestas y tabular los datos se obtienen los siguientes resultados:

El 9.09% de los encuestados piensa que la relevancia para algún actor o sector de la comunidad es media; el 36.36% piensa que es alta; mientras que el 54.55% de las personas que llenaron la encuesta piensan que la relevancia es muy alta; tal como se observa en el Figura 40.



Figura 40. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la comunidad?

En cuanto a las perspectivas para estudios complementarios posteriores, el 13,64% del total de encuestados piensa que son medias; el 18,18% piensa que son altas y el 68,18% piensa que son muy altas; tal como expresa el Figura 41.

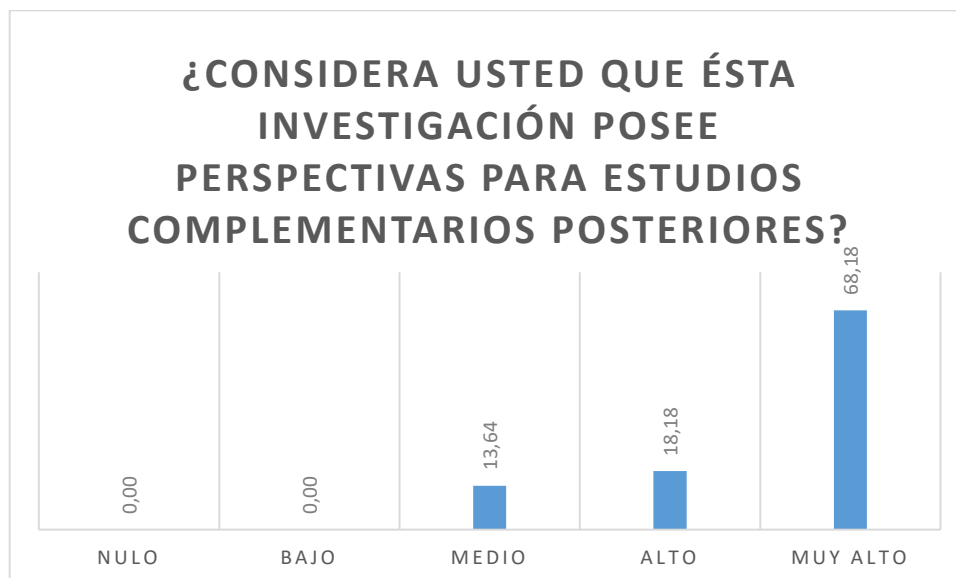


Figura 41. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?

El 13,64% del total de personas encuestadas considera que la investigación genera actualmente o a futuro beneficio para alguna organización en un nivel medio; el 31,82% considera que se genera beneficio en un nivel alto, mientras que el 54,55% considera que lo genera en un nivel muy alto. Como se evidencia en el Figura 42.

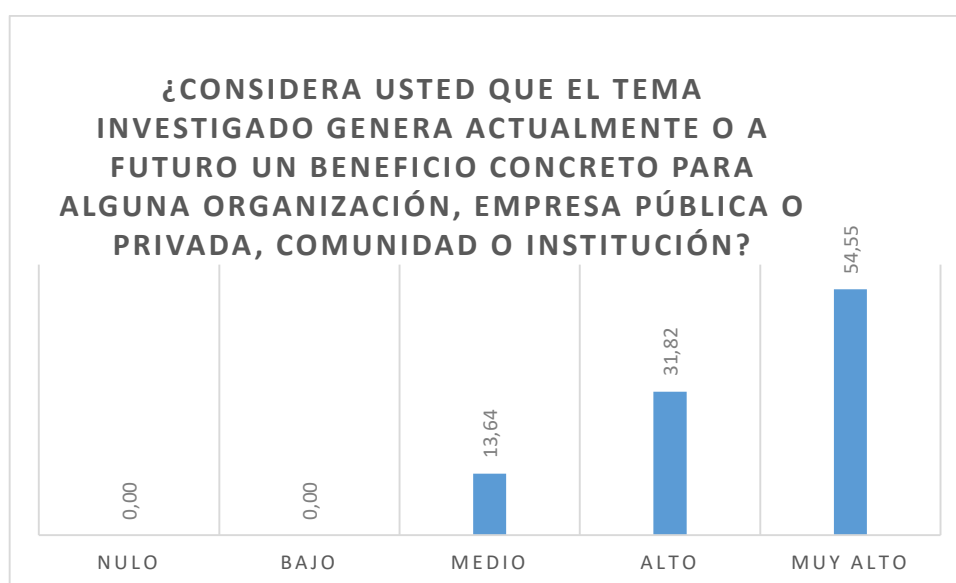


Figura 42. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

Por último, el 40.91% de los encuestados piensa que el cumplimiento de los objetivos planteados en la investigación fue alto; mientras que el 59.09% considera que dicho cumplimiento fue muy alto. Como se observa en el Figura 43.



Figura 43. Tabulación de los datos de la encuesta a la pregunta: ¿en función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que estos se cumplieron?

4.2.CONCLUSIONES

- Al obtener los puntos de muestreo y realizar la cartografía correspondiente se puede observar que el biotipo bovino Pizan ha tenido una distribución por las principales plazas productoras de leche del Carchi (San Gabriel, Huaca, Julio Andrade, El Ángel), a lo largo del tiempo, esto gracias a su alta capacidad para adaptarse a condiciones adversas, además de la rusticidad y resistencia a enfermedades y parásitos.
- En la comunidad de Pizan, donde fue desarrollado el biotipo, no se encuentra un alto conteo de animales de esta línea; por el contrario es uno de los sitios de muestreo donde menos ejemplares se observa, con tan solo 6 semovientes del biotipo.
- El porcentaje de animales puros Pizan en la provincia del Carchi es muy bajo. Teniendo en cuenta la alta producción de leche del biotipo, tanto en cantidad como en calidad, y la excelente adaptabilidad, rusticidad y resistencia que posee; así como la importancia genética que representa por el hecho de ser un biotipo desarrollado por y para las condiciones del Carchi, los resultados de la presente investigación dejan un balance negativo para los ganaderos y productores de leche del Carchi y del Ecuador.
- La calificación morfológica lineal del biotipo bovino pudo establecer que los animales seleccionados no presentaron una desviación representativa de la media, lo cual aseguró una selección adecuada de los semovientes identificados.
- Al contrastar los resultados de la bovinometría obtenida en la presente investigación con los datos obtenidos por Alvear (2008) se observa que Las medidas están dentro de los rangos obtenidos por Alvear, lo cual indica que la selección de animales Pizan que se realiza es correcta.
- Al realizar la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RLFP) lo primero que se puede constatar es que existen polimorfismos o mutaciones en el gen de la kappa caseína bovina (Csn3), al comparar el biotipo puro con las muestras recolectadas en la provincia del Carchi. En los cortes con las diferentes enzimas de restricción (HindIII, HphI) se evidencia diferencia de peso en los fragmentos, presencia de cortes extra o ausencia de sitios de restricción.
- El corte con la enzima de restricción HindIII nos arroja un grupo de similitud completa con el biotipo puro de 61 muestras; esto corresponde al 46.56% del total de muestras recolectadas y tratadas con esta enzima.
- El corte con la enzima de restricción HphI tiene una similitud del 100% en 49 muestras, que representan un 37.4% del total de muestras recolectadas en la provincia, y tratadas con la enzima HphI.
- Para aumentar la especificidad de la prueba se evalúa ambos cortes en simultáneo, arrojando 27 muestras 100% puras Pizan, lo que corresponde a un 20.61% del total de muestras evaluadas.

- La socialización de la presente investigación evidencia un gran interés y aceptación del público; determinando que el trabajo tuvo relevancia para algún sector de la sociedad; la investigación posee buenas perspectivas para la realización de trabajos futuros; además genera un beneficio a alguna organización, en la actualidad y a futuro. Los objetivos planteados fueron cumplidos satisfactoriamente.

4.3. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un censo a nivel del Carchi para conocer exactamente la ubicación y el número de animales del biotipo que existen.
- Para la conservación del biotipo bovino Pizan es recomendable almacenar sin fines comerciales el semen de los ejemplares más puros, de tal modo que la genética pueda ser usada por los productores de leche del Carchi. .
- Antes de conservar la genética del biotipo, resulta imprescindible realizar un examen sanitario para descartar enfermedades reproductivas que sean fuente de riesgo biológico.
- Para realizar los muestreos y mediciones bovinométricas es recomendable buscar métodos de inmovilización eficientes, si no se cuenta con una manga, para evitar accidentes y salvaguardar la integridad física tanto de los animales como del personal que los está manipulando.
- Resulta imprescindible extraer las muestras de sangre utilizando guantes para evitar un posible contagio con enfermedades zoonóticas que puedan tener los animales muestreados. Además conviene guardar las muestras en un cooler con hielo para evitar coagulación y facilitar la extracción del ADN.
- Es recomendable realizar estudios de caracterización genotípica del biotipo bovino Pizan utilizando técnicas diferentes a la del presente estudio, con el fin de aumentar la especificidad de la caracterización.
- Es importante evaluar los genes de la pigmentación característica y del doble pelaje presente en los animales del biotipo, en investigaciones futuras, ya que dichas características son bastante diferenciales frente a otras razas y líneas de ganado bovino en la zona.
- Proponer la inclusión del ganado Pizan como raza establecida, generando un banco genético y ayudando a la conservación de dicha ganadería.

4.4. ANEXOS

Anexo 1. Toma de punto GPS



Anexo 2. Ganado Pizan muestreado en el Ángel-Carchi



Anexo 3. Extracción de sangre a ternero Pizan en San Gabriel-Carchi



Anexo 4. Macho Pizan



Anexo 5. Extracción de sangre a macho adulto.



Anexo 6. Propietario junto a ejemplar muestreado



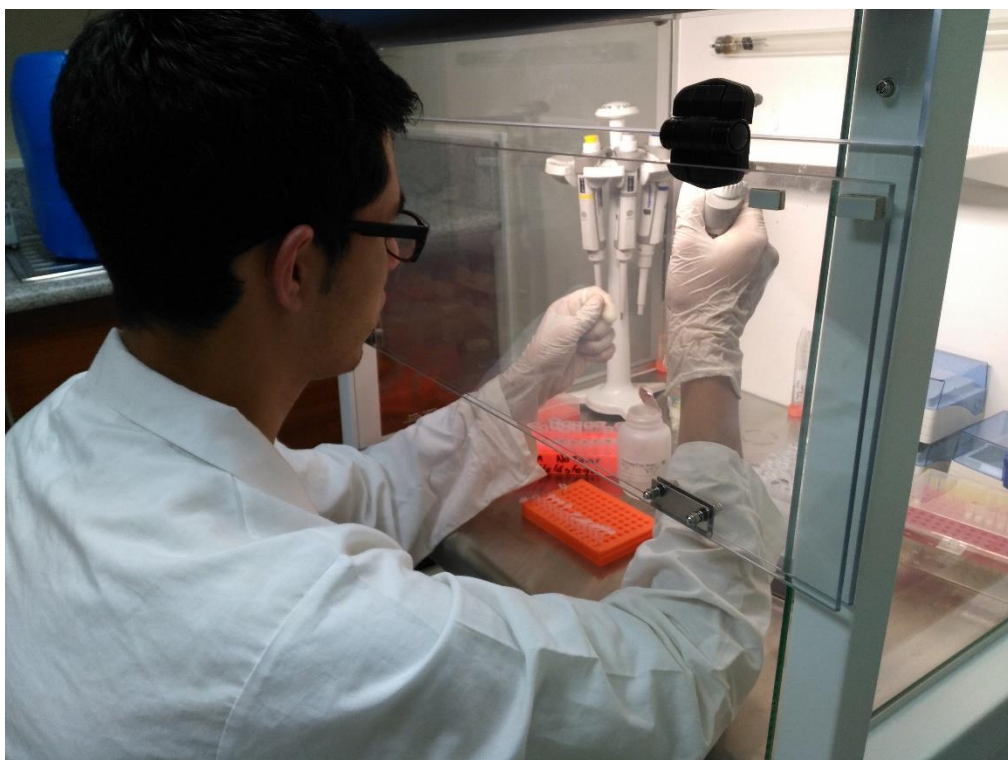
Anexo 7. ADN extraído de muestras de sangre



Anexo 8. Corte con enzimas de restricción



Anexo 9. Mezcla de reactivos para reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)



Anexo 10. Solidificación de gel de agarosa al 1%



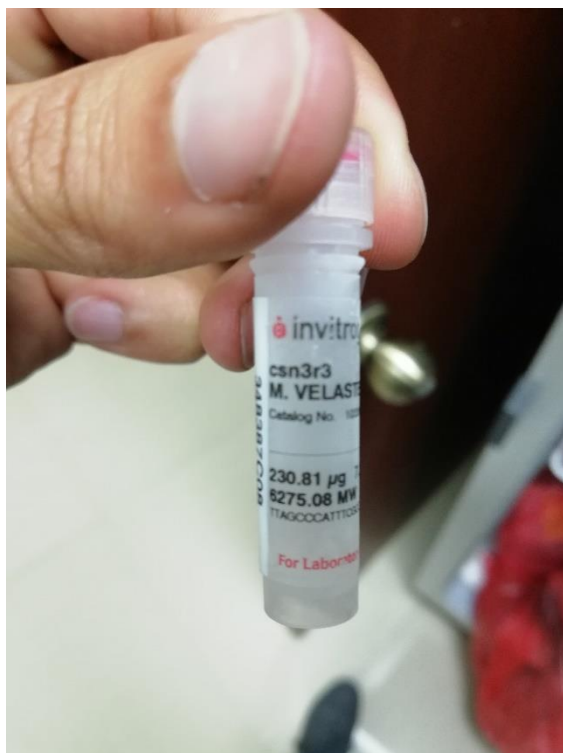
Anexo 11. Elaboración de gel de agarosa al 1%



Anexo 12. Muestras cortadas con enzima HindIII en Csn3 f3-r3



Anexo 13. Cebador Csn3 r3



Anexo 14. Enzima de restricción HindIII



Anexo 15. Microcentrífuga



Anexo 16. Transiluminador Uv.



Anexo 17. Cámara de electroforesis



Anexo 18. Kit de extracción de ADN



Anexo 19. Cámara de flujo laminar



Anexo 20. Asistencia a socialización



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: Sr. Juan David Arenas

CARRERA: Ingeniería en Zootecnia

FECHA: Jueves 26 de julio 2018

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Jessenia Calderin	0401944710	PUCE-SI	
Elisara Chamarro	0401600249	PUCE-SI	
Cinthya Oca	0450147954	PUCE-SI	
David Maldonado	100376184-6	PUCE-SI	
Johanna Cueva	100245397-5	PUCE-SI	
Johanna Urbino	100443555-6	PUCE-SI	
Roberto Ibarra	100379170-2	PUCE-SI	
Fabrizio Enriquez	100351632-3	PUCE-SI	
Bryan Pasquel	100342518-6	PUCE-SI	
Raul Lopez	171604866-3	PUCE-SI	
Francisco Jarama	100394170-3	PUCE-SI	
Magaly Deyana Lemos	100920820-1	PUCE-SI	
Mónica Velastegui	0503223024	PUCE-SI	
Diego Jarama	1720282026	PUCE-SI	



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: Sr. Juan David Arenas

CARRERA: Ingeniería en Zootecnia

FECHA: Jueves 26 de julio 2018

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Bruno Carrero	0401884390	ECAA	
Lis Calapi	0401885793	ECAA	
Gabriel Minda	1715946991	ECAA	
Leandro Hincapi	040184331-0	ECAA	
Elias Piyakaje	172372535-2	ECAA	
Pedro Pupiales	100354741-9	ECAA	
ESTEBAN GONZALEZ	1003559369	ECAA	
Jhanyra Arias	150085144-7	ECAA	
Michel Villarruel	100358110-3	ECAA	

BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, D., & Bedoya, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 38-42.
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 333-338.
- Almeida, M., Guamaní, G., Montenegro, E., García, D., Narváez, D., Moncayo, C., . . . Vásquez, C. (2003). Pizan: Bovino ecuatoriano. *CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS DE LOS BOVINOS CRIOLLOS EN ECUADOR-CONVENIO DE COOPERACIÓN TÉCNICA*, 4-22.
- Almeida, M., Vásquez, C., Terán, J., Torres, M., Tigsilema, D., Guamaní, G., & Moncayo, C. (2004). *Biotipo Bovino Criollo Pizan*. Obtenido de EDIFARM: https://quickvet.edifarm.com.ec//pdfs/articulos_tecnicos/BIOTIPO%20BOVINO%20CRIOLLO%20PIZAN.pdf
- Alvear, F. (2008). *Valoración biotipológica y caracterización Zoométrica del grupo Genético Autóctono Bovino Pizan*. . Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Atkins, G. (2006). Creando la vaca funcional. *Frisona Española*, 76-82.
- Bastidas, G. (04 de Marzo de 2010). *Manuel J. Bastidas (1887-1947) Biografía*. Obtenido de Manuel J. Bastidas: <http://manueljbastidas.blogspot.com/>
- Bogliolo, A. (2004). *Primer Design*. Roma: ISTITUTO DI CIENZE E ECNOLOGIE DELL' NFORMAZIONE.
- Bonifaz, N., & Riquelme, N. (2012). CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN LECHERA DE. *La Granja*, 15(1), 56-69.
- BOSSGEN. (2012). Pedro. *Sementales-Genética bovina ecuatoriana*, 3.
- Cheriyedath, S. (20 de Junio de 2016). *Técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmento (RFLP) de Restricción*. . Obtenido de News Medical Life Sciences: [http://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-\(RFLP\)-Technique-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-(RFLP)-Technique-(Spanish).aspx)
- Clin, J. (1999). *Primers*. Obtenido de VetLab: http://www.vetlab.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=43&Itemid=5
- Cuasapaz, K. (2012). *Caracterización fenotípica de la línea bovina Pizan en la sierra norte del Ecuador*. Quito: Universidad de las Américas .
- Dasgupta, S. (2 de Noviembre de 2014). *What is the similarity and/or difference between VNTR and RFPL?* Obtenido de Quora: <https://www.quora.com/What-is-the-similarity-and-or-difference-between-VNTR-and-RFPL>
- Elizondo, J. (2010). Anatomía de la ubre y secreción de la leche. *ECAG*, 32-35.

- Escalona, F. (2011). *Bovinos*. Zulia: La Universidad de Zulia.
- Flores, J., & Agraz, A. (1985). *Cría, explotación, enfermedades e industrialización bovina*. (3a ed.). México: Limusa.
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 31-41.
- Invitrogen. (2018). *PureLink® Genomic DNA Kits*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>
- Izquierdo, M. (2014). *Curso de genética molecular e ingeniería genética*. Madrid: Editorial Pirámide.
- Mahecha, L., Angulo, J., & Manrique, L. (2002). Estudio bovinométrico y relaciones entre medidas corporales y el peso vivo en la raza Lucerna. *Revista Colombiana de Ciencias*, 80-87.
- Pacheco, V. (2010). *Caracterización de las variantes del gen de K-caseína en razas de ganado bovino*. Reynosa: Instituto Politécnico Nacional-Centro de Biotecnología Genómica.
- Pacheco, V. (2010). *Caracterización de las variantes del gen de K-Caseína en razas de ganado bovino*. Reynosa: Instituto Politécnico Nacional.
- Pavan, W. (s.f.). *Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/glossarys/index.cfm?id=176>
- Pérez de Saltos, A. M. (2010). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Pérez, J., & Noriega, M. (2008). *Replicación del ADN*. Cantabria: Universidad de Cantabria.
- Promega. (2018). *EcoRI*. Obtenido de Overview: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/restriction-enzymes/ecori/?catNum=R6011>
- Promega. (2018). *PCR Markers*. Obtenido de Promega: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/dna-ladders/?catNum=G3161>
- Robitaille, G., Britten, M., Morisset, J., & Petitclerc, D. (2005). Polymorphism in the bovine kappa-casein (CSN3) gene and the 5'-flanking region: sequence analysis of CSN3 A and B alleles. *Anim. Genet.*, 184-185.
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular-Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Mexico D.F.: McGraw Hill Education.

- Sanín, Y., Maldonado, J., Carillo, D., & Rodríguez, N. (Junio de 2014). *Desarrollo fetal, Gestación y parto en la vaca*. Obtenido de ResearchGate:
https://www.researchgate.net/publication/263389418_Desarrollo_fetal_Gestacion_y_parto_en_la_vaca
- Segura, J., Jiménez, A., Llamas, R., & Jiménez, A. (1997). El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. *ENDODONCIA*, 90-07.
- Tamayo y Tamayo, M. (2014). *El Proceso de la Investigación Científica*. Bobotá, Colombia: Limusa S.A.
- Thermo Scientific™. (2018). *HindIII (10 U/μL)*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0501>
- Thermo Scientific™. (2018). *HphI (10 U/μL)*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1101>
- Trujillo, E., Noriega, D., & Camargo, M. (2000). Genotipificación de Kappa-Caseína y evaluación de las frecuencias genotípicas y alélicas de sus polimorfismos en cuatro razas . *Actualidades Biológicas*, 145-152.
- Valerio, D. (2009). *Ganado Bovino*. IDIAF.
- Vidal, V. (2009). *Caracterización del comportamiento productivo y reproductivo del ganado criollo Pizan*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008). *Biología Molecular del gen*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Yábar, C. (2003). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
- Zepeda, J. (2013). *Genotipificación para K-caseína, β-caseína y β-lactoglobulina en bovinos Jersey*. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.