ITEA (2000), Vol. **96A N.° 3**, 220-224

DETECCIÓN DEL ORIGEN FILOGENÉTICO DE DIFERENTES POBLACIONES PORCINAS ESPAÑOLAS POR PIROSECUENCIACIÓN DE UNA REGIÓN DEL CITOCROMO B DEL ADN MITOCONDRIAL PORCINO

A. Clop*, G. Nyman, A. Sánchez*, J. L. Noguera**, L. Andersson*****

* Unitat de genètica i Millora Animal, Departament de Patologia i Producció Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, España

** Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, 25198 Lleida, España

*** Department of Aninal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Biomedical Centre, 751 24 Uppsala, Suecia

RESUMEN

Doscientas treinta y cuatro cerdas de 5 razas distintas (2 rústicas y 3 comerciales) fueron analizadas para una región del citocromo B (*Cyt B*) del ADN mitocondrial (ADNmt). Para secuenciar esta región se utilizó la técnica de la pirosecuenciación. Esta técnica de secuenciación en tiempo real está basada en la detección de la reacción de luminiscencia que se produce al unirse un nucleótido específico a la cadena en extensión. El objetivo de este experimento era determinar el origen europeo o asiático de las 5 poblaciones mencionadas anteriormente. Se detectaron 3 haplotipos distintos, uno de origen europeo y dos de origen asiático. Se describe además, un nuevo haplotipo originado por mutación o por recombinación genética. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores y con documentos históricos.

SUMMARY

Two hundred thirty four sows from 5 different breeds (2 rustic and 3 commercial ones) were analyzed for a region located on cytocrome B (Cyt B) by using mitochondrial DNA (mtDNA). We used the pyrosequencing technique for sequencing this region. This method is based on real-time sequencing and the detection of the bioluminiscence produced when each nucleotide is incorporated in the growing DNA chain. The objective of this experiment was to determine the asian or european origin of the five pig breeds mentioned above. Three different haplotypes (one european and two asian) were found. Moreover, we describe a new haplotype created by mutation or genetic recombination. These results agree well with other published papers and with historical documents.

Introducción

Actualmente el estudio de polimorfismos genéticos está avanzando hacia el uso de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Este avance provoca la aparición de nuevas técnicas de análisis de SNPs más rápidas y eficientes como por ejemplo la pirosecuenciación.

En un trabajo reciente de GIUFFRA *et al* (2000) se han descrito 4 SNPs localizados en una región del *Cyt B* del ADNmt porcino. Dichos SNPs se han utilizado como marcadores para determinar el origen europeo o asiático de las líneas maternas de diferentes poblaciones de cerdos (*Sus scrofa*). La razón de utilizar SNPs localizados en el ADNmt se debe a su alta tasa de mutación que le permite ser usado frecuentemente como marcador filogenético para comparar poblaciones poco distanciadas genéticamente.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la determinación del origen filogenético de la línea materna de 5 poblaciones porcinas españolas pertenecientes a 5 razas distintas mediante el uso de la pirosecuenciación.

Material y métodos

Material animal

Se compone de 234 cerdas de 5 poblaciones distintas, 2 rústicas y 3 comerciales, todas ellas españolas.

- 5 cerdos de una línea de raza Ibérica con alta consanguinidad (IB).
- 5 cerdos de raza mallorquina (PN).
- 112 cerdos de raza Landrace de una misma línea genética (LD).
- 43 cerdos de raza Large White de una misma línea genética (LW).
- 69 cerdos de raza Pietrain de una misma línea genética (PT).

Pirosecuenciación (RONAGUI *et al.*, 1998)

Es una técnica de análisis del ADN basada en la secuenciación en tiempo real, sobre producto amplificado, de fragmentos internos de pequeño tamaño. La estrategia utilizada consiste en la detección de bioluminiscencia que se produce por la acción de la Luciferasa al incorporarse los deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) a la cadena en extensión (figura 1). La incorporación de un dNTP libera un grupo pirofosfato (Ppi) (1a). La ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP en presencia de ADP (1b). El ATP junto con la luciferasa cataliza la conversión de luciferina a oxiluciferina y la emisión de luz. La detección de la luz emitida permite establecer el número y orden de los nucleótidos incorporados en la reacción de secuenciación.

Los nucleótidos se dispensan por separado y en el orden deseado, sabiendo, por tanto, cual se incorpora en cada momento y posibilitando el establecimiento de correlaciones entre el pico de luz con el nucleótido que se añade en cada momento.

El instrumento de secuenciación usa tecnología INK-JET para proporcionar con exactitud los volúmenes requeridos de los distintos reactivos y además dispone de una cámara CCD para detectar la luminiscencia.

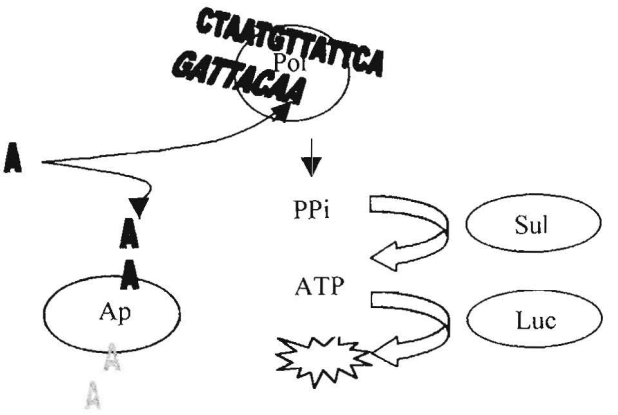


Figura 1. DNA polimerasa (Pol): *interviene en la extensión de la cadena en formación.* Sulfurilasa (Sul): *convierte el PPi en ATP.* Luciferasa (Luc): *reacciona con el ATP y produce luminiscencia.* Apiras (Ap): *Elimina el PPi, el ATP y los nucleótidos no incorporados*

Mediante la reacción de PCR, se amplificó una región de 131 pares de bases del citocromo B del ADN mitocondrial. La reacción de pirosecuenciación se realizó sobre una región de 12 pares de bases del producto amplificado que presentaba 4 SNPs.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenían 2 ng de DNA genómico, 3.0 mM de MgCl2, 50 mM KCl, 15 mM Tris-HCl a pH 8, 200 µM dNTPs, 0.5 unidades de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer), 10 pmol del cebador forward (5´-GCCTACGCTATTC-TACGTTCA-3´) y 10 pmol del cebador reverse (5´-GTGGTCG AAATATTATGC - 3´). Para activar la AmpliTaq Gold se realizó una etapa inicial de activación a 95 °C durante 9 minutos, seguido de 45 ciclos con un perfil térmico de a 94 °C-45", 50 °C-45" y 72 °C-45".

Posteriormente se realizaron las reacciones de secuenciación en un volumen final de 40 µl que contenía 20 mM Tris-Acetato, 5 mM de MgCl2, 15 pmol del cebador de pirosecuenciación (5´-ATTAGGATGGAGGCT-3´) y producto amplificado purificado mediante Dynabeads. El producto resultado de la secuenciación era el descrito en la figura 2.

Producto secuenciado:

POSICIÓN: 15045 15041 15038 15036

4 SNPs: A W T A G X G C Y A Z C

C/T G/A C/T G/A

Figura 2.

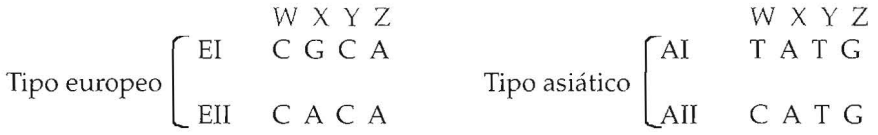


Figura 3.

La combinación de estos 4 SNPs permite caracterizar 4 haplotipos que pueden ser utilizados como marcadores filogenéticos del origen de la línea materna de los animales analizados (figura 3).

Resultados

Se presentaron 3 de los 4 haplotipos descritos en la figura 3. Además se encontró un nuevo haplotipo no descrito hasta la fecha y con un patrón mixto entre el europeo y el asiático al cual llamamos AE (ver tabla de resultados).

Discusión

De los 10 animales de razas españolas autóctonas, 9 individuos (5 IB y 4 PN) presentaron un haplotipo típicamente europeo. Estos datos concuerdan con el hecho que son animales que provienen de poblaciones muy cerradas, en las que la introgresión de animales de otras razas ha sido muy escasa. A su vez son poblaciones con una alta consanguinidad, lo que unido al bajo número de animales analizados en las dos poblaciones permite pensar en la posible existencia de sesgo en los resultados obtenidos.

Un animal PN presentó un haplotipo no descrito anteriormente (TGCA), lo que podría

Cuadro 1
Tamaños de los productos de *Overlap*-PCR de las construcciones de interacción de murinas
Table 1
Overlap-PCR sizes of the murine interaction constructs

	EI	EII	AI	AII	AE
IB	5	0	0	0	0
PN	4	0	0	0	1*
LD	94	0	18	0	0
LW	19	0	24	0	0
PT	40	0	2	27	0
TOTAL	162	0	44	27	1

(*) T G C A.

deberse a una mutación puntual en el ADNmt o a un caso de recombinación genética. De hecho, algunos trabajos recientes describen desequilibrio de ligamiento en el ADNmt de animales superiores como el hombre o el chimpancé sólo explicable por la existencia de recombinación genética (AWADALLA *et al.*, 1999).

Las líneas comerciales españolas (LW, LD y PT) presentan individuos AI que indican la presencia de genes de origen asiático (probablemente Meishan) de procedencia materna como se describe en otros trabajos y en documentos históricos (GIUFFRA *et al.*, 2000).

En el caso concreto de los animales LW se detecta una proporción mucho más elevada del tipo AI que en los animales de la población LD o PT, lo que concuerda con los hechos que fueron los británicos los que, durante los siglos XVIII y XIX, importaron un mayor número de hembras Meishan para cruzarlas con sus razas autóctonas. En la muestra de PT española se detecta la presencia elevada de animales AII, que serán secuenciados para entender la diferencia filogenética entre los dos tipos asiáticos AI y AII.

El estudio del ADNmt sólo sirve para determinar el origen de la línea materna de los animales por lo cual, en nuestro caso concreto sólo podemos indicar la introgresión de hembras asiáticas en las poblaciones europeas. No obstante, estudios recientes no descartan la posibilidad de encontrar herencia mitocondrial de origen paterno (STRAUSS, 1999). Para determinar si también se introdujeron machos asiáticos sería necesario estudiar marcadores localizados en el cromosoma Y (JOBLING, 1995).

Bibliografía

AWADALLA P., EYRE-WALKER A., MAYNARD SMITH J., 1999. Linkage desequilibrium and Recombination in Hominid Mitochondrial DNA; Science, vol. 286: 2524-2525.

GIUFFRA E., KIJAS J.M., AMARGER V., CARLBORG Ö., JEON J.T. AND ANDERSSON L., 2000. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. Genetics, 154: 1-7.

JOBLING M.A., TYLER-SMITH C., 1995. Fathers and sons: The Y chromosome and human evolution. Trends in Genetics, Vol. 11 N°. 11: 449-456.

RONAGUI M., UHLÉN M., NYRÉN P., 1998. Real-Time Pyrophosphate Detection for DNA Sequencing; Science vol. 281: 363-364.

WISEMAN J., 1986. A History of the British Pig. Duckworth, London.