

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA PORCINA CHATO MURCIANO

## GENETIC DIVERSITY OF CHATO MURCIANO PIG BREED

Calvo, J.H.<sup>1</sup>, J. Lobera<sup>2</sup>, R. Osta<sup>1</sup> y P. Zaragoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética bioquímica y Grupos sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. España.

<sup>2</sup>Centro de Capacitación y Experimentación Agraria. Carretera de Águilas s/n. Lorca. Murcia. España.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Biodiversidad. Microsatélites. Razas autóctonas.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Biodiversity. Microsatellites. Autochthonous populations.

### RESUMEN

Se analizó la variabilidad genética en 8 polimorfismos de ADN en una raza autóctona porcina: el Chato Murciano. Esta raza está considerada por la FAO en riesgo crítico de desaparición.

Los marcadores utilizados fueron escogidos del panel de la ISAG-FAO para los estudios de biodiversidad.

Se realizó un estudio de las frecuencias, equilibrio de Hardy-Weiberg, número de alelos medio por *locus*, porcentaje de *loci* polimórficos 95, porcentaje de *loci* polimórficos 99 y heterocigosidad.

### SUMMARY

Genetic variability was analysed in 8 DNA polymorphism in the Chato Murciano pig breed. This breed is considered in high risk by FAO.

The selected markers were recommended by FAO for diversity studies.

A comparison of gene frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium for each *loci*, mean number alleles per *locus*, percentage of *loci* polymorphic

(0.95 criterion and 0.99 criterion) and heterozygosity were performed.

### INTRODUCCIÓN

La estructura genética de las poblaciones y los estudios de divergencia entre las mismas, tiene un enorme interés en cuanto a la conservación de las especies ganaderas. Además de su aplicación en la conservación de la variabilidad de las razas, la caracterización de las poblaciones puede tener aplicaciones dentro del campo de la producción animal, mediante los cruzamientos de poblaciones alejadas genéticamente se han realizado en muchas especies para conseguir un mayor vigor híbrido, además en la actualidad estos cruzamientos están siendo considerados en diversos proyectos de búsqueda de QTLs.

En la especie porcina para los estu-

dios de biodiversidad se está utilizando el panel de microsatélites recomendado por la ISAG-FAO. Este panel está compuesto por 25 marcadores microsatélites situados uno en cada cromosoma (excepto en el 18), y se encuentran a una distancia entre ellos no inferior a 35 cM. Estas características esperan el estudio más exacto de la variabilidad en la raza analizada.

La raza objeto de nuestro estudio es el Chato Murciano. El Chato Murciano es una raza obtenida por cruzamientos entre Ibérico, Berkshire, Large White y Chato Vitoriano. En la actualidad hay alrededor de 40 animales y según la valoración de la FAO se encuentra en riesgo crítico de desaparición.

El objetivo de este estudio se centra en el estudio de la variabilidad genética, en esta población porcina, de 8 marcadores genéticos, presentando los primeros resultados de los estudios realizados a nivel poblacional de la raza Chato Murciano. Estos resultados podrían ser utilizados para dirigir la reproducción, y recuperar la raza en el mayor grado de pureza posible.

Posteriormente se terminará con la caracterización de los 17 microsatélites restantes, para completar microsatélites aconsejados por la ISAG-FAO con objeto de establecer relaciones filogenéticas con otras razas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio fue testada la totalidad de la población Chato Murciano, que está representada por 43 animales. Es decir, animales que presentan las siguientes características fenotípicas exter-

nas correspondientes al Chato Murciano: animal subhipermétrico, cóncavo y longilíneo, con orejas de tamaño medio y erectas y hocico arremangado. La capa es totalmente negra o bien negra con pequeñas marcas blancas. Tras el estudio de las genealogías de estos 43 animales, 27 pueden considerarse como Chatos Murcianos puros y el resto de los animales podrían corresponder a una F2 o F3.

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre y semen, según los métodos de Lahiri *et al.* (1991) y Thomsem y Nielsen (1991). La calidad del ADN se comprobó mediante la amplificación mediante PCR de un fragmento del gen *ryr-1*.

Los marcadores estudiados y caracterizados fueron: SW240, S0155, IGF1, SW857, S0002, SW122, S0225 y S0227. Para su caracterización se utilizó la técnica PCR con marcaje radioactivo. Se utilizaron 30ng de ADN en un volumen final de mezcla de reacción de 10 ml. La mezcla de reacción contiene 2 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada cebador, 10 mM Tris HCl (pH 9), 50 mM KCl, 0,1 p.100 de tritón X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de taq dna polimerasa y a (32P)-dCTP 1mCi\*. El PCR radiactivo se realizó en tres múltiples: el primero se realizó con una temperatura de hibridación de 55°C y contenía los microsatélites SW240, S0155, IGF1; el segundo con una temperatura de hibridación de 58°C con los microsatélites, SW857, S0002; y el tercero con una temperatura de hibridación de 55°C se realizó para los microsatélites SW122, S0225 y S0227.

La visualización de los polimorfismos se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 p.100 y posterior

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA PORCINA CHATO MURCIANO

revelado de autoradiografías.

Para el estudio poblacional se utilizó el programa Biosys, determinado los siguientes parámetros genéticos: frecuencias génicas en la población total y en la población de Chato puro, valores de  $X^2$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg, número medio de alelos por locus, porcentaje de *loci* polimórficos (95 y 99 p.100) y heterocigosidad.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comprobar la calidad del ADN

se realizó la amplificación de un fragmento del gen *ryr-1* y posterior digestión con la enzima de restricción BsiHK I. Se encontró que todos los animales eran sanos y no portadores del Síndrome de estrés porcino, resultado esperable al ser el Chato Murciano una raza autóctona, no cruzado con líneas altamente portadoras como Pietrain (Calvo *et al.*, 1997).

En los 43 animales estudiados, los 8 marcadores resultaron polimórficos, encontrándose para cada locus el siguiente número de alelos: SW240 (5), S0155 (5), IGF1 (4), SW857 (4), S0002 (3), SW122 (4), S0225 (4) y S0227 (2).

**Tabla I.** Frecuencias génicas. (Gene frequencies).

<i>Locus</i>	Población total	Población Chato puro	<i>Locus</i>	Población total	Población Chato puro
Sw240			S0002		
92	0,012	0,000	197	0,176	0,095
96	0,453	0,438	205	0,088	0,000
104	0,035	0,063	207	0,735	0,905
108	0,488	0,500			
110	0,012	0,000			
S0155			Sw122		
150	0,167	0,130	112	0,631	0,729
154	0,024	0,000	116	0,310	0,271
160	0,071	0,065	118	0,048	0,000
162	0,726	0,804	122	0,012	0,000
164	0,012	0,000			
IGF1			S0225		
201	0,806	0,875	170	0,073	0,042
203	0,125	0,025	182	0,049	0,000
205	0,014	0,000	186	0,049	0,063
207	0,056	0,100	188	0,829	0,896
Sw857			S0227		
144	0,115	0,174	229	0,976	1,000
150	0,090	0,022	253	0,024	0,000
152	0,603	0,717			
154	0,192	0,087			

**Tabla II.** Valores de  $X^2$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg. ( $X^2$  values for the Hardy-Weinberg equilibrium).

Locus	Población	
	total	Chato puro
Sw240	88,461***	1,668
S0155	3,307	1,189
IGF1	6,150	0,319
Sw857	5,706	1,503
S0002	42,024***	0,171
Sw122	1,232	0,476
S0225	2,660	0,225
S0227	0,013	

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Si únicamente consideramos los animales Chato Murciano puros un marcador resultó monomórfico y los resultados fueron los siguientes: SW240 (3), S0155 (3), IGF1 (3), SW857 (4), S0002 (2), SW122 (2), S0225 (3) y S0227 (1). En la **tabla I** aparecen las

frecuencias génicas correspondientes a los 2 grupos de animales considerados.

En la población de Chato puro encontramos que el número de alelos se reduce. También se observan bajas frecuencias de algunos alelos en la población total. Esta baja frecuencia en la población total puede explicarse por la aparición de cruces de Chatos con otras razas que pueden estar más alejadas filogenéticamente, y que introducen alelos nuevos (existen alelos sólo presentes en un animal). En otras razas se puede observar que el número de alelos es mayor para un mismo marcador que en la población de Chato Murciano estudiada. Por ejemplo, Wintero *et al.* (1994) describieron, para el microsatélite IGF, 6 alelos en la raza Yorkshire, 5 alelos en la raza Landrace y 4 alelos en las razas Hampshire y Duroc, mientras que en la población de Chato Murciano total encontramos 4 alelos y 3 en la población de Chato Murciano puro. Igualmente, Robic *et*

**Tabla III.** Valores de heterocigosidad. (Heterozygosity values).

Locus	Población total		Población de Chato puro	
	Observada	Esperada	Observada	Esperada
Sw240	0,674	0,554	0,667	0,555
S0155	0,524	0,439	0,391	0,332
IGF1	0,278	0,332	0,250	0,224
Sw857	0,718	0,579	0,522	0,447
S0002	0,353	0,420	0,190	0,172
Sw122	0,476	0,504	0,458	0,395
S0225	0,317	0,302	0,208	0,192
S0227	0,049	0,048	0,000	0,000
Heterocigosidad media por locus	0,424±0,078	0,397±0,061	0,336±0,076	0,290±0,063

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA PORCINA CHATO MURCIANO

*al.* (1994), describen 5 alelos para los microsatélites S0225 y S0227 en una población de animales procedentes de Pietrain, Ja Xing, Jabalí Meshian y Large White, en nuestro trabajo encontramos 4 alelos en la población total y 3 en la población de Chato Murciano puro para el microsatélite S0225. En el microsatélite S0227 encontramos 2 alelos en la población total y uno en la población pura.

Los resultados de los tests de equilibrio aparecen en la **tabla II**. Hay que destacar que cuando consideramos únicamente la población de Chato Murciano puro aparecen todos los marcadores en equilibrio. Sin embargo, cuando consideramos la población total de Chato, encontramos dos marcadores que se encuentran en desequilibrio. Estos marcadores son el Sw240, en el que se observa un exceso de heterocigotos observados en relación con los esperados en el genotipo 96/108, y el marcador S0002 igualmente con exceso de heterocigotos en el genotipo 197/207. Este exceso de heterocigotos desaparece cuando consideramos la población de Chato Murciano puro. Esta circunstancia, de nuevo puede deberse a la introducción de alelos poco frecuentes procedentes de otras razas.

En la **tabla III** se incluyen los valores de la heterocigosidad obtenida para cada uno de los marcadores, así como la heterocigosidad media por locus. Se puede ver que se encuentran heterocigosidades bajas (desde 0,04 a 0,58) para algunos marcadores si los comparamos con las heterocigosidades encontradas para estos marcadores en otras razas. Por ejemplo, Fredholm *et al.* (1993), describieron heterocigo-

**Tabla IV.** Número de alelos medio por locus, porcentaje de loci polimórficos (0,95) y porcentaje de loci polimórficos (0,99). (Mean number alleles per locus, percentage of loci polymorphic (0,95 criterion and 0,99 criterion).

Población	número de alelos por locus <sup>1</sup>	loci polimórficos <sup>2</sup>	
		0,95	0,99
total	3,88±0,35	87,50	100
Chato puro	20,13±0,35	620,50	75

<sup>1</sup>media±error estándar

<sup>2</sup>p.100

sidades de 0,81 en la raza Duroc, 0,50 en la raza Landrace, 0,82 en la raza Hampshire y 0,73 en la raza Yorkshire. Estas heterocigosidades son superiores a las encontradas en la población de Chato Murciano (0,29 a 0,39). A su vez, encontramos heterocigosidades medias en los microsatélites Sw240, S0155 y Sw122. Hay que destacar, la baja heterocigosidad en el microsatélite S0227 en el que sólo se encuentran dos alelos, considerando la población total y está fijado para el alelo 229 en la población de Chato puro. Si comparamos las heterocigosidades de las dos poblaciones estudiadas se observa que en el Chato puro, a excepción del microsatélite Sw240, son menores las heterocigosidades, los que nos vuelve a indicar la pérdida de variabilidad en la población de Chato en pureza. La heterocigosidad media es bastante inferior en la población de Chatos Murcianos puros que en la población de Chatos totales.

En la **tabla IV** se puede observar igualmente un descenso de las medi-

das de la variabilidad en la población de Chato puro en relación a la población total.

Si bien los resultados obtenidos hasta ahora deben considerarse como preliminares, está claro que la población estudiada de Chato Murciano presenta

una baja variabilidad, lo que de nuevo indica el grave peligro de extinción existente. Sería adecuado el proponer cruzamientos entre los individuos más alejados genéticamente para en la medida de lo posible intentar controlar la baja variabilidad existente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Calvo, J.H., R. Osta, E. García-Muro y P. Zaragoza. 1997. Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Med. Vet.*, 14: 110-113.
- 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. *Mamm. Genome*, 4: 187-192.
- Lahiri DK, S. Bye, J.I. Jr Nurnberger, M.E. Hodes and M. Crisp. 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods.*, 25:193-205.
- Robic, A., M. Dalens, N. Woloszyn, D. Milan, J. Riquet and J. Gellin. 1994. Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mamm. Genome*, 5: 580-583.
- Thomsem, P.D. and J. Nielsen. 1991. PCR screening for carriers of hereditary Citrullinemia in Danish Holstein Friesian Bulls. *Acta Vet. Scand.*, 32: 279-284.
- Wintero, A.K., M. Fredholm and L. Andersson. 1994. Assignment of the gene for porcine insuline-like growth factor 1 (IGF1) to chromosome 5 by linkage mapping. *Anim. Genet.*, 25: 37-39.