

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL CERDO CRIOLLO CUBANO CON MICROSATÉLITES

## GENETIC CHARACTERISATION OF THE CUBAN CREOLE PIG WITH MICROSATELLITES

Martínez, A.M.<sup>1</sup>, E. Pérez-Pineda<sup>2</sup>, J.L. Vega-Pla<sup>4</sup>, C. Barba<sup>3</sup>, F.J. Velázquez<sup>2</sup> y J.V. Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Edificio Gregor Mendel. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba. España. E-mail: ib2mamaa@uco.es

<sup>2</sup>Centro de Extensión Veterinaria. Universidad de Granma. Cuba.

<sup>3</sup>Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS). Madrid. España.

<sup>4</sup>Laboratorio de Genética Molecular. Servicio de Cría Caballar. Carretera Madrid-Cádiz km 397. 14071 Córdoba. España. E-mail: jvegpla@oc.mde.es

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Estructura genética. Conservación. Relaciones filogenéticas.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic structure. Conservation. Phylogenetic relationships.

### RESUMEN

En este trabajo se caracteriza genéticamente el cerdo Criollo Cubano para conocer el estado en que se encuentra esta raza porcina, a la vez que se establecen las relaciones genéticas del mismo con las variedades principales del cerdo Ibérico mediante el cálculo de distancias genéticas. Se han analizado 93 muestras de cerdo Criollo Cubano pertenecientes a las variedades Entrepelado y Lampiño procedentes de la provincia de Granma y de La Habana (Cuba). Se han empleado 20 microsatélites de los recomendados por la FAO/ISAG (International Society of Animal Genetics) para estudios de biodiversidad porcina. Los microsatélites se han amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y los fragmentos amplificados se han separado mediante electroforesis en un secuenciador automático ABI 377XL. Todos los microsatélites tipificados han resultado polimórficos, y se han encontrado entre 4 alelos para el S0227 y 12 para el S0068, con un número medio

de alelos de 8,2. La heterocigosidad media esperada ha sido 0,6535 y la observada 0,6335. Se ha calculado la distancia genética  $D_s$  de Nei entre el cerdo Criollo Cubano y el cerdo Ibérico, y se ha construido un árbol de distancias mediante el método de UPGMA. Por último, se han calculado las distancias entre pares de individuos ( $D_{SA}$ ) y con ellas se ha construido un árbol filogenético individual basado en el algoritmo UPGMA.

### SUMMARY

In this work the Criollo Cubano pig has been characterised to know how the breed is and to know the genetic relationships with the main varieties of the Iberian pig calculating genetic distances. It have been studied 93 animals of the Criollo Cubano pig breed belonging to the Entrepelado and Lampiño varieties. 20 microsatellites recommended by ISAG for porcine

*Arch. Zootec. 54: 369-375. 2005.*

biodiversity studies. These markers were amplified by mean of the polymerase chain reaction (PCR) technique and to get the size separation of the obtained fragments we have developed electrophoresis in polyacrylamide gel in an automatic sequencer ABI377XL. All the microsatellites have been polymorphic and between 4 (S0227) and 12 (S0068) alleles have been found with an average value of 8.2. The expected heterozygosity has been 0.6535 and the observed heterozygosity 0.6335. The Nei's Ds genetic distance between the Criollo Cubano and the Iberian pig has been calculated and an UPGMA tree has been built. Finally, distances between pairs of individuals (Dsa) have been calculated and an UPGMA individual tree has been built.

## INTRODUCCIÓN

El cerdo Criollo Cubano, llegado a la isla de Cuba desde la península Ibérica con las primeras expediciones de los conquistadores españoles, lleva más de 500 años de probado aporte de riquezas para el país. Muy bien adaptado a las condiciones agroecológicas de Cuba, forma parte ya no sólo de la alimentación tradicional del campesino y pueblo cubanos, sino que está integrado completamente en su historia, su cultura y su forma de vida. Sin embargo la marginalidad de este tipo de producción, el poco interés por esta raza en las pasadas décadas y el mestizaje indiscriminado con razas selectas, han provocado una considerable reducción del número de efectivos puros en su población y además han conducido a que la estructura genética de la poblacional actual constituya un enigma por resolver, así como lo cerca o distante que está hoy de sus ancestros, el cerdo Ibérico. Así pues, el objetivo de este trabajo es caracterizar al cerdo

Criollo Cubano mediante marcadores moleculares del ADN (microsatélites) y esclarecer su origen y relaciones filogenéticas con el cerdo Ibérico, como contribución a su conservación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo del cerdo Criollo Cubano seleccionando 35 animales de la variedad Chino o Lampiño y 58 de la variedad Peludo o Entrepelado procedentes de diferentes explotaciones o fincas de la provincia de Granma y La Habana (Cuba); además se obtuvieron muestras de las razas Duroc (8) y Hampshire (12) por estar implicadas estas dos razas en cruzamientos con el cerdo Criollo Cubano.

Se han recolectado muestras de pelo por la facilidad de transporte y los escasos requerimientos de conservación de este tipo de muestra. Se obtiene el ADN empleando un protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos adaptado a muestras de pelo. Se han empleado 20 microsatélites de los recomendados por la FAO/ISAG (International Society of Animal Genetics) para estudios de biodiversidad porcina: S0101, S0215, SW911, SW936, S0068, SW632, S0227, S0225, S0090, S0226, SW951, S0228, S0178, S0386, SW72, SW857, S0026, IGF1, S0155 y SW240. Los microsatélites se amplifican mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según la metodología de Martínez *et al.* (2000). Para realizar la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos mediante la PCR se someten éstos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciamiento

## CARACTERIZACIÓN CON MICROSATÉLITES DEL CERDO CRIOLLO CUBANO

dor automático ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realiza mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente.

Con objeto de conocer el perfil genético de la raza se han calculado las frecuencias alélicas y las heterocigosidades mediante el programa informático Genetix versión 4.01 (Belkhir, 1999). Se ha calculado el contenido de información polimórfica (PIC) a partir de la fórmula propuesta por Botstein *et al.* (1980). Se han calculado los estadísticos  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  (Weir y Cockerham, 1984) mediante el programa Genetix versión 4.01.

Para conocer la relación genética del cerco Criollo Cubano con las variedades más ancestrales y representativas del cerdo Ibérico, se ha calculado la distancia genética estándar de Nei (Nei, 1972) con el programa Genetix

versión 4.01. Se ha construido un árbol de distancias mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) con el módulo Neighbor del programa PHYLIP v.3.57c (Felsenstein, 1995). La aplicación MICROSAT v.1.5b (Minch, 1998) se usa para calcular los pares de distancias genéticas entre individuos basadas en la proporción de alelos compartidos  $P_{SA}$  (Bowcock *et al.*, 1994). Los valores de las distancias obtenidos han servido de base para construir un árbol individual filogenético basado en el algoritmo UPGMA empleando para ello la aplicación TREEVIEW (Page, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los microsatélites empleados han resultado polimórficos puesto que se han encontrado entre 4 alelos del microsatélite S0227 y 12 del S0068 (**tabla I**), con un número medio de

**Tabla I.** Microsatélites analizados, número de alelos obtenido, heterocigosidad esperada y observada ( $H_e$  y  $H_o$  respectivamente) y valores de PIC (contenido de información polimórfica). (Microsatellites analysed, alleles obtained number (NA), expected heterozygosity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and PIC values (polymorphic information content)).

Microsatélites	Número de alelos	$H_e$	$H_o$	PIC	Microsatélites	Número de alelos	$H_e$	$H_o$	PIC
S0068	12	0,84	0,73	0,82	S0101	7	0,72	0,72	0,69
S0178	11	0,82	0,83	0,80	SW72	8	0,71	0,67	0,67
SW936	11	0,80	0,74	0,78	S0090	6	0,70	0,60	0,66
S0226	10	0,81	0,67	0,78	SW632	9	0,62	0,63	0,60
SW857	9	0,80	0,89	0,78	S0026	7	0,51	0,55	0,47
S0386	8	0,79	0,71	0,77	SW951	5	0,52	0,53	0,46
SW240	9	0,79	0,79	0,76	S0225	9	0,47	0,43	0,45
S0155	9	0,78	0,75	0,74	S0228	8	0,39	0,35	0,38
SW911	8	0,74	0,76	0,70	S0215	5	0,26	0,28	0,25
IGF1	7	0,75	0,75	0,70	S0227	4	0,25	0,29	0,22

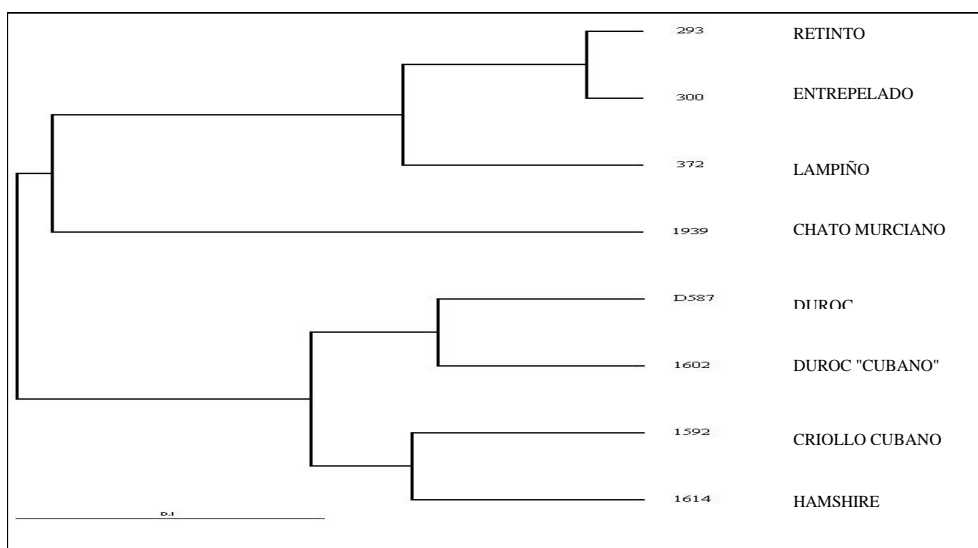
**Tabla II.** Matriz de distancias  $D_s$  (Nei, 1972). (Matrix of distances  $D_s$  (Nei, 1972)).

	Retinto	Entrepelado	Lampiño	Chato Murciano	Duroc	Criollo Cubano	Duroc Cubano
Entrepelado	0,036						
Lampiño	0,150	0,161					
Chato Murciano	0,373	0,369	0,409				
Duroc	0,401	0,365	0,468	0,421			
Criollo Cubano	0,268	0,244	0,318	0,377	0,194		
Duroc <i>Cubano</i>	0,483	0,466	0,543	0,535	0,133	0,247	
Hampshire <i>Cubano</i>	0,404	0,371	0,446	0,399	0,208	0,150	0,213

alelos de 8,2. En la **tabla I** se reflejan los valores de PIC que indican qué marcadores son más informativos en esta raza (valores superiores a 0,5) cuales son medianamente informativos (valores entre 0,25 y 0,5) y cuales son poco informativos (valores inferiores a 0,25). La mayoría de los marca-

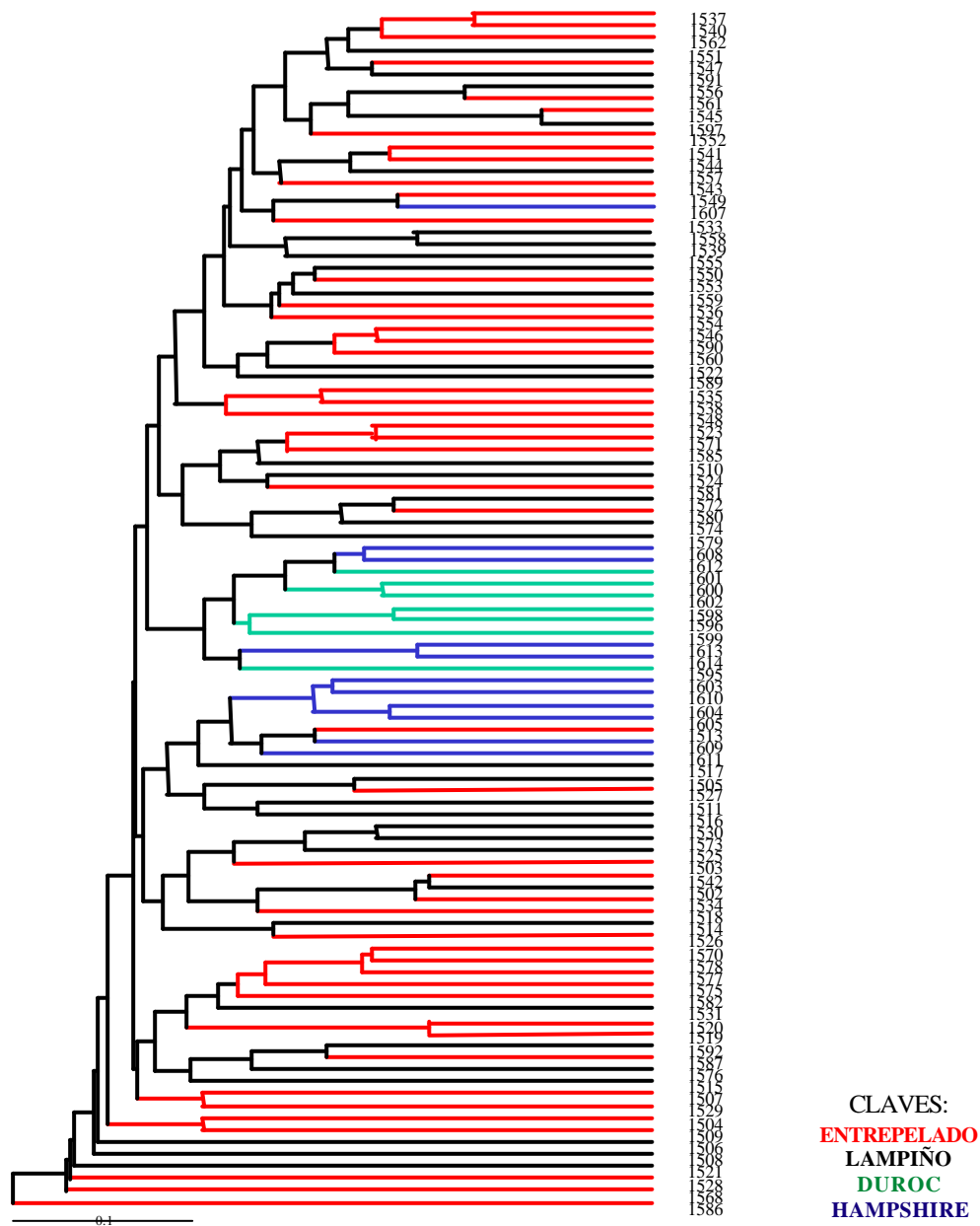
dores son informativos y por tanto son útiles para valorar la variabilidad genética del cerdo Criollo Cubano.

La heterocigosidad media observada alcanza un valor de 0,6335 y la esperada, calculada a partir de las frecuencias alélicas, de 0,6535. Estos valores, son superiores a los encontra-



**Figura 1.** Representación gráfica del árbol de distancias  $D_s$  (Nei 72) construido con el método UPGMA. (UPGMA tree of the  $D_s$  (Nei 72) genetic distances).

CARACTERIZACIÓN CON MICROSATÉLITES DEL CERDO CRIOLLO CUBANO



**Figura 2.** Representación gráfica del árbol de distancias individuales  $D_{SA}$  construido con el método UPGMA. (UPGMA tree of the  $D_{SA}$  genetic distances between pairs of individuals).

*Archivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 373.*

dos por Martínez *et al.* (2000) en el cerdo Ibérico y a los obtenidos en 11 razas porcinas europeas por Laval *et al.* (2000). Sin embargo, Liet *et al.* (2000) obtienen valores de heterocigosidad en torno al 70 p.100 en cuatro razas porcinas chinas.

Cuando dividimos la población de Criollo Cubano en dos subpoblaciones (Entrepelado y Lampiño), el  $F_{ST}$  obtenido es -0,0012, lo que nos indica que no hay diferencia genética entre estos dos grupos.

En la **tabla II** se observan los valores de distancias genéticas de Nei (1972) entre el cerdo Criollo Cubano y las variedades más clásicas del cerdo Ibérico (Retinto, Entrepelado y Lampiño). Se han introducido las razas Duroc y Hampshire existentes en Cuba así como el Chato Murciano que puede considerarse una raza porcina muy diferente al cerdo Ibérico (Martínez, 2001). En la **figura 1** se muestra el árbol de distancias y en él se observa que se agrupan, por un lado las tres

variedades del cerdo Ibérico, por otro lado las dos poblaciones de Duroc que están bastante cercanas y finalmente el cerdo Criollo Cubano que se sitúa más cerca del Hampshire que del Ibérico. Puede afirmarse que el cerdo Criollo Cubano es hoy diferente del cerdo Ibérico, pues aunque el primero sea descendiente del segundo, la deriva genética que estas dos razas han sufrido en los cerca de 500 años que llevan separadas así como el efecto de la migración derivado de la influencia de las razas Hampshire y Duroc, pueden ser las responsables de las diferencias genéticas tan manifiestas entre ellas.

En la **figura 2** se observa el árbol de distancias entre individuos y la conclusión que puede sacarse a la vista del mismo es que no existe una diferenciación entre las variedades Lampiño y Entrepelado del Criollo Cubano, ya que no se produce un agrupamiento claro de ellas, sino que los individuos están entremezclados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Belkhir, K. 1999. Genetix: Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060.
- Botstein, D., R.L. White, H. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Bowcock, A.M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J.R. Kidd and L.L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: 455-457.
- Felsenstein, J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. University of Washington.
- Laval, G., N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. Nissen, C. Jorgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J.L. Foulley, C. Chevalet and L. Ollivier. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetic Selection Evolution*, 32: 187-203.
- Li, K., Y. Chen, C. Moran, B. Fan, S. Zhao and Z. Peng. 2000. Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. *Animal Genetics*, 31: 322-325.

## CARACTERIZACIÓN CON MICROSATÉLITES DEL CERDO CRIOLLO CUBANO

- Martínez, A.M., J.V. Delgado, A. Rodero and J.L. Vega-Pla. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 295-301.
- Martínez, A.M. 2001. Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- Minch, E. 1998. MICROSAT Version 1.5b (Macintosh). University of Standford. Standford.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-282.
- Page R.D.M. 1998. Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. In: <http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod/rod.html>. Division of Enviromental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G128QQ, Scotland, UK.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. Genepop: populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86: 248-249.
- Sneath, P.H.A. and H.H. Sokal. 1973. Numerical taxomomy. Freeman Ed. San Francisco.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

