ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DESDE LA DIVERGENCIA DE ASCENDIENTES DE CERDOS ASIÁTICOS Y EUROPEOS BASADA EN ADN MITOCONDRIAL

Estefanía Alves, Cristina Óvilo, Carmen Rodríguez y Luis Silió
Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid.

INTRODUCCION

El genoma mitocondrial (mtADN) es haploide, de herencia casi exclusivamente maternal y sin recombinación entre sus genes. La identificación de polimorfismos de mtADN presenta aplicaciones en la caracterización del origen genético de poblaciones animales que no permiten los genes nucleares. Así se han identificado haplotipos de mtADN en cerdos, característicos de los procesos independientes de domesticación en Asia y Europa. La presencia de haplotipos asiáticos en la mayoría de las razas europeas ha confirmado la contribución de cerdos importados de China e Indochina al desarrollo de algunas razas británicas (Giuffra et al., 2000, Kim et al., 2002) así como su difusión posterior a otras razas. Se ha sugerido que es necesario un más amplio muestreo de poblaciones de cerdos y jabalíes para obtener un conocimiento mas preciso de la filogenia del cerdo doméstico (Kijas & Andersson, 2001). En el presente estudio se utilizan secuencias de las regiones D-loop y Citocromo B (Cyt B) para obtener estimas del tiempo de divergencia entre los ascendientes comunes a los actuales cerdos europeos y asiáticos a partir de una amplia colección de datos propios y otros disponibles en la base de datos GenBank.

MATERIAL y METODOS

Razas y líneas. Una parte de las secuencias empleadas en el presente trabajo corresponden a cerdos domésticos de razas Duroc, Large White, Landrace y Berkshire, otras locales (Yucatán y Welsh) y a un amplio número de razas chinas (Meishan, Erhualian, Jinghua y otras) y japonesas (Okinawa, Satsuma) así como a jabalíes asiáticos. Las secuencias D-loop se encuentran disponibles en las accesiones de GenBank con números AF276921-AF276937, D16483 y D17739 (Kim et al., 2002) y AB15085-AB15086, AB15091-AB15093 (Watanobe et al., 1999). En cuanto a las secuencias Cyt B, ya analizadas por Giuffra et al. (2000), corresponden a las accesiones de Genbank AB15067, AB15069-AB15072, AB15074-AB15075, AB15077, AB15079-AB15080, AF136541-AF136548 y AF136550-AF136554. El resto de las secuencias utilizadas se han determinado por nuestro grupo en muestras de 51 cerdos, distribuidas de la siguiente forma: 26 Ibéricos, siete jabalíes capturados en España, 15 cerdos domésticos de las razas de difusión universal Duroc, Large White, Landrace, Pietrain y Meishan y uno de cada una de las razas locales Manchado de Jabugo, Vasco y Mangalitza (Alves et al., 2003).

Secuenciación de mtDNA. Los protocolos de amplificación mediante PCR de la región D-loop y del gen Cyt B han sido anteriormente descritos (Alves et al., 2003). Las correspondientes secuencias se han remitido al GenBank con números AY232842 a AY232892 (D-loop) y AY237484 a AY237534

(Cyt B). La información utilizada en el análisis filogenético incluye el gen Cyt B completo (1,140 pb) y 635 pb de la región D-loop correspondientes a los dominios ETAS (318 pb) y central (317 pb), según la denominación de Sbisà et al. (1997).

Análisis de datos. Para cada una de las regiones secuenciadas (D-loop y Cyt B) se calcularon las matrices de distancias entre haplotipos utilizando el algoritmo de distancia *p*, que proporciona una estima precisa para valores pequeños de la divergencia de secuencias. Un arbol filogenético NJ fue construido sobre la base de cada una de estas matrices de distancias, calculándose la confianza de cada nudo mediante 1000 réplicas bootstrap. Las estimas de la divergencia de secuencias entre haplotipos asiáticos y europeos (*K*) se calcularon mediante el algoritmo de distancia *p* para el dominio ETAS de la región D-loop (Sbisà et al., 1997) y para las sustituciones de nucleótidos sinónimas y no sinónimas en el gen Cyt B (Pesole et al., 1999). Los valores del tiempo de divergencia (*T*) se obtuvieron a partir de la ecuación $T = K/2r$ (Li, 1997), donde *r* es la tasa de sustitución de nucleótidos, que ha sido determinada para diferentes regiones funcionales de los genomas mitocondriales de mamíferos por Pesole et al. (1999).

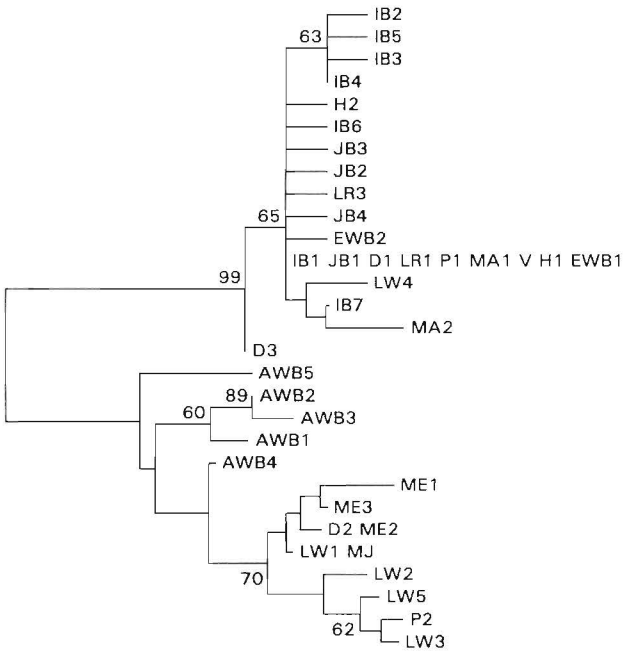


Figura 1. Arbol filogenético construido mediante el algoritmo NJ a partir de 29 secuencias distintas de Citocromo B (16 haplotipos Europeos y 13 Asiáticos) determinadas en cerdos domésticos y jabalíes. Los valores de bootstrap superiores al 60% se indican en los nudos. Clave de abreviaturas: AWB = Jabalí Asiático; D = Duroc; EWB = Jabalí Europeo; H = Hampshire; IB = Ibérico; LR = Landrace; LW = Large White; MA = Mangalitza; ME = Meishan; MJ = Manchado de Jabugo; P = Pietrain; V = Cerdo Vasco

RESULTADOS y DISCUSION

Los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias analizadas de las regiones D-loop y Cyt B presentan dos grupos estadísticamente diferenciados (valor bootstrap del 99% en ambos casos). En la Figura 1 se representa la topología obtenida en el árbol basado en 29 diferentes haplotipos Cyt B. El grupo Europeo incluye 16 haplotipos, con todos los

cerdos Ibéricos, los jabalíes españoles y europeos y varias de las secuencias identificadas en razas de difusión universal (Duroc, Hampshire, Landrace, Large White y Pietrain) y local (Mangalitza y Cerdo Vasco). El grupo Asiático incluye 13 haplotipos identificados en cerdos Meishan, jabalíes asiáticos e individuos de razas Large White, Pietrain y Duroc, así como de la raza local Manchado de Jabugo. El dendrograma basado en los 39 haplotipos identificados a partir de las secuencias D-loop (no presentado) es muy similar. Además de las ya citadas, el grupo europeo (19 haplotipos) incluye a las razas locales Yucatán y Welsh y el asiático (20 haplotipos) a la raza Berkshire y a la totalidad de razas chinas y japonesas, así como a los jabalíes asiáticos.

Debido a que la tasa de mutación (*r*) depende de la región mitocondrial considerada (Pesole et al., 1999), la divergencia de secuencias entre haplotipos asiáticos y europeos (*K*) se estimó para el dominio ETAS de la región D-loop y para las sustituciones de nucleótidos sinónimas y no sinónimas en el gen Cyt B. Se descartó la estima basada en el dominio central de la región D-loop, por estar sujeta a un gran error muestral (Sbisà et al., 1997). Los valores estimados de la distancia neta entre grupos, expresados como porcentajes, se presentan en la siguiente tabla.

Región mtADN	*r* (%)	*K* ± SE (%)	*T* (10^3 años)
Citocromo B			
Posiciones sinónimas	27,4 ± 3,3	3,08 ± 0,90	563
Posiciones no sinónimas	1,8 ± 0,3	0,15 ± 0,12	403
D-loop			
Dominio ETAS	19,4 ± 7,8	2,48 ± 0,80	638

Nuestros resultados indican un tiempo de divergencia hasta el presente de alrededor de 550.000 años. Kijas & Andersson (2001) estimaron este período en 900.000 años, a partir de la secuencia completa del mtADN de un único individuo de cada grupo. Sin embargo, las distancias genéticas netas calculadas en el presente análisis tienen en cuenta la diversidad intragrupo lo que explicaría el menor tiempo de divergencia estimado.

REFERENCIAS

Alves et al., 2003. Enviado a *Animal Genetics*.

Giuffra et al., 2000. *Genetics* 154: 1785-1791.

Kijas J.M.H. & Andersson L., 2001. *Journal of Molecular Evolution* 52: 302-308.

Kim et al., 2002. *Animal Genetics* 33: 19-25.

Pesole et al., 1999. *Journal of Molecular Evolution* 48: 427-434.

Sbisà et al., 1997. *Gene* 205: 125-140.

Watanobe et al., 1999. *Molecular Ecology* 8: 1509-1512.