ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo II, 498-500

TRAZABILIDAD DEL ORIGEN GENÉTICO DE CERDOS IBÉRICOS Y CRUZADOS CON DUROC

A. Fernández, E. Alves, C. Óvilo, C. Rodríguez y L. Silió
Dpto. Mejora Genética Animal. SGIT-INIA. Madrid. España

INTRODUCCIÓN

La identificación del origen genético de la materia prima es un elemento de creciente importancia en el necesario control de calidad de productos alimentarios. Este problema es especialmente importante en productos de alta cotización como los elaborados a partir de cerdo ibérico. En la reciente normativa de calidad se contempla el origen racial, discriminando entre genotipos puros y cruzados (principalmente con la raza Duroc) con el fin de posibilitar la defensa del acervo genético de la raza frente a los riesgos de introgresión de genes de razas foráneas, además del interés en la claridad del etiquetado por parte de consumidores, productores y distribuidores.

En la actualidad los controles utilizados para la identificación de animales, canales y piezas se basan exclusivamente en sistemas de soporte físico, sin embargo la experiencia previa de autentificación de otros productos de alta calidad hace aconsejable disponer además de técnicas analíticas de autentificación que permita su uso para la verificación de la fiabilidad del sistema de trazabilidad adoptado y en situaciones litigiosas. Actualmente están siendo utilizadas técnicas basadas en el la reacción en cadena de la polimerasa (microsatélites, RAPDs, AFLPs) para la identificación de especies y razas porcinas (Óvilo et al., 2000; Alves et al., 2002).

En los últimos años se ha desarrollado el conocimiento del genoma porcino de modo que el problema del origen racial puede abordarse con nuevos enfoques metodológicos basados en el análisis de la secuencia de algunos genes. En este sentido los genes que determinan el color de la capa se han considerado idóneos para abordar el problema de la diferenciación entre Ibérico y Duroc ya que el carácter color de la capa ha sido usado tradicionalmente para la definición de razas y poblaciones porcinas. El gen *MC1R* ha sido estudiado previamente (Kijas et al., 1998, 2001; Giuffra et al., 2000) en la especie porcina detectándose la presencia de seis alelos asociados con patrones de color característicos de las razas analizadas. El gen *Pink* codifica para otra proteína implicada en el proceso de regulación de biosíntesis de pigmentos en humano (Kerr et al., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue identificar polimorfismos candidatos a marcadores raciales en los genes *MC1R* y *Pink* y realizar un estudio de la diversidad alélica de los mismos en poblaciones de cerdo ibérico y Duroc con el fin de establecer un panel de marcadores que permitiesen la exclusión del origen ibérico a partir de muestras procedentes de animales vivos, carnes o productos elaborados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó analizando la secuencia de los dos genes a través de secuenciación directa de los fragmentos de ambos genes amplificados por PCR (Fernández, tesis doctoral) en animales pertenecientes a las razas Ibérica (seis animales) y Duroc (dos animales) y alineando la secuencias obtenidas con el fin de detectar las posibles posiciones polimórficas.

Los posiciones polimórficas detectadas y que aparecían en una de las dos razas y estaban ausentes en la otra fueron genotipadas en un mayor número de muestras (219 animales ibéricos y 104 animales pertenecientes a la raza Duroc) y 14 animales pertenecientes a la población Manchado de Jabugo empleando la metodología de PCR-RFLP (Fernández, tesis doctoral).

Los mismos protocolos de genotipado fueron aplicados a muestras pertenecientes a animales cruzados Ibérico x Duroc al 50% y a muestras procedentes de productos elaborados, jamón curado, extraidas empleando el kit de purificación de ADN "PUREGENE: DNA Isolation Cell and Tissue" (GENTRA), confirmando la validez del protocolo para la determinación de la presencia de los alelos Duroc.

La utilidad de un marcador genético para la discriminación del origen racial puede medirse por la probabilidad de exclusión del origen ibérico, que es proporcional a la frecuencia alélica del marcador en la población intrusa (Duroc), de manera que la probabilidad de exclusión se puede representar como $P_E(IB)= 2kg_i$, siendo k la proporción de genes Duroc en los animales cruzados (½ o ¼) y g_i la frecuencia de alélica del marcador en la población intrusa. La probabilidad de aceptar por error una muestra como procedente de un animal ibérico puro es $1-P_{E(1)}$. Con un número total de N marcadores la probabilidad de error conjunta es $\prod_{i=1}^{N}(1-P_{E(i)})$, y la probabilidad conjunta de exclusión del origen ibérico es: $P_{EC}=1-\prod_{i=1}^{N}(1-P_{E(i)})$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes analizados permitieron detectar dos polimorfismos candidatos a marcadores raciales en Duroc frente a Ibérico, estos fueron dos SNPs localizados en las posiciones 1556 del gen *MC1R* (transversión G/A, mutación que constituye el haplotipo *MC1R**4) y 2462 del ADN copia del gen *Pink* (transversión G/A).

Los resultados del genotipado a gran escala a través de PCR-RFLP (*BstU* I y *Aci* I, respectivamente) de ambos polimorfismos aparecen representados en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Frecuencias alélicas para el gen *MC1R*

	Poblaciones de la raza Ibérica			Manchado	
Alelos	Negros (31)	Colorados (109)	Entrepelados (79)	de Jabugo (14)	Duroc (104)
MC1R*1	--	--	--	--	--
MC1R*3	1.000	0.037	0.070	0.036	--
MC1R*4	--	--	--	**0.071**	**1.000**
MC1R*6	--	0.626	0.560	0.857	--
MC1R*7	--	0.307	0.390	0.036	--

Tabla 2: Frecuencias alélicas para el gen *Pink*

	Poblaciones de la raza Ibérica			Manchado	
Alelos	Negros (31)	Colorados (109)	Entrepelados (79)	de Jabugo (5)	Duroc (104)
G	1.000	1.000	1.000	0.700	0.245
A	--	--	--	**0.300**	**0.755**

Como se muestra en las tablas anteriores, ambos polimorfismos quedan establecidos como marcadores raciales para la raza Duroc ya que aparecen, o bien fijados, como es el caso del alelo *MC1R**4, o bien a elevada frecuencia, como es el caso del alelo A del gen *Pink*, en la población Duroc, mientras que ambos están ausentes en las diversas poblaciones de animales ibéricos.

Otro hecho a destacar es que tanto para el gen *MC1R* como para el *Pink* se detecta la presencia en la población Manchado de Jabugo de alelos pertenecientes a la población Duroc, lo que indica que en la recuperación de la misma debió de participar algún animal con ascendencia Duroc.

La probabilidad de exclusión empleando únicamente el marcador del gen *MC1R* en animales cruzados un 50% es del 100%. Por otro lado, en la tabla 3 se indican las probabilidades de exclusión conjunta del origen ibérico para animales cruzados un 25% Ibérico x Duroc. Además, en esta tabla se incluyen las probabilidades de exclusión incorporando marcadores moleculares de tipo AFLP (Alves et al., 2002).

Tabla 3: Cálculo de la probabilidad de exclusión conjunta del origen ibérico puro utilizando diversos marcadores diagnóstico, para un número de muestras de 1, 2, 3, 4 y 5 de animales vivos o productos con un 25% de genes Duroc

Número de muestras analizadas	25% genes Duroc				
Marcadores	1	2	3	4	5
MC1R + *Pink*	0.693	0.906	0.971	0.991	0.998
MC1R + *Pink* + 9AFLP	0.933	0.996	0.999	1.000	1.000

Como se muestra en la tabla anterior, para excluir una única muestra portadora de un 25% de genes Duroc con una probabilidad aceptable (0.933) es preciso emplear los tres tipos de marcadores, los polimorfismos de ambos genes (*MC1R* y *Pink*) junto con los nueve marcadores tipo AFLPs.

Sin embargo, el problema real que se suele plantear es una situación en la que se debe confirmar en una partida de animales o productos la pureza ibérica de los mismos. En este caso bastaría simplemente con utilizar, para animales o muestras portadoras de un 25% de genes Duroc, ambos genes para el color en un lote de muestras superior a dos, para permitir prácticamente excluir (0.971) este lote de muestras del origen ibérico puro.

Por otro lado, el empleo de los SNPs detectados en los genes *MC1R* y *Pink* presenta una clara ventaja frente a los marcadores de tipo microsatélite y AFLP, debido a su sencillez de genotipado, mediante PCR-RFLP, lo que hace mas sencillo y económico su uso en el diagnóstico de exclusión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves E., Castellanos C., Óvilo C., Silió L. & Rodríguez M.C.(2002). Differentiation of the raw of the iberian pig meta industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. Meat Science 61, 157-162.
- Giuffra E., Kijas J.M.H., Amarger V., Carlborg Ö., Jeon J.T. & Andersson L. (2000). The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequence introgression. Mamm. Genome 10, 1132-1136.
- Fernández A.I. (2003). Estudio de la base genética del color de la capa y aplicaciones prácticas en porcino. Tesis doctoral.
- Kerr R., Stevens G., Manga P., Salm S., John P., Haw T. & Ramsay M.(2000). Identification of the P gene mutations in individuals with oculocutaneous albinism in sub-Saharan Africa. Hum. Mut. 15, 166-172.
- Kijas J.M.H., Moller M., Plastow G. & Andersson L.(2001). A frameshift mutation in MC1R and high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. Genetics 158, 779-785.
- Kijas J.H.M., Wales R., Törnsten A., Chardon P., Moller M. & Andersson L. (1998). Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. Genetics 150, 1177-1185.
- Óvilo C., Cervera M.T. Castellanos C. & Martínez Zapater. (2000). Characterization of Iberian pig genotype using AFLP markers. Anim. Genet. 31, 117-122.