

ESTUDIO CON MICROSATÉLITES DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES DE GANADO PORCINO DEL TRONCO IBÉRICO

STUDY USING MICROSATELLITES OF MAIN VARIETIES OF IBERIAN PIG

Martínez, A.M.¹, A. Rodero¹ y J.L. Vega-Pla²

¹Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Avenida de Medina Azahara s/n. 14005 Córdoba. España.

²Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Apartado Oficial Sucursal 2. 14071 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Recursos genéticos. DNA. PCR. Heterocigosidad. Distancia genética.

ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic resources. DNA. PCR. Heterocigosity. Genetic distance.

RESUMEN

Se caracteriza una muestra de 10 variedades de Cerdo Ibérico y una de Duroc con un panel de 25 microsatélites. Se detectó un número de alelos entre 4 y 20. Los valores de heterocigosidad por *locus* fluctuaron entre 0,03 para S0355 y 0,73 para S0068. La media del valor de α como medida de la diversidad genética fue de 0,12. Después de la representación de la distancia genética estándar usando el UPGMA algoritmo, las variedades Lampiño y Torbiscal se encontraron muy bien definidas, pero en el caso de las variedades Retinto extremeño, Entrepelado y Silvela no fue así.

SUMMARY

It is characterized a sample of 10 Iberian Pigs strains and one of Duroc with a panel of 25 microsatellites. It was detected a number of alleles between 4 and 20. The values of Heterocigosity by *locus* ranged between 0.03 for S0355 and 0.73 for S0068. The mean of α as genetic diversity measure was 0.12. After UPGMA

tree representation from standard genetic distances, the strains Lampiño, Torbiscal were very well defined but Retinto Extremeño, Entrepelado and Silvela were not.

INTRODUCCIÓN

El Cerdo Ibérico es el representante porcino más emblemático que existe en España y ha sido criado durante siglos mediante métodos tradicionales en régimen extensivo. En este momento algunas variedades podrían estar próximas a la extinción, de ahí la importancia del conocimiento de la estructura genética de este Tronco Ibérico con el fin de determinar si existe o no una división en subpoblaciones desde el punto de vista genético para, en el futuro, diseñar planes de conservación y recuperación de dichas variedades.

La tecnología de la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) permite la caracterización de un tipo de secuencias muy polimórficas denominadas microsatélites. Son muy frecuentes en el genoma, generalmente tienen alelos codominantes, su tipificación es sencilla y su caracterización permite establecer comparaciones genéticas entre alelos, genes, individuos y poblaciones.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos en la tipificación de 25 microsatélites, escogidos dentro de los 27 recomendados por el grupo de expertos de la ISAG/FAO para los estudios de biodiversidad porcina, sobre una muestra de 217 animales compuesta por individuos pertenecientes a las variedades: Retinto Extremeño, Retinto Portugués, Entrepelado, Mamellado, Torbiscal, Silvela, Lampiño y Dorado Gaditano. Además se tipifican algunos ejemplares de Manchado de Jabugo y Duroc.

A partir de la caracterización de las diferentes variantes alélicas se calculan parámetros estadísticos como pruebas de equilibrio, diversidad y distancia genética con la finalidad de estudiar la estructura genética de esta población,

confirmar la entidad de algunas de las diferentes variedades y establecer un árbol filogenético que incluya también el cerdo Manchado de Jabugo y el Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un muestreo al azar dentro de cada una de las subpoblaciones tomando muestras de varias ganaderías cuando es posible. Se extrae el ADN de una muestra de sangre mediante lavados sucesivos en TE (Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH 8), o pelo y digestión con Proteinasa K. La amplificación con PCR se realiza empleando cebadores marcados con fluorocromos y la caracterización alélica con un secuenciador automático *ABI 373 Stretch*. Se calculan la heterocigosidad mediante recuento directo, los estadísticos-F (Weir y Cockerham, 1984) y se realiza un análisis UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) basado en la distancia genética estándar de Nei (1972) que se interpreta gráficamente mediante el programa TFGA^a (Miller, 1997).

Tabla I. Número de ejemplares estudiados por subpoblaciones (N) y heterocigosidad media (Hm). (Number of animal studied by subpopulations (N) and mean of heterocygosity (Hm)).

Variedad o raza	N	Hm	Variedad o raza	N	Hm
Retinto Portugués (RETP)	14	0,5738	Silvela (SILV)	14	0,5298
Mamellado (MAME)	9	0,5728	Manchado de Jabugo (MANJ)	5	0,2940
Entrepelado (ENTR)	41	0,5409	Mamellado por Silvela (MXSI)	21	0,5392
Retinto Extremeño (RETE)	30	0,5028	Dorado Gaditano (DOGA)	7	0,5074
Lampiño (LAMP)	30	0,5605	Duroc (DURO)	17	0,5394
Torbiscal (TORB)	29	0,4840	Total	217	0,5275

TIPIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES EN GANADO PORCINO IBÉRICO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se refleja el número de muestras analizadas en cada subpoblación. De las variedades de Mamellado, Manchado de Jabugo y Dorado Gaditano se dispone de muy pocas muestras, pero el número de marcadores empleado permite darle a los resultados un cierto margen de confianza, por lo que se incluyen en el estudio. Se tipifican también 17 muestras de cer-

dos de raza Duroc por ser ésta muy empleada en la realización de cruza- mientos industriales siendo interesante comprobar el grado de distanciamiento genético entre esta raza y las otras variedades de cerdo Ibérico.

La heterocigosidad detectada con este panel de microsateélites ronda el valor de 0,5 excepto en el caso del Manchado de Jabugo que es muy infe- rior, probablemente por la deficiencia de la muestra aunq en caso del

Tabla II. Número de alelos, heterocigosidad por locus (H), valor de c^2 , grados de libertad (g.l.), probabilidad de equilibrio (p). (Number of alleles, heterocosity by locus (H), c^2 values, fredom degrees (g.l.), equilibrium probanbilitly (p)).

Locus	Alelos	H	c^2	g.l.	p	Referencia
CGA	19	0,7152	615,4116	171	0,0000	Ellegren <i>et al.</i> ,1994
S0101	10	0,5202	232,7194	45	0,0000	Ellegren <i>et al.</i> ,1994
S0215	3	0,1657	6,8948	3	0,0753	Robic <i>et al.</i> ,1995
S0355	4	0,0345	131,7392	6	0,0000	Millan <i>et al.</i> ,1996
SW911	7	0,6441	111,4593	21	0,0000	Roher <i>et al.</i> ,1994
SW936	9	0,7068	50,6725	36	0,0532	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0068	12	0,7360	283,1696	66	0,0000	Fredholm <i>et al.</i> ,1993
SW632	10	0,6524	84,4311	45	0,0003	Roher <i>et al.</i> ,1994
SW24	8	0,5355	185,6016	28	0,0000	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0225	8	0,6256	75,1925	28	0,0000	Archival <i>et al.</i> ,1995
SW122	7	0,5000	147,3714	21	0,0000	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0090	5	0,5577	28,7851	10	0,0013	Ellegren <i>et al.</i> ,1993
S0226	7	0,5381	78,3810	21	0,0000	Robic <i>et al.</i> ,1995
SW951	5	0,1944	13,2494	10	0,2101	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0228	6	0,1014	0,5910	15	1,0000	Robic <i>et al.</i> ,1995
S0178	10	0,6667	125,8032	45	0,0000	Ellegren <i>et al.</i> ,1994
S0005	17	0,6421	270,8109	136	0,0000	Fredholm <i>et al.</i> ,1993
S0386	8	0,6537	68,7098	28	0,0000	Riquet <i>et al.</i> ,1995
SW72	5	0,6244	52,8717	15	0,0000	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0002	9	0,6488	69,3498	36	0,0007	Fredholm <i>et al.</i> ,1993
SW857	7	0,6777	32,1457	21	0,0566	Roher <i>et al.</i> ,1994
S0026	6	0,2383	89,7192	15	0,0000	Coppieters <i>et al.</i> ,1993
IGF1	6	0,6520	21,0049	15	0,1367	Wintero <i>et al.</i> ,1994
S0155	5	0,5023	66,6465	10	0,0000	Ellegren <i>et al.</i> ,1994
SW240	7	0,6528	49,3404	21	0,0005	Roher <i>et al.</i> ,1994

Mamellado y dorado Gaditano no se aprecia este defecto. Se han encontrado algunos microsátélites muy polimórficos como CGA, S0068 y S0005 con más de 10 alelos (**tabla II**) pero en ningún caso se alcanza una heterocigosidad de 0,8 por que cada subpoblación exhibe varios de los alelos pero no todos.

Los valores que adquiere la prueba de χ^2 son elevados en la mayoría de los casos con una probabilidad de equili-

brio próxima a cero, excepto para el marcador S0228. El equilibrio de la muestra tomada como un conjunto no existe, pero si se observa la **tabla III** este valor de probabilidad de equilibrio para cada una de las subpoblaciones aumenta. Estos resultados parecen indicar que la muestra está compartimentada.

Se calculan los estadísticos-F para comprobar la posible correlación entre los alelos presentes y la existencia de

Tabla III. Probabilidad de equilibrio (p) de χ^2 para cada una de las subpoblaciones. (Equilibrium probability (p) for each subpopulation).

Locus	RETP	MAME	ENTR	RETE	LAMP	TORB	SILV	MANJ	MXSI	DOGA	DURO
CGA	0,7127	0,7164	0,7790	0,0056	0,1825	0,0047	0,3531	1 alelo	0,0001	0,1516	0,3487
S0101	0,5439	0,8428	0,0010	0,7063	0,0842	0,8395	0,2266	0,7290	0,6655	0,8387	0,9923
S0215	0,8898	1 alelo	0,7911	0,9131	1 alelo	0,5752	0,5050	1 alelo	0,9110	1 alelo	0,0619
S0355	1 alelo	0,8504	0,9273	0,0020	1 alelo	1 alelo	1 alelo	1 alelo	1 alelo	0,0082	0,9741
SW911	0,9799	0,7212	0,0275	0,7991	0,7445	0,2486	0,1794	0,8210	0,0855	0,7262	0,0000
SW936	0,1004	0,9487	0,5169	0,0010	0,6885	0,1356	0,4308	0,7660	0,7811	0,7722	0,0333
S0068	0,7563	0,1557	0,0000	0,0057	0,0007	0,0385	0,2851	0,6962	0,5951	0,2971	0,0125
SW632	0,9425	0,1316	0,9811	0,3456	0,0267	0,9206	0,5062	0,8038	0,9403	0,0804	0,8270
SW24	0,9847	0,2783	0,6684	0,4137	0,4692	0,8554	0,5050	1 alelo	0,0090	0,9425	0,2492
S0225	0,0301	0,7907	0,0534	0,2588	0,5200	0,5208	0,1221	1 alelo	0,5779	0,9044	0,0033
SW122	0,3759	0,6767	0,1225	0,3370	0,9680	0,0611	0,8065	0,0833	0,0094	0,2115	0,1156
S0090	0,4816	0,1404	0,0828	0,1798	0,3680	0,3303	0,7945	0,5276	0,7787	0,4830	0,8650
S0226	0,0001	0,2703	0,6857	0,1107	0,7402	0,8835	0,8973	0,7751	0,0241	0,6592	0,8885
SW951	0,5329	1 alelo	0,9818	0,0001	0,1298	0,5254	0,9937	1 alelo	0,9110	1 alelo	0,8791
S0228	0,9953	1 alelo	0,9959	0,8475	0,5428	1 alelo	0,8853	0,7751	0,8188	0,8387	1 alelo
S0178	0,5936	0,5216	0,5694	0,0059	0,6841	0,3374	0,8297	0,4844	0,0003	0,0018	0,0879
S0005	0,2799	0,2223	0,0224	0,2729	0,1341	0,7743	0,0078	1 alelo	0,0567	0,7582	0,8611
S0386	0,9045	0,2859	0,0010	0,9316	0,0811	0,1674	0,9221	0,3958	0,9412	0,6408	0,0151
SW72	0,2617	0,1516	0,2186	0,4222	0,1686	0,3258	0,3683	0,5403	0,0759	0,2237	0,8076
S0002	0,1201	0,8956	0,0000	0,7001	0,1072	0,8088	0,2374	0,7751	0,7761	0,4864	0,9855
SW857	0,8155	0,7291	0,0908	0,5017	0,4350	0,2575	0,6202	0,9577	0,3036	0,7791	0,8580
S0026	0,1802	0,9348	0,1931	0,1046	0,0260	0,4497	0,0067	1 alelo	0,0002	0,8387	No test
IGF1	0,6306	0,3458	0,5417	0,6556	0,4201	0,1744	0,8997	0,7751	0,6278	0,6851	0,3530
S0155	0,3704	0,0897	0,2837	0,7518	0,4906	0,0008	0,0997	0,1360	0,3351	0,7722	0,7474
SW240	0,8626	0,0394	0,1841	0,0004	0,1258	0,0000	0,9760	0,2401	0,3861	0,2945	0,9482
Promedio	0,5560	0,4881	0,3888	0,3709	0,3538	0,4015	0,5191	0,6048	0,4421	0,5389	0,5180

TIPIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES EN GANADO PORCINO IBÉRICO

Tabla IV. Estadísticos-F por locus. (F-statistics by locus).

Locus	F	q	f	Locus	F	q	f
CGA	0,2242	0,1276	0,1108	SW951	0,0171	0,0475	-0,0320
S0101	0,1586	0,1455	0,0153	S0228	-0,0304	0,0304	-0,0627
S0215	0,1263	0,2623	-0,1843	S0178	0,1526	0,0904	0,0684
S0355	0,4947	0,0899	0,4448	S0005	0,2086	0,1409	0,0788
SW911	0,1943	0,1442	0,0585	S0386	0,1355	0,0959	0,0438
SW936	0,1145	0,1024	0,0135	SW72	0,1025	0,0717	0,0333
S0068	0,1458	0,1211	0,0281	S0002	0,1150	0,1095	0,0061
SW632	0,1659	0,1419	0,0279	SW857	0,0507	0,0783	-0,0299
SW24	0,2783	0,2178	0,0774	S0026	0,3665	0,1096	0,2885
S0225	0,0753	0,1062	-0,0346	IGF1	0,1123	0,0926	0,0216
SW122	0,2668	0,1226	0,1643	S0155	0,1790	0,1727	0,0076
S0090	0,1992	0,1431	0,0654	SW240	0,1670	0,1156	0,0580
S0226	0,1958	0,1231	0,0830	Media	0,1657	0,1225	0,0491

subpoblaciones (**tabla IV**). Hay que destacar los valores tan altos que adquieren los estadísticos citados en el caso del marcador S0355 pero hay que señalar que éste se presenta de forma casi monomórfica en las diferentes subpoblaciones. El caso contrario ocurre con S0228 donde los valores de los

estadísticos son muy bajos, esto se puede interpretar junto con el equilibrio que manifiesta la muestra considerada en su totalidad, como que este marcador no se ve afectado por el hecho de que un individuo pertenezca a una subpoblación o a otra, aunque este marcador también se comporta de

Tabla V. Distancia genética de Nei de 1972. (Nei's genetic distance).

Variedad	RETP	MAME	ENTR	RETE	LAMP	TORB	SILV	MANJ	MXSI	DOGA	DURO
RETP	*****										
MAME	0,3364	*****									
ENTR	0,1721	0,1654	*****								
RETE	0,1893	0,1761	0,0543	*****							
LAMP	0,2689	0,2935	0,1765	0,1605	*****						
TORB	0,3016	0,2817	0,2364	0,2624	0,2301	*****					
SILV	0,2243	0,2214	0,0901	0,0893	0,1797	0,1838	*****				
MANJ	0,4095	0,3876	0,2894	0,2849	0,3972	0,4544	0,3446	*****			
MXSI	0,2343	0,1057	0,0890	0,0903	0,2074	0,2456	0,1567	0,3626	*****		
DOGA	0,3195	0,3023	0,1502	0,1785	0,2155	0,3373	0,2008	0,5093	0,2054	*****	
DURO	0,4296	0,5269	0,3425	0,3850	0,3688	0,5661	0,3921	0,5000	0,4501	0,3361	*****

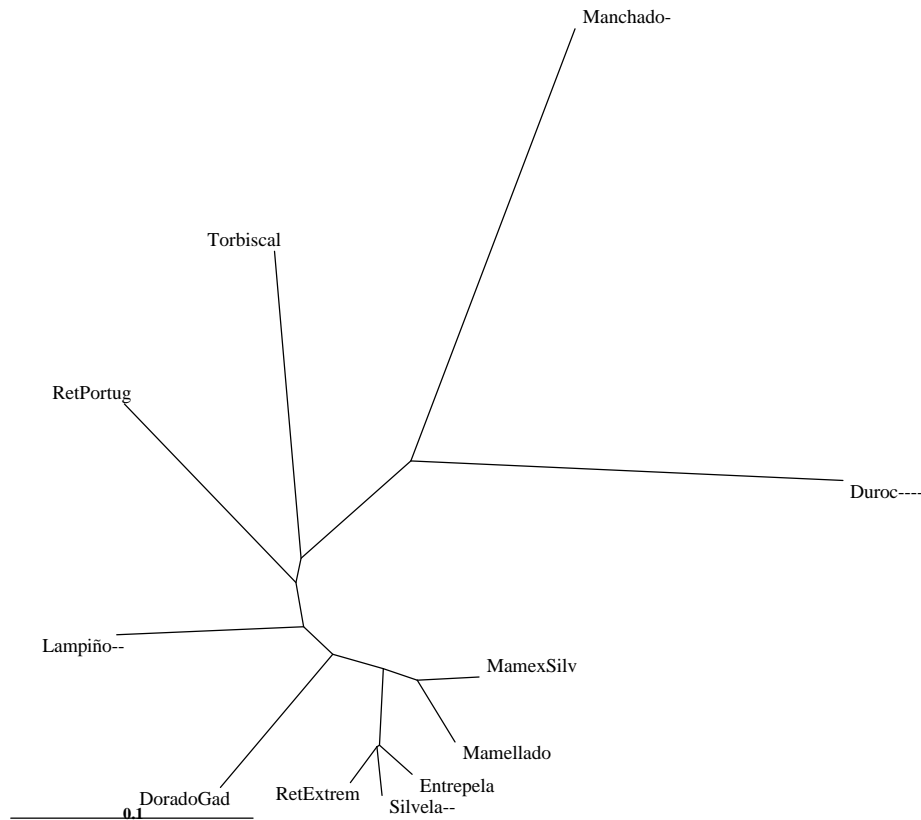


Figura 1. Representación gráfica después del análisis UPGMA basado en la distancia de Nei de 1972.

forma prácticamente monomórfica en todas las subpoblaciones, presentando esporádicamente algunos alelos diferentes. El valor de F para el conjunto de la muestra es elevado lo que indica un desequilibrio de las frecuencias genotípicas del total de la población con respecto a las frecuencias alélicas obtenidas. La razón puede estar en que el muestreo no sea el adecuado o a que la población esté subdividida en subpoblaciones. El valor de f , sin embargo, es relativamente pequeño, lo

que indica que hay un grado bajo de desequilibrio de las frecuencias genotípicas con respecto a las alélicas dentro de las subpoblaciones, por lo que el valor alto de F se debería al efecto de compartimentación de la población, hecho que se ve reafirmado por el estadístico α que expresa el grado de diferenciación de las posibles subpoblaciones y que adquiere un valor significativo. Mediante las pruebas *jackknife* y *bootstrap* se determinan la desviación estándar (0,0072) y el inter-

TIPIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES EN GANADO PORCINO IBÉRICO

valo de confianza al 95 p.100 del valor obtenido para $\chi^2(0,14-0,11)$.

El resultado es que a pesar de que en algunas variedades las muestras son escasas y de que no se han tipificado las muestras de Duroc con el microsatélite S0026, la hipótesis de que hay subpoblaciones muy bien definidas dentro del Tronco Ibérico puede ser cierta. Con el fin de determinar la distancia genética que separa a cada una de las variedades tipificadas y la raza Duroc se calcula la misma utilizando el método propuesto por Nei en 1972 (**tabla V**). El Duroc presenta valores elevados de distancia con respecto al resto de las variedades, por lo que se puede afirmar que ésta raza y el Cerdo Ibérico están claramente diferenciados desde el punto de vista gené-

tico. A la vista de la representación gráfica de los resultados del análisis UPGMA (**figura 1**) de las distancias genéticas obtenidas, se pueden apreciar variedades muy definidas como Torbiscal, Retinto Portugués y Lampiño. Las variedades Retinto Extremeño, Entrepelado y Silvela están próximas desde el punto de vista genético y son diferentes de las restantes. Las subpoblaciones de Manchado de Jabugo, Mamellado y Dorado Gaditano parecen tener también una entidad propia pero debido a la deficiencia en el número de muestras se requiere prudencia antes de emitir un juicio al respecto, aunque a favor del mismo está el resultado de tipificar muestras del cruce de Mamellado con Silvela que se sitúa entre las dos variedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Archibald, A., J. Brown, S. Couperwhite, H.M. Quee, D. Nicholson, C.Haley, W. Coppieters, A. Van de Weghe, A. Stratil, A. Wintero, M. Fredholm, N. Larsen, V. Nielsen, D. Milan, N. Woloszyn, A. Robic, M. Dalens, J. Riquet, J. Gellin, J. Caritez, D. Hue, G. Burgaud, L. Ollivier, J. Bidanel, M. Vaiman, C. Renard, H. Gelderman, R. Davoli, D. Ruyter, E. Verstege, M. Groenen, W. Davies, B. Hoyheim, A. Keiserud, L. Andersson, H. Ellegren, M. Johansson, L. Marklund, R. Miller, D. Anderson, E. Signer, A. Jeffreys, C. Moran, P.L. Tissier, Muladno, M. Rothschild, C. Tuggle, D. Vaske, J. Helm, H. Liu, A. Rahman, T. Yu, R. Larson and C. Schmitz. 1995. The PiGMaPconsortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome*, 6: 157-175.
- Coppieters, W., A.V. d. Weghe, L. Peelman, A. Depicker, A. V. Zeveren and Y. Bouquet. 1993. Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. *Animal Genetics*, 24: 163-170.
- Ellegren, H., B. Chowdhary, M. Johansson, L. Marklund, M. Fredholm, I. Gustavsson and L. Andersson. 1994. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics*, 137: 1089-1100.
- Ellegren, H., M. Johansson, B. Chowdhary, S. Marklund, D. Ruyter, L. Marklund, B. Nielsen, I. Edfords-Lilja, I. Gustavsson, R. Juneja and L. Andersson. 1993. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics*, 16: 431-439.
- Fredholm, M., A.K. Wintero, K. Christensen, B. Kristensen, P.B. Nielsen, W. Davies and A. Archibald. 1993. Characterization of 24 porcine (dA-dC)n-(dT-dG)n microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mammalian Genome*, 4: 187-92.

MARTÍNEZ, RODERO Y VEGA-PLA

- Milan D., N. Woloszyn, M. Yerle, P.L. Roy, M. Bonnet, J. Riquet, Y.L. Mansais, J.C. Caritez, A. Robic, P. Sellier, J.M. Elsen and J. Gellin. 1996. Accurate Mapping of the acid meat RN gene on genetic and physical maps of pig chromosome 15. *Mammalian Genome*, 7: 41-45.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) ver 1.3: A Windows program for the analysis of alloenzyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283-292.
- Riquet, J., D. Milan, N. Woloszyn, A. Schmitz, F. Pitel, G. Frelat and J. Gellin. 1995. A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted Chromosome 11. *Mammalian Genome*, 6: 623-628.
- Robic, A., M. Dalens, N. Woloszyn, D. Milan, J. Riquet and J. Gellin. 1994. Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mammalian Genome*, 5: 580-583.
- Rohrer, G.A., L.J. Alexander, J.W. Keele, T.P. Smith and C.W. Beattie. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, 136: 231-245.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freedman & Company. San Francisco.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wintero, A., M. Fredholm and L. Andersson. 1994. Assignment of the gene for porcine insulin like growth factor (IGF1) to chromosome 5 by linkage mapping. *Animal Genetics*, 25: 37-39.