

Estudio de la secuencia completa del ADN mitocondrial de 4 razas porcinas para el desarrollo de una herramienta molecular que certifique el origen materno en el ámbito de la norma de calidad del cerdo Ibérico

A. Membrillo*, I. Clemente*, P.J. Azor*, C. Avilés*, A.M. Jiménez*, E. Santos*, A. Rodero*, G. Dorado**, A. Molina*

* Grupo Meragem (AGR158). Dpto. Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

** Grupo AGR248. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

E-mail: agr158.ldgv@gmail.com

Resumen

Con la aprobación de la Norma de Calidad para los productos del Cerdo Ibérico (R.D. 1469/2007 de 2 de noviembre) se establece como requisito el origen materno Ibérico puro para los productos comercializados como "de Ibérico" dentro de la Norma. Debido a la herencia materna del ADN mitocondrial, su estudio y análisis se erige como una herramienta útil en combinación con otras herramientas moleculares para garantizar el cumplimiento normativo. La secuenciación completa del ADN mitocondrial (ADNmt) de cerdos pertenecientes a las razas Ibérica, Duroc, Large White y Mangalitzta ha permitido localizar 199 polimorfismos de base sencilla (SNP). Estos resultados forman parte de un desarrollo genómico más amplio para el análisis y genotipado del cerdo Ibérico y sus productos derivados.

Palabras clave: Cerdo Ibérico, origen materno, ADN mitocondrial, Norma de Calidad del cerdo Ibérico

Summary

Study of the complete sequence of DNA mitochondrial of 4 pigs breeds to develop a molecular tool and certification of the maternal origin in the legal framework about Iberian Pig

The law about the Quality Standard for Iberian pig products (RD 1469/2007 from November 2) establishes a requirement Iberian pure maternal origin for products sold as "from Iberian" within the Standard. Because of the maternal inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA), its study and analysis is an useful tool in combination with other molecular tools to ensure regulatory compliance. The complete sequencing of the mtDNA from Iberian, Duroc, Large White and Mangalitzta pigs allowed identifying 199 type SNP polymorphisms located in the mitochondrial genome. These results belong to a wider genomic development for the analysis and fingerprinting of the Iberian pig and its products.

Key words: Iberian pig, maternal origin, mitochondrial DNA, Quality Standard for products of the Iberian pig

Introducción

Se ha demostrado que el ADN mitocondrial (ADNmt) es muy útil para el estudio de los orígenes maternos de las razas porcinas actuales. Estudios evolutivos (Giuffra *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2005; Kijas *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002) lo han utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas de distintas razas porcinas analizando y comparando fragmentos de la región D-loop y de la secuencia del gen del citocromo b del ADNmt. La norma de Calidad para los productos del cerdo ibérico (Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre) establece la obligatoriedad de que éstos procedan de madre Ibérica pura, inscrita o no en el Libro Genealógico, por lo que, el aporte de sangre Duroc, permitido hasta en un 50% por la mencionada norma, sólo puede proceder por vía paterna. El ADNmt, complementariamente con otras técnicas moleculares, puede erigirse como una herramienta útil para garantizar el cumplimiento de este aspecto normativo, garantizando la calidad y controlando posibles fraudes. Se ha realizado un primer estudio por Alves *et al.*, (2007) en el que ya estudian el origen materno y los polimorfismos encontrados en el ADNmt en las razas Duroc e Ibérica. El objetivo del presente estudio es determinar los lugares polimórficos del ADNmt capaces de diferenciar el origen materno de individuos de 4 razas porcinas (Ibérica, Duroc, Large White y Mangalitza), todo ello tendente a evitar el posible fraude en el ámbito de la Norma de Cali.

Material y métodos

Para la realización de este estudio, se han tomado muestras de cuatro animales pertenecientes a las cuatro principales estirpes diferenciadas en el Libro Genealógico de la

Raza Porcina Ibérica: Entrepelado, Lampiño, Torbiscal y Retinto. Esta diferenciación se ha puesto de manifiesto por varios autores a partir del estudio de microsatélites y fragmentos del ADNmt (Martínez *et al.*, 2000 y 2001; Membrillo *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2003). Además de los individuos de dichas estirpes, se han secuenciado un individuo de cada una de las siguientes razas: Large White, Mangalitza y Duroc, por su importancia cualitativa en el sector porcino o por ser posibles fuentes de fraude en los productos comercializados como ibéricos.

El ADN total se extrajo a partir de sangre entera utilizando la metodología de Miller *et al.* (1998) y digestión con proteinasa K. Se amplificó el ADNmt completo con cebadores diseñados por los autores en distintas reacciones de PCR, en un termociclador EP Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a partir de la secuencia de ADNmt de porcino publicado en la Base de Datos GenBank con número de acceso NC_000845.1 (Lin *et al.*, 1999). Una vez amplificados todos los fragmentos se realizó la reacción de secuenciación con terminadores fluorescentes. La purificación de los productos amplificados se llevó a cabo con el kit Autoseq (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI 3130x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las secuencias se examinaron y alinearon con el programa Sequencher v.4.7 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EUA).

Resultados y discusión

Los tamaños del genoma mitocondrial secuenciado osciló entre 16701 pb de los individuos de la estirpe Lampiño y los 16991 pb de la raza Large White. El escrutinio comparativo de todas las secuencias dio como resultado la localización de 199 puntos poli-

mórficos de base sencilla (SNP) además de otros tipos de polimorfismo (deleciones, inserciones, etc.) con posible utilidad para el objetivo de este trabajo, la gran mayoría situados en los genes de las enzimas que intervienen en la cadena respiratoria mitocondrial. La distribución de éstos se muestra en la tabla 1.

De los 199 polimorfismos detectados se han seleccionado los que mayor utilidad podría tener *a priori* para diferenciar el origen materno de los individuos problema. En la tabla 2 se presentan los genes con polimorfismos clasificados según la posible utilidad *a priori* para el objetivo del presente estu-

dio. La utilidad de los marcadores se ha asignado según el número de posiciones polimórficas y el número de razas que diferencian.

Una vez encontradas las posiciones polimórficas más interesantes para poder identificar los orígenes maternos, se diseñaron cebadores que las flanquean, con el objetivo de validar los puntos polimórficos identificados en el primer "rastreo". Ello permitirá seleccionar dianas específicas para el genotipado y diferenciación. Estos resultados se enmarcan en un desarrollo genómico más amplio para el genotipado e identificación del cerdo Ibérico y sus productos derivados.

Tabla 1. Sitios polimórficos del ADN mitocondrial de cerdo
Table 1. Pig mitochondrial DNA polymorphisms

GEN	Nº polimorfismos (SNPs)
ARNs 12S	7
ARNs 16S	11
ARNt Alanina	2
ARNt Ácido Aspártico	2
ARNt Cisteína	1
ARNt Ácido Glutámico	1
ARNt Glycina	1
ARNt Leucina 2	2
ARNt Threonina	2
ARNt Valina	3
ATP 6	11
ATP 8	4
COX 1	16
COX 2	9
COX 3	9
CYT B	19
ND 1	19
ND 2	21
ND 3	5
ND 4	15
ND 4L	8
ND 5	18
ND 6	9
ARNt Fenilalanina	4

Tabla 2. Clasificación de genes mitocondriales según el número de sitios polimórficos, número de razas que discriminan y utilidad

Table 2. Classification of mitochondrial genes by number of polymorphic sites, number of discriminated breeds and utility

GEN	Nº polimorfismos SNPs	Nº RAZAS	UTILIDAD
ARNr 12S	8	3	ALTA
ARNr 16S	11	3	ALTA
ARNt Fenilalanina	4	2	BAJA
ARNt Valina	3	2	BAJA
ATP 6	11	2	BAJA
COX 3	9	3	ALTA
CYT B	19	3	ALTA
ND 1	19	4	MUY ALTA
ND 2	21	2	ALTA
ND 4	15	2	BAJA
ND 5	18	3	ALTA

Agradecimientos

Financiado por Proyecto 013/C/2005, Grupo PAI AGR-248 y Grupo PAI AGR-158, Junta de Andalucía (Spain).

Bibliografía

- Alves E, Fernández AI, Óvilo C, Fernández-Rodríguez A, Rodríguez C, Silió L, 2007. Verificación mediante marcadores genéticos del origen racial materno conforme a la Norma de producción de cerdos Ibéricos. I Congreso nacional de Zootecnia. Situación actual y futuro de las razas puras. 25-26 de Octubre 2007. Madrid.
- Alves E, Óvilo C, Rodríguez C, Silió L, 2003. Estimación del tiempo de divergencia de ascendientes de cerdos asiáticos y europeos basada en ADN mitocondrial. AIDA-ITEA.
- Alves E, Óvilo C, Rodríguez C, Silió L, 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Anim. Genet.*, 34, 319-324.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Andersson L, 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 154, 1785-1791.
- Kijas JMH, Andersson L, 2001. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *J. Mol. Evol.*, 52, 302-308.
- Kim KI, Lee JH, Li K, Zhang YP, Lee SS, Góngora J, Moran C, 2002. Phylogenetic relationship of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-Loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.*, 33, 19-25.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conway P, Andersson L, Cooper A, 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 37.
- Lin CS, Sun YL, Liu CY, Yang PC, Chang LC, Cheng IC, Mao S, Huang MC, 1999. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus Scrofa*) mitochondrial

genome and dating evolutionary divergence within *Artiodactyla*. *Gene*, 236, 107-114.

Martínez AM, 2001. Caracterización genética del cerdo ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

Martínez AM, Rodero A, Vega-Pla JL, 2000. Estudio con microsatélites de las principales variedades de ganado porcino del tronco ibérico. *Arch. Zootec.*, 49, 45-52.

Membrillo A, Azor PJ, Clemente I, Dorado G, Diéguez E, Gómez D, Jiménez A, Santos E,

Molina A, 2007. Estudio de las relaciones genéticas de las estirpes del cerdo Ibérico mediante marcadores microsatélite. IV Jornadas Ibéricas de razas autóctonas y sus productos tradicionales: Innovación, seguridad y cultura alimentaria. Sevilla. España.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)