APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES EN LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE REPRODUCTORES Y EN EL ESTUDIO DE PARENTESCO EN POBLACIONES PORCINAS DE SELECCIÓN DE LAS RAZAS PIETRAIN Y DUROC

DELGADO[1] R., TORRENTO[1] N., TRILLA[1] N., COLLELL[2] E., BALLESTER[2] J., TIBAU[1] J.
[1]IRTA - Centro de Control Porcino. Monells 17121 (Girona)
[2]Applus Agroalimentario - Análisis Genéticos Campus UAB 08193 Bellaterra (Barcelona)

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la genealogía es fundamental para la evaluación genética de los reproductores porcinos selectos y un requisito para su registro en los Libros Genealógicos. La filiación de los animales puede verificarse mediante el análisis de las diferencias en marcadores genéticos microsatélites del ADN de los individuos. Estas variantes en el número de secuencias de repeticiones cortas de ADN en tandem se pueden utilizar como marcadores genéticos y pueden analizarse de manera fácil y rápida a partir de una cantidad mínima de material biológico. Cada marcador posee una probabilidad de exclusión de paternidad que se incrementa mediante el uso de un panel de varios marcadores. Esta técnica permite estudiar la variabilidad genética de las poblaciones, la caracterización de distintas líneas o razas y la comprobación de las relaciones de parentesco. El objetivo del estudio es analizar la variabilidad genética en dos poblaciones porcinas de las razas *Pietran* (Pi) y *Duroc (Du)* utilizando un panel de 14 microsatélites y estudiar las probabilidades de exclusión de paternidades, para poder establecer un panel de marcadores preciso y eficaz para la identificación de individuos y la asignación de relaciones de parentesco entre animales de estas dos razas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado un total de 90 muestras de folículo piloso pertenecientes a 41 animales *Pi* y a 41 *Du,* todos machos reproductores inscriptos en el Libro Genealógico de Porcino Selecto de la ANPS, de los cuales se han registrado más de 6000 camadas de raza pura. Los 14 marcadores microsatélites seleccionados para realizar el genotipado, localizados en 13 cromosomas, están presentes en el panel de 50 marcadores utilizados por Groenen et al. 2003, en el panel de 27 marcadores recomendados por la F.A.O. (Barker *et al.*,1998), recomendados por la I.S.A.G. y utilizados para el control de parentesco porcino en Austria (Nechtelberger et al. 2001) y en la República Checa (Putnová et al. 2003).

Se realizó la extracción del ADN con una modificación del protocolo Wizard y el control de calidad y la cuantificación del ADN mediante espectrofotometría. Las amplificaciones de los marcadores se realizó con *PCR*, la separación y visualización de los productos se efectuó con un secuenciador automático ABI *Prism* 3100 y se interpretaron los resultados con el programa *GeneScan*® 3.0 (*Applied Biosystems*).

Para el análisis estadístico de la diversidad genética, se calcularan las frecuencias alélicas. Como medidas de diversidad genética se calcularon: a) el número de alelos por *locus* en los 14 *loci* y su valor medio b) los valores de heterocigotia esperada y observada en cada *locus* y su valor medio (calculados a partir de las frecuencias relativas de los alelos, usando la ecuación de Nei, 1987) c) el valor de contenido informativo del polimorfismo (PIC) en cada *locus* y su valor medio, según Botstein *et al*. (1980) d) la probabilidad de exclusión de paternidad con la ausencia del genotipo de uno de los padres (PE1) y la probabilidad de exclusión de paternidad (PE2)

para cada locus y la probabilidad combinada de exclusión para los 14 *loci* (CPE1 y CPE2) (Jamienson y Taylor, 1997). Todos estos parámetros se calcularon para cada microsatélite y raza utilizando el programa *Cervus*, versión 2.0 (Marshall *et al*.,1998, Slate *et al*., 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se puede observar que el número de alelos detectados en los 14 marcadores ha variado entre 2 y 10 en *Pi* y entre 4 y 13 en *Du*. El valor de la heterocigotia esperada (He) permite estimar la diversidad genética, variando esta estimación entre 0.162 y 0.815 en *Pi* y entre 0.142 y 0.850 en *Du*. El contenido informativo del polimorfismo (PIC) es una medida relacionada con la heterocigotia esperada: los valores extremos corresponden a 0.778 y 0.147 en *Pi* y entre 0.824 y en 0.135 en *Du*. De los 14 marcadores utilizados, 4 en *Pi* (SW72, S0227, SW951 y S0090) y 3 en *Du* (S0227, SW951 y S0355) se han revelado poco polimorficos, presentando todos valores de He inferiores a 0.5 y consecuentemente, probabilidades de exclusión de paternidad muy bajas, pudiendo estos 4 marcadores ser descartados en posteriores estudios de parentesco en estas dos razas.

Tabla 1 - Número de alelos observados (NA), heterocigotia esperada (He) y observada (Ho), contenido informativo de polimorfismo (PIC), probabilidad de exclusión de paternidad con la ausencia de lo genotipo de uno de los padres (PE 1) y la probabilidad de exclusión de paternidad (PE 2), para cada *locus* y en las dos populaciones.

	Pietran						*Duroc*					
Locus	**NA**	**He**	**Ho**	**PIC**	**PE 1**	**PE 2**	**NA**	**He**	**Ho**	**PIC**	**PE 1**	**PE 2**
S0155	5	0.737	0.750	0.690	0.324	0.505	6	0.726	0.465	0.669	0.302	0.475
SW240	7	0.794	0.700	0.753	0.405	0.584	7	0.603	0.500	0.567	0.210	0.390
SW72	5	0.313	0.225	0.295	0.050	0.171	5	0.774	0.689	0.726	0.362	0.541
S0227	2	0.162	0.175	0.147	0.013	0.078	4	0.267	0.261	0.239	0.035	0.126
S0005	10	0.815	0.778	0.778	0.449	0.624	13	0.850	0.761	0.824	0.524	0.690
S0101	3	0.638	0.400	0.554	0.195	0.342	4	0.577	0.533	0.526	0.175	0.340
SW911	5	0.659	0.750	0.597	0.233	0.398	5	0.719	0.652	0.671	0.304	0.482
SW951	3	0.453	0.475	0.401	0.100	0.231	4	0.377	0.354	0.354	0.073	0.211
S0386	4	0.536	0.512	0.474	0.146	0.289	6	0.511	0.364	0.453	0.135	0.275
S0090	3	0.478	0.458	0.411	0.109	0.236	4	0.689	0.595	0.613	0.242	0.397
SW857	7	0.760	0.757	0.713	0.354	0.533	4	0.610	0.574	0.526	0.189	0.324
S0355	5	0.599	0.487	0.547	0.192	0.358	4	0.142	0.149	0.135	0.010	0.071
SW936	6	0.626	0.513	0.563	0.211	0.369	5	0.683	0.659	0.607	0.238	0.392
SW24	8	0.743	0.718	0.709	0.356	0.542	7	0.779	0.696	0.734	0.379	0.557

En la tabla 2 se presentan los diferentes alelos detectados con los 14 marcadores utilizados. En todos los locus fueron detectados alelos específicos de una o de otra raza, encontrándose en general a baja frecuencia. Sin embargo, es de destacar en *Du* los alelos 152, 114, 239 y 247 presentes en los locus S0155, SW72, S0005 y S0090, y en *Pi* el alelo 251 presente en locus S0355, todos ellos presentando frecuencias superiores a 0.25, por lo que estos marcadores pueden ser utilizados en un panel de marcadores de identificación especifica entre animales de las dos razas.

Los valores medios de los parámetros estadísticos de las dos razas (tabla 3) son muy similares. El número total de alelos detectados en *Du* fue superior a *Pi* (78 vs. 73) y

el número medio de alelos en cada locus fue más elevado en *Du* respecto de *Pi* (5.57 vs. 5.29), en cambio los valores medios de la heterocigotia y del PIC fueron prácticamente idénticos. La probabilidad combinada de exclusión de paternidad con la ausencia del genotipo de uno de los padres (CPE1) fue de 97.672% para *Pi* y de 97.854% en *Du*. Teniendo en cuenta la proximidad familiar de los individuos es importante analizar los genotipos de las madres con el fin de alcanzar una probabilidad de exclusión de paternidad mas elevada (99.915% para *Pi* y de 99.920% para *Du).*

El panel 14 microsatélites estudiado se mostró eficaz para el estudio de parentesco en poblaciones porcinas de selección de *Pi* y *Du*. A pesar de ello, es necesario hacer mas estudios con mas animales y razas, con el fin de confirmar los resultados obtenidos y establecer un panel de microsatélites más preciso.

Tabla 2 - Alelos identificados en *Pietran* y *Duroc* en cada *locus* ; cromosoma (Cr.)
(En negrita = alelos específicos de una raza. (*) = Alelo con frecuencia superior a 0.25)

Locus	*Cr.*	*Pietran*	*Duroc*
S0155	1q	**148**, 156, 158, 160, 162	**152*, 154**, 156, 158, 160, 162
SW240	2p	90, 92, 94, 106, 108, 110, **116**	90, 92, 94, 106, 108, 110, **112**
SW72	3p	98, 100, **106**, 108, 110	98, 100, 108, 110, **114***
S0227	4p	226, 250	226, **248**, 250, **254**
S0005	5q	201, 217, **221**, 229, **231**, 233, **235**, 237, 241, 243	201, **203**, 217, 229, 233, 237, **239**, 241, 243, **245**, **249**, **265**, **267**
S0101	7q	209, 211, 213	**207**, 209, 211, 213
SW911	9p	157, 161, **163**, 167, 169	**155**, 157, 161, 167, 169
SW951	10q	121, 123, 129	121, 123, **127**, 129
S0386	11q	**168**, 174, 176, 184	**166**, **170**, **172**, 174,176,184
S0090	12q	241, **243**, 245	241, 245, **247***, **249**
SW857	14	142, **146**, 150, 152, **154**, 156, **158**	142, 150, 152, 156
S0355	15	247, **251***, **253**, **261**, **273**	247, **249**, **263**, **267**
SW936	15	98, 104, 110, 112, 116, **118**	98, 104, 110, 112, 116
SW24	17	93, 95, 99, 101, 107, **109**, 113, 117	93, 95, 99, 101, 107, 113,117

Tabla 3.- Número total de alelos (NA Total), número medio de alelos por locus (NA/locus), Heterocigotia media (Het. media), media del contenido informativo del polimorfismo (PIC medio), probabilidad combinada de exclusión en ausencia del genotipo de uno de los padres (CPE 1) y la probabilidad combinada de exclusión (CPE 2).

Razas	NA Total	NA/Locus	Het. media	PIC medio	CPE 1	CPE 2
Pietran	73	5.29	0.594	0.545	0.976720	0.999150
Duroc	78	5.57	0.593	0.546	0.978540	0.999205

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barker J.S.F.,W.G. Hill, D. Bradley, M. Nei, R.Fris & R.K. Wayne. 1998. FAO Rome.

Groenen M.A.M., R. Joosten, M-Y Boscher, Y. Amigues, A. Rattink, B. Harlizius, J.J. Van der Poel & R.Crooijmanset. 2003. Arch Zootech. 52:145-155

Marshall TC, Slate, J, Kruuk, LEB & Pemberton, J.M. 1998 Molecular Ecology. 7:639-655

Nechtelberger D., Kaltwasser C., Stur I., Meyer J.-N., Muller M., Muller S.. 2001 Animal Biotechnology. 12(2):141-144

Putnová L., A. Knoll, V. Dvooák, J.Dvooák. 2003. Czech J. Anim Sci. 48 (8) 307-314

Slate J, Marshall, TC & Pemberton, JM (2000), J. et al. 2000. Molecular Ecology 9: 801-808.