

# CARACTERIZACION DE DOS LINEAS DE CERDO IBERICO NEGRO LAMPIÑO MEDIANTE MARCADORES PCR-RAPD

C. Castellanos, C. Ovilo y L. Silió

Area de Mejora Genética Animal, CIT-INIA, Madrid

## INTRODUCCIÓN

Entre los tipos tradicionales de cerdo ibérico, los negros lampiños, asociados a canales extremadamente grasas, experimentaron el mayor rechazo por parte de los ganaderos durante el período de crisis de esta raza a partir de 1960. La línea Guadyerbas, representativa de los cerdos negros lampiños de la vega del Guadiana, conservada como una población cerrada desde 1945 constituye la principal reserva de este material genético (Rodríguez y col., 1994). La alta consanguinidad acumulada en esta línea ( $F \approx 0,35$ ) dificulta su conservación como población de animales vivos. Existe una creciente demanda de verracos de tipo negro lampiño destinados al cruce con hembras Duroc, que hace aconsejable la obtención de una línea compuesta a partir de Guadyerbas y de negros lampiños de otros orígenes conservados en muy pequeño número por ganaderos privados. En el desarrollo inicial de esta línea, y para atenuar las pérdidas de variabilidad genética por deriva, se utilizarían métodos de conservación asistida por marcadores, que requieren disponer de marcadores moleculares de los genotipos utilizados.

La amplificación de ADN genómico usando como cebadores oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria en condiciones de baja astringencia produce patrones complejos de fragmentos de ADN (RAPDs, Randomly Amplified Polymorphic DNAs). Estos patrones pueden detectar polimorfismos entre genomas relacionados y son útiles en estudios de mapeo genético, taxonomía, filogenética y detección de mutaciones. El estudio de su potencial aplicación a la caracterización de genotipos de negro lampiños es el objetivo del presente trabajo.

## MATERIAL Y METODOS

### *Animales*

Se han utilizado para este estudio muestras de 18 animales de ambos sexos de la línea Guadyerbas y de 5 verracos de la línea Coronado, principal representante actual de los negros lampiños de la comarca de La Serena. Como referencia se han utilizado muestras de otras poblaciones de cerdo ibérico: Torbiscal, compuesta de los principales tipos tradicionales (20 animales) y Retinto Extremeño, (10 animales de dos líneas procedentes de la antigua ganadería Montero de Espinosa).

### *Métodos*

Se obtuvieron muestras de 5ml de sangre de todos los animales, recogidas en tubos estériles

con anticoagulante (EDTA). La extracción de ADN se realizó a partir de alícuotas de 1ml de sangre mediante una adaptación de la técnica de Wu y col. (1995). Cada ADN individual se cuantificó y se diluyó a una concentración de 15 ng/ $\mu$ l. Para el análisis inicial por grupos se mezclaron cantidades iguales de ADN de distintos animales de la misma población, obteniéndose lotes de ADN compuestos por 5 individuos cada uno.

Se han analizado 100 cebadores (Operon Technologies, Kits R, T, X, Y, Z) de 10 pares de bases, secuencia aleatoria y contenido G+C de 60 a 70%. Cada cebador se probó mediante la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de mezclas de ADN específicas de las distintas líneas, realizándose el análisis individual de aquellos que presentaron polimorfismos a nivel de grupo.

Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes de 10  $\mu$ l con concentraciones de 0,3  $\mu$ M cebador, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM  $Cl_2Mg$ , 20 ng ADN y 0,3U Taq polimerasa (Biotaq, Ramón Cornet). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer 2400, siguiendo un programa de 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C durante 30 seg, 35°C durante 30 seg y 72°C durante 60 seg. Los productos de PCR se separaron por electroforesis a 160V en geles de agarosa al 1.3% en tampón TBE, y se observaron con luz UV después de teñirlos con bromuro de etidio.

## RESULTADOS

El 89% de los cebadores probados produjeron patrones de fragmentos definidos con tamaños comprendidos entre 0.3 y 3 Kb. Se analizaron individualmente 11 cebadores que habían presentado polimorfismos en el primer análisis de lotes y 7 de ellos se confirmaron como marcadores de una de las líneas.

CEBADOR	SECUENCIA	Tamaño del Marcador (pb)
OPR-0	CCCGTAGCAC	700
OPR-14	CAGGATTCCC	1110
OPR-19	CCTCCTCATC	700
OPT-16	GGTGAACGCT	875
OPX-02	TTCCGCCACC	700
OPY-15	AGTCGCCCTT	650
OPZ-12	TCAACGGGAC	1350

Los cebadores OPR-14, OPR-19, OPX-02, OPY-15 y OPZ-12 amplificaron marcadores presentes en individuos de estirpe Coronado (en distintos porcentajes) y ausentes en Guadyerbas. Los cebadores OPR-04, y OPT-16 produjeron bandas polimórficas presentes en Guadyerbas y ausentes en Coronado. La proporción de estos marcadores en las líneas Guadyerbas y Coronado, así como en las poblaciones de referencia estudiadas es la siguiente:

CEBADOR	Guadyervas	Coronado	Torbiscal	Retinto
OPR-04	18/18	0/5	18/20	10/10
OPR-14	0/18	3/5	6/18	3/10
OPR-19	0/18	5/5	0/20	0/10
OPT-16	11/17	0/5	5/20	0/10
OPX-02	0/18	5/5	14/20	5/10
OPY-15	0/18	3/5	0/20	0/10
OPZ-12	0/18	4/5	0/20	0/10

Estos resultados indican que los 2 marcadores de Guadyervas están ausentes en Coronado pero no en las otras poblaciones de cerdo ibérico. De los 5 marcadores de Coronado, 2 de ellos (OPR-14 y OPX-2) asimismo amplifican tanto en Torbiscal como en Retinto, mientras los otros 3 (OPR-19, OPY-15 y OPZ-12) no amplifican en estas poblaciones. Curiosamente, se ha comprobado que 2 de ellos (OPR-19 y OPZ-12) sí amplifican en muestras de ADN de cerdos de raza Duroc.

Como conclusión de este trabajo, podemos afirmar que es posible identificar marcadores PCR-RAPD característicos de distintas líneas de cerdos negros lampiños. Sin embargo, para disponer de un mínimo de 1-2 marcadores por cromosoma, sería necesario ensayar de 300 a 600 cebadores en análisis por grupos. Existen actualmente nuevas técnicas de detección de marcadores, que permiten visualizar un mayor número de fragmentos de ADN amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphisms) o que posibilitan la detección directa de secuencias de ADN diferentes a partir de dos muestras iniciales (RDA, Representational Difference Analysis). Probablemente, estas técnicas sean más potentes para obtener el número de marcadores necesario en un programa de conservación apoyado en marcadores moleculares.

#### REFERENCIAS

- Cushwa, W.T., Medrano, J.F. (1996). *Animal Biotechnology*, 7(1), 11-31.
- Gwakisa, P.S., Kemp, S.J., Teale, A.J. (1994). *Animal Genetics*, 25, 89-94.
- Kemp, S.J., Teale, A.J. (1994). *Animal Genetics*, 25, 83-88.
- Micheltore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9828-9832.
- Rodríguez, J., Silió, L., Toro, M. y Rodríguez, C. (1994). *Proc. 5<sup>th</sup> World Congress Genetics Applied Livestock Production* 21: 524-527.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). *Nucleic Acid Research*, 18(22), 6531-6535.
- Wu, Q., Chen, M., Buchwald, M., Phillips, R.A. (1995). *Nucleic Acids Research*, 23(24), 5087-5088.