

# Empleo de técnicas moleculares en el apoyo a la conservación del cerdo Chato Murciano

J. L. Vega-Pla<sup>1</sup>, A. M. Martínez<sup>2</sup>, B. Peinado, A. Poto<sup>2</sup>, y J. V. Delgado<sup>3</sup>

Ministerio de Defensa, Laboratorio de Genética Molecular. Córdoba, España

## The use of molecular techniques in support of conservation of the Murciano breed of pigs

**ABSTRACT:** Use of molecular markers-based allelic typing techniques to support recuperation efforts with populations in danger of extinction was evaluated. In a sample of 83 pigs of the Chato Murciano breed, 26 microsatellites, recommended for studies on genetic diversity of swine, were characterized. Allelic frequencies were obtained by direct count. Observed, unbiased and expected heterozygosities were calculated for each marker and pairs of genetic distances between individuals were based on the proportion of shared alleles. A phylogenetic tree was constructed from the values of distance obtained. The number of alleles present is clearly less than that found in other swine breeds. The process of conserving this breed could continue by further construction of the phylogenetic tree of individuals; since, in spite of the fact that it was necessary to create a line of the breed by assimilative crossbreeding to a large White female, a tendency was observed toward absorption of this animal's genotype in favor of Chato Murciano genotypes over several generations. This approach would also facilitate selection of the best crosses based on the genotypes evaluated.

Key words: Pig, Microsatellites, Genetic distance, Genetic resources

© 2004 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2004. Vol. 12 (Supl. 1): 45-48

**RESUMEN:** Se investiga la aplicación de técnicas de tipificación alélica de marcadores moleculares, para el apoyo de planes de recuperación de poblaciones en vías de extinción. Se recogen muestras de 83 cerdos de raza Chato Murciano y se caracterizan 26 microsatélites seleccionados y recomendados para estudios de diversidad genética en cerdos. Las frecuencias alélicas se determinan por recuento directo. Se calculan las heterocigosidades observada, insesgada y esperada para cada marcador y los pares de distancias genéticas entre individuos basadas en la proporción de alelos compartidos. Con los valores de las distancias obtenidos se construye un árbol filogenético. El número de alelos presentes es claramente inferior al hallado en otras razas porcinas. El proceso de conservación de la raza se puede seguir mediante la construcción de un árbol filogenético individual observando cómo, a pesar de ser necesario crear una línea mediante un cruce por absorción empleando una hembra de raza Large-White, se aprecia una tendencia a la absorción del genotipo de este animal en favor de los genotipos de los Chatos Murcianos a través de las generaciones. Este abordaje facilita también la selección de los cruzamientos más adecuados a partir de los genotipos caracterizados.

Palabras clave: Porcino, Microsatélites, Distancia genética, Recursos genéticos.

## Introducción

El cerdo Chato Murciano tiene su origen en los antiguos cerdos ibéricos del área mediterránea. Durante el primer cuarto del siglo XX fue cruzado con ejemplares de las razas Berkshire, Tamworth y otras razas europeas para mejorar sus caracteres productivos (Martínez *et al.*, 1998). En la última década de este mismo siglo, cuando estaba prácticamente extinto, aparece un gran interés a nivel institucional para la conservación de este cerdo tan característico del este de la península ibérica. Se trata de una raza que se desarrolla en régimen semiextensivo y su ex-

pansión se realiza a partir de tan sólo 14 ejemplares. Después de cinco años de trabajo en la recuperación de esta raza se plantea un estudio genético para evaluar los resultados obtenidos y elaborar futuros proyectos.

El objetivo de este trabajo es obtener una información genética objetiva de la población de Chatos Murcianos que permita contribuir al plan de recuperación de esta raza. Para ello se caracteriza la población con una batería de microsatélites, se obtendrán parámetros estadísticos descriptivos de la situación de variabilidad genética y construirá un árbol de distancias individuales.

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular. Apartado Oficial Sucursal 2. 14071-Córdoba, España. Correo E. labgs@ext.mde.es

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agroalimentarias, Consejería de Agricultura. Comunidad Autónoma de la región de Murcia. España.

<sup>3</sup>Unidad de Veterinaria del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, España. Correo E ib2mamaa@uco.es

## Materiales y Métodos

Se analiza una muestra de 83 ejemplares de cerdo Chato Murciano, 24 puros y el resto pertenecientes a las generaciones F2 (1), F3 (15), F4 (17), F5 (12) obtenidas después de un cruzamiento inicial con una hembra de la raza Large-White y sementales de la población original. Además se analizan siete ejemplares de Chato Murciano de los que no se conoce su genealogía y otros siete ejemplares resultantes de cruces de Chato Murciano con otras razas. Estos últimos sirven de referencia en el árbol individual de distancias.

Los microsatélites seleccionados son los recomendados para los estudios de variabilidad por el grupo de expertos en temas porcinos de la FAO: CGA, S0101, S0215, S0355, SW911, SW936, S0068, SW632, SW24, S0225, SW122, S0090, S0226, S0227, SW951, S0228, S0178, S0005, S0386, SW72, S0002, SW857, S0026, IGF1, S0155, SW240.

Se extrae DNA de muestras de pelo, se amplifican mediante PCR las secuencias de interés utilizando cebadores marcados con fluorocromos combinando diferentes marcadores (Martínez *et al.*, 1998). La caracterización de las variantes alélicas se realiza mediante electroforesis de los productos de la amplificación en un secuenciador automático ABI 373 Stretch (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) empleando las aplicaciones GENESCAN<sup>®</sup> 3.1.2 y GENOTYPER<sup>®</sup> 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Se calculan las frecuencias alélicas por recuento directo y se determinan la heterocigosidad observada y esperada teniendo en cuenta los modelos de mutación IAM (infinity allele model) o SMM (stepwise mutation model). Para estos cálculos se emplea la aplicación BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996). Mediante la aplicación MICROSAT v.1.5b (Minch, 1998) se calculan las distancias genéticas entre individuos basadas en la proporción de alelos compartidos (Bowcock *et al.*, 1994). Con estas distancias se construye un árbol individual filogenético basado en el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) (Sneath & Sokal, 1973) empleando para ello el módulo NEIGHBOR de la aplicación PHYLIP v.3.57c (Felsenstein, 1995).

## Resultados y Discusión

El estudio genético de poblaciones lleva a plantearse un gran número de preguntas de las que algunas son contestadas mediante la observación directa del grupo en cuestión, y el resto intenta solucionarse mediante la investigación de caracteres más objetivos como los marcadores genéticos. Recientemente los microsatélites se han configurado como los marcadores de elección debido a algunas de sus ventajas frente a los demás como son que se encuentran en gran número, distribuidos de forma homogénea a lo largo del genoma y presentando un gran nivel de polimorfismo (Edwards *et al.*, 1992). Su estudio parece ser muy interesante en aquellas poblaciones que por su situación dramática de peligro de extinción son más urgentes de caracterizar, de forma que la variabilidad genética y su

entidad queden salvadas. Así, está indicado este tipo de estudios de conservación genética y está apoyado enfáticamente por la FAO desde 1993 (FAO, 1998). Los trabajos que en este sentido se han ido realizando, son numerosos y la efectividad y potencialidad informativa de estos marcadores moleculares, está ya comprobada (ej.: Arranz *et al.*, 1996; MacHugh *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2000a).

La raza Chato Murciano se encuentra en un proceso de recuperación a partir de muy pocos individuos, hay una consanguinidad grande y una variabilidad genética pequeña. El número de alelos observado es claramente inferior al encontrado en otras razas porcinas (Martínez *et al.*, 2000a; Laval *et al.*, 2000; Ollivier *et al.*, 2001). Algunos alelos se encuentran sólo en los animales originales mientras que hay otros presentes solamente en los animales de la población F3+F4+F5 (Cuadro 1). Es de destacar que los alelos presentes sólo en una u otra población suelen ser aquellos que están presentes con las frecuencias más bajas. El microsatélite S0215 ha resultado monomórfico en todos los animales analizados, y el S0951 es monomórfico en la población de Chatos Murcianos puros.

La heterocigosidad observada para el total de los animales analizados (Cuadro 2) presenta valores inferiores a los

Cuadro 1. Frecuencias alélicas de los Chatos Murcianos puros y cruzados, ordenadas de mayor a menor

Microsatélite	Alelos	Frecuencias alélicas						
CGA	6	0,68	0,14	0,12	0,04	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	
S0101	3	0,52	0,28	0,20	-	-	-	
S0215	1	1,00	-	-	-	-	-	
S0355	2	0,79	0,21	-	-	-	-	
SW911	5	0,50	0,28	0,17	0,04	0,01 <sup>b</sup>	-	
SW936	6	0,33	0,27	0,17	0,15	0,08	0,01	
S0068	5	0,51	0,27	0,10	0,09	0,03 <sup>a</sup>		
SW632	4	0,70	0,18	0,11	0,01	-	-	
SW24	4	0,91	0,04	0,02	0,04	-	-	
S0227	2	0,89	0,11	-	-	-	-	
S0225	3	0,65	0,23	0,12	-	-	-	
SW122	3	0,64	0,33	0,03 <sup>b</sup>	-	-	-	
S0090	5	0,39	0,31	0,24	0,06 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>		
S0226	3	0,72	0,17	0,11	-	-	-	
SW591	2	0,93	0,07	-	-	-	-	
S0228	2	0,59	0,41	-	-	-	-	
S0178	4	0,49	0,33	0,13 <sup>b</sup>	0,05	-	-	
S0005	5	0,27	0,38	0,34	0,01 <sup>b</sup>	0,01	-	
S0386	4	0,48	0,29	0,15	0,07	-	-	
SW72	5	0,65	0,26	0,09	0,01 <sup>a</sup>	-	-	
S0002	3	0,69	0,15	0,16	-	-	-	
SW857	4	0,65	0,22	0,06 <sup>a</sup>	0,07	-	-	
S0026	4	0,61	0,20	0,15	0,04 <sup>b</sup>	-	-	
IGF1	4	0,51	0,33	0,14	0,01 <sup>b</sup>	-	-	
S0155	4	0,62	0,32	0,06	0,01 <sup>b</sup>	-	-	
SW240	2	0,57	0,43	-	-	-	-	

a = alelos exclusivos de la población de Chatos puros, y b = alelos exclusivos de la población F3+F4+F5 de Chatos cruzados.

Cuadro 2. Número promedio de alelos (N), heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad media por recuento directo (Ho) para todos los microsatélites

Población	n	He (IAM)	He (SMM)	Ho
Chato Murciano	3,92	0,43	0,53	0,52
F3+F4+F5	3,24	0,40	0,47	0,51
Chatos puros	3,09	0,44	0,50	0,49

encontrados en otras razas porcinas (Li *et al.*, 2000), aunque son similares a los encontrados en otras razas minoritarias (Martínez *et al.*, 2000a; Laval *et al.*, 2000; Ollivier *et al.*, 2001). La heterocigosidad observada en los tres casos es claramente superior a la esperada si se considera que el modelo seguido por estos microsatélites es el IAM, sin embargo cuando se tiene en cuenta el SMM, la heterocigosidad observada sólo es claramente superior a la esperada en el caso de la población F3+F4+F5 (Cuadro 2). El modelo que más se ajusta a los resultados esperados es el IAM, teniendo en cuenta las características de la población, como ya afirmaban Shriver *et al.* (1995) que los microsatélites en los que la unidad repetitiva es de 3 a 5 pares de bases se ajustan mejor al SMM y los microsatélites mono o dinucleotídicos, como en este caso, se ajustan mejor al IAM.

Se realiza un estudio de distancia genética individual

para evaluar la tendencia de los animales a agruparse juntos por poblaciones basado en la proporción de alelos compartidos (Bowcock *et al.*, 1994). Los microsatélites, tienen un grado relativamente alto de heterocigosidad y muchos alelos para cada *locus*, por lo que cada individuo puede ser definido de una forma casi inequívoca. Esto implica que pueden obtenerse resultados significativos de alelos compartidos entre individuos miembros de las poblaciones estudiadas y que pueden construirse árboles filogenéticos usando los individuos como unidades taxonómicas.

El árbol de distancia genética (Figura 1) ha generado tres grupos principales de individuos que comparten características similares, a pesar de que el conjunto de los animales están muy emparentados. Una de las conclusiones que se podría deducir a partir de este análisis es que las F3, F4 y F5 son muy parecidas entre si y a la vez a los animales puros por lo que el efecto del cruzamiento con el ejemplar de Large-White parece que está siendo absorbido.

El análisis genético realizado con la batería de microsatélites da como resultado que esta raza presenta un grado de variabilidad genética bajo aunque la heterocigosidad es aceptable, lo que indica que los esfuerzos realizados para su recuperación están teniendo su fruto. El establecimiento de una línea dentro de la raza mediante un cruzamiento con otra raza y una posterior absorción en sucesivas generaciones no está desviando el perfil genético de la población original por lo que se pueden es-

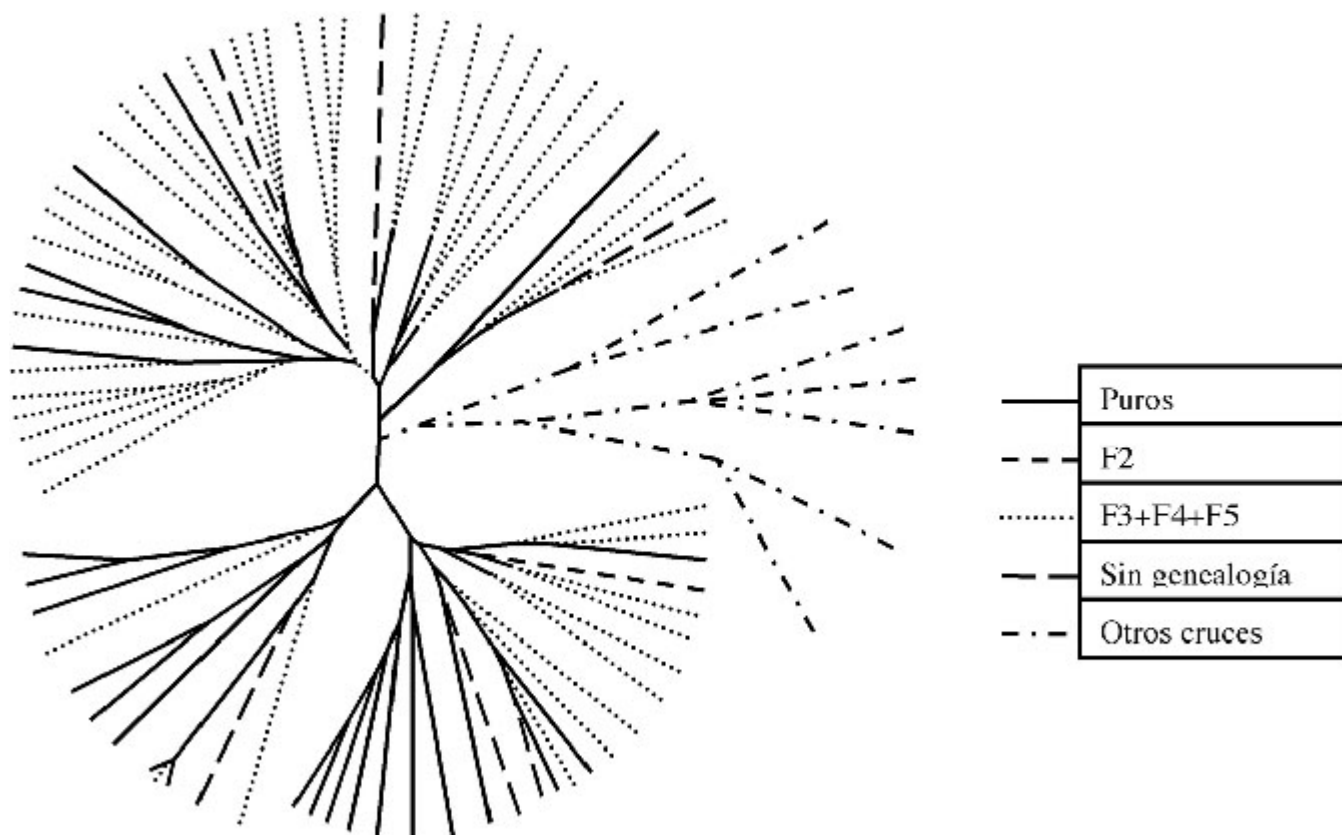


Figura 1. Árbol de distancia genética individual de cerdos Chatos Murcianos construido a partir de la matriz de pares de distancias basadas en los promedios de alelos compartidos (Bowcock *et al.* 1994) mediante el método UPGMA.

perar los beneficios que este tipo de estrategia de conservación puedan aportar en un futuro. Finalmente, el estudio de marcadores genéticos como los microsatélites aporta una información muy valiosa y útil en el diseño y seguimiento de un proceso de recuperación de una raza en peligro de extinción.

## Literatura Citada

- Arranz, J. J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics* 27:415 - 419.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J.R. Kidd and L.L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-457.
- Cornuet, J. M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-20014
- Edwards, A., H.A. Hammond, L. Jin, C.T. Caskey and R. Chakraborty. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-253.
- FAO. (1998). Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of small populations at risk, FAO, Rome. Italy
- Felsenstein, J. (1995). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. University of Washington.
- Laval, G., N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. Nissen, C. Jorgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J.L. Foulley, C. Chevalet and L. Ollivier. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetic Selection Evolution* 32:187-203.
- Li, K., Y. Chen, C. Moran, B. Fan, S. Zhao and Z. Peng. 2000. Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. *Animal Genetics* 31:322-325.
- MacHugh, D. E., R.T. Loftus, P. Cunningham and D.G. Bradley. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29:333-340.
- Martínez, A. M., M. de la Haba, Z.A. Rodero and J.L. Vega-Pla. 1998. Characterization of Iberian pig with 25 microsatellites based on multiplex PCR. *Animal Genetics* 29 (Suppl. 1):10 (Abstr.)
- Martínez, A. M., J.V. Delgado, A. Rodero and J.L. Vega-Pla. 2000a. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics* 31:295-301.
- Martínez, A. M., B. Peinado, C. Barba, J.V. Delgado and J.L. Vega-Pla. 2000b. Genetic analysis of the Chato Murciano pig and its relationships with the Iberian pig using microsatellites. Book of abstracts of 27th International Conference on Animal Genetics.
- Martínez, M., B. Peinado, J. Martín, J.B. Lobera, C. Barba y A. Poto. 1998. El Chato Murciano, la raza autóctona de la Región. Situación actual desde el punto de vista genético. *ADEA* 8:24-26.
- Minch, E. 1998. MICROSAT Version 1.5b (Macintosh). University of Stanford.
- Olivier, L., J.C. Caritez, J.L. Foulley, C. Legault, M. San Cristobal-Gaudy, F. Labroue, Y. Amigues, H. Brandt, R. Clemens, P. Glodek, P. Ludewig, C. Kaltwasser, J.N. Meyer, R. Davoli, G. Gandini, A.M. Martinez, J.L. Vega-Pla and J.V. Delgado. 2001. Evaluation of genetic diversity from immunological, biotechnical and DNA polymorphisms. Chapter 3.1. In *Pig genetic resources in Europe. Characterisation and conservation* (L. Olivier, P. Glodek, G. Gandini and J.V. Delgado, ed.), Vol. 104. EAAP, Wageningen. p 87-97.
- Shriver, M. D., L. Jin, E. Boerwinkle, R. Deka, R.E. Ferrell and R. Chakraborty. 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Ecology*. 12:914-920.
- Sneath, P. H. A. and H.H. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco.