

IDENTIFICACION DE LINEAS DE CERDO IBERICO MEDIANTE MARCADORES RAPD

C. Castellanos y C. Rodriguez

Area de Mejora Genética Animal, CIT-INIA, Apdo. 8111, 28080 Madrid

Objetivos

En la producción de cerdos de tipo Ibérico se emplean poblaciones de considerable heterogeneidad genética, al coexistir dentro de la raza diversos tipos tradicionales y ser frecuente el cruce con razas extranjeras de capa oscura. El desarrollo de métodos que permitan diferenciar de modo objetivo el origen de los animales de tipo Ibérico reforzaría los criterios genéticos de caracterización de carnes y productos curados y resolvería los casos de identificación no solubles por criterios morfológicos, evitando los riesgos de difusión de genes exógenos en la población autóctona.

Estos métodos de diferenciación analítica deben basarse en polimorfismos de regiones de DNA utilizables como marcadores diagnóstico y detectables tanto en animales vivos como en productos curados. El empleo de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se ha revelado adecuado en la identificación de variedades y subespecies vegetales y animales. Análogamente a los RFLPs y a los micro y minisatélites, los marcadores RAPD son polimórficos entre individuos, pueden ensayarse en número prácticamente ilimitado y se heredan como caracteres mendelianos simples aunque se comportan generalmente como dominantes. Pero además, presentan otras ventajas: baja cantidad de DNA necesaria, no requieren uso de radiactividad o información previa de secuencias y bajos costes. Los RAPD son análogos a los polimorfismos enzimáticos en cuanto a su facilidad técnica pero de una capacidad de resolución muy superior.

Por su carácter dominante (heterocigotos usualmente no detectables) que los hace menos informativos para su aplicación al mapeo genético, los RAPD son más útiles en la detección de genes singulares y resultan idóneos como marcadores diagnóstico en la identificación de estirpes o variedades (Rafalski y Tingey, 1993). En animales domésticos, estos marcadores se han aplicado a la diferenciación de las dos principales subespecies de vacuno (Kemp y Teale, 1994) y a la caracterización de razas de Cebú en Tanzania (Gwakisa et al., 1994). En problemas de identificación taxonómica se ha revelado muy útil el denominado *bulked analysis* en el que, en lugar de trabajar con DNA individual, se trabaja con mezclas de DNA de individuos pertenecientes a un mismo grupo.

En la presente comunicación se presentan los primeros resultados de caracterización de líneas de cerdo Ibérico con esta metodología relativos a las poblaciones *Manchado de Jabugo*, tipo casi extinto conservado por la Diputación de Huelva y *Torbiscal* (C.A. de Castilla-La Mancha). Esta última representa al conjunto del genoma del cerdo Ibérico, ya que procede de la fusión de los cuatro principales tipos existentes en los años 40: negros lampiños de la Serena y de la Vega del Guadiana, retinto y dourado alentejano (Rodríguez et al., 1994).

Material y Métodos

Material

El material biológico de partida fueron muestras individuales de 2 ml de sangre obtenida de animales vivos y recogida en EDTA. Un total de 39 individuos fueron muestreados entre las dos poblaciones evitando en lo posible los animales emparentados. Los 26 animales *Torbiscal* fueron asignados a efectos del *bulked analysis* a tres grupos de 9 ♂♂, 9 ♀♀ y 8 ♀♀. Los 13 animales *Manchado de Jabugo* se dividieron en dos grupos de 7 ♂♂ y 6 ♀♀.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se ha seguido una modificación del protocolo de Higuchi (1989) con uso de fenol en lugar de Proteinasa K. El DNA purificado se conserva en un medio tamponado (TE pH 7.4).

Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

El protocolo seguido se basa en el trabajo de Williams et al. (1990). La reacción de amplificación se realiza en volúmenes de 25 μ l de tampón PCR (Perkin Elmer), 2 mM de Cl_2Mg , 200 μ M de dNTPs, 30 ng de DNA genómico, 1 unidad de Taq DNA Polimerasa (Boehringer) y 0.2 μ M del correspondiente cebador (oligonucleótido de 10 bases de secuencia aleatoria). Los ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión se programaron en un Termociclador Perkin Elmer 9600: 94° 2:00 - 42° 1:00 - 72° 2:00 (1 ciclo), 94° 1:00 - 42° 1:00 - 72° 2:00 (4 ciclos), 94° 0:45 - 36° 1:00 - 72° 1:45 (40 ciclos).

Análisis de DNA amplificado

El análisis de los productos de la amplificación se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con tampón TBE y tinción con Bromuro de Etidio. La presencia en una de las calles de un patrón (λ PstI) permite estimar el número de bases de cada banda de DNA.

Resultados

Las bandas de DNA visualizadas se registran mediante códigos que describen el oligonucleótido cebador empleado y el número de bases del correspondiente producto de amplificación del DNA. Por ejemplo, OPA 10₈₀₀ es el producto de amplificación de 800 bases producidos por el oligonucleótido OPA 10 (GTGATCGCAG). En cuanto a su presencia/ausencia en ambas poblaciones pueden observarse dos situaciones: presencia en ambas o presencia en una de las poblaciones y ausencia en la otra. Las bandas del primer tipo son no informativas con vistas a la discriminación entre poblaciones, mientras que las segundas son utilizables como marcadores diagnóstico de confirmar el posterior análisis individual su presencia en todos los animales de la población.

Hasta el momento se han ensayado 50 oligonucleótidos cebadores pertenecientes a los *kits* A (20), C (10) y F (20) de Operon, de 5 de los cuales (OPC 01, OPC 03, OPC 07, OPF18 y OPF19) no se obtuvieron productos de amplificación identificables. El promedio de productos de amplificación

obtenido con los restantes cebadores fue de 4.75, obteniéndose hasta 11 bandas con el oligonucleótido OPA 05. El conjunto de resultados se resume en la Tabla siguiente.

Nº de cebadores ensayados	50		
Nº de productos de amplificación DNA	214		
▶ compartidos por ambas poblaciones	210		
▶ específicos de <i>Torbiscal</i>	3	OPF 05 ₁₅₀₀	CCGAATTCCC
		OPA 18 ₁₁₆₀	AGGTGACCGT
		OPA 20 ₁₁₆₀	GTTGCGATCC
▶ específico de <i>Manchado de Jabugo</i>	1	OPA 15 ₁₀₀₀	TTCCGAACCC

El cebador OPA 15 (5'-TTCCGAACCC-3') permite la detección de una banda de aproximadamente 1000 bases en las muestras de ♂♂ y ♀♀ de *Manchado de Jabugo*, ausente en las muestras de la población de referencia *Torbiscal*. El análisis individual de las muestras de animales *Manchado* ha confirmado la presencia en todos ellos de esta banda. Por contra, los cebadores OPF 05, OPA 18 y OPA 20 permiten detectar en ♂♂ y ♀♀ *Torbiscal* productos de amplificación de DNA de 1500, 1160 y 1160 respectivamente, no detectables en las muestras de *Manchado de Jabugo*. Estos resultados, aunque preliminares, confirman que el uso como cebadores de PCR de oligonucleótidos de secuencia arbitraria posibilita identificar marcadores de DNA reproducibles, característicos de poblaciones de cerdo Ibérico.

Por otra parte, un buen número de los otros 210 productos de amplificación de DNA compartidos por ambas poblaciones presentan polimorfismo intra *Torbiscal* y son potenciales marcadores en estudios de variabilidad genética entre y dentro de líneas de Ibérico basados en análisis de muestras individuales.

Agradecimientos

Agradecemos a Manuel Cumberas, Ricardo Ferrer y Javier Forero su colaboración en la obtención de las muestras de *Manchado de Jabugo*

Referencias

- Gwakisa et al., 1994. Anim. Genet. 25: 89-94
 Higuchi, 1989. En PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Stockton Press: 31-38
 Kemp y Teale, 1994. Anim. Genet. 25: 83-88
 Rafalski y Tingey, 1993. Trends in Genetics 9: 275-280
 Rodríguez J. et al., 1994. Proc. 5th WCGALP, Guelph (Canada) 21: 524-527
 Williams et al., 1990. Nucleic Acid Research, 18: 6531-6535