

Programa de recuperación por retrocruzamiento y conservación de la variedad de cerdo ibérico Manchado de Jabugo

Forero J.¹, Gómez M. M.^{2,3*}, Venegas M.¹, Landi V.^{2,3}, Martínez A.M.^{2,3} y Delgado J.V.³

¹ Diputación de Huelva. Huelva, España.

² Animal Breeding Consulting S.L. Córdoba, España.

³ Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España

INTRODUCCIÓN

La variedad de cerdo Ibérico Manchado de Jabugo (MJ) tiene su origen a finales del siglo XIX en el término municipal de dicha población onubense con la participación, entre otros, de cerdos ibéricos rubios y negros de la zona. En la actualidad se encuentra catalogada en peligro de extinción (Forero, 1999). Tradicionalmente está vinculada al área de dehesa del suroeste de la península Ibérica, aunque con expansión en los últimos años a otras zonas de España. Es un animal rústico que aprovecha muy bien las montaneras y que es capaz de proporcionar paletas y jamones de gran aceptación.

El programa de conservación del Manchado de Jabugo sigue abierto y, de forma paralela,

se han ido incorporando otros para mejorar parámetros como el de retrocruzamiento que trata de superar la fuerte consanguinidad que existía como consecuencia de la escasez de ejemplares (www.agrodiariohuelva.es, 2016).

Sin embargo, su situación censal actual hizo que la Diputación de Huelva y la Universidad de Córdoba firmaran el proyecto titulado “*Puesta en marcha del Programa de Recuperación por Retrocruzamiento y Conservación de la variedad de Cerdo Ibérico Manchado de Jabugo*”. En este proyecto se plantearon dos acciones específicas: una cuyo objetivo es la conservación de la variedad del cerdo Ibérico Manchado de Jabugo en pureza y otra la recuperación de esta variedad tan amenazada mediante retrocruzamientos.



Lechones de la 1ª generación



Descendencia de la 3ª generación

Un retrocruzamiento se refiere al cruce de un descendiente híbrido de primera generación con uno de los padres o con un genotipo idéntico al paterno, en este caso sería de animales puros de Manchado de Jabugo y animales de la estirpe Villalón (Vill).

Esta estirpe tiene su origen a principios del siglo XX a partir del cruce entre verracos retintos portugueses y hembras retintas extremeñas, surge así el denominado “retinto mejorado” del cual se originará de manera directa, por selección en núcleo cerrado, la estirpe Villalón (Clemente y cols., 2006).

El objetivo de este estudio fue utilizar los retrocruzamientos con la estirpe Villalón, una estirpe filogenéticamente próxima para incrementar los tamaños real y efectivo del Manchado de Jabugo y a través del uso de marcadores moleculares hacer un seguimiento de la integración de los animales retro-absorbidos en la población original.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Se analizaron 93 muestras de pelo de animales nacidos entre el año 2013 y 2017 y pertenecientes a las fincas Las Peñasquillas y Huerto Ramírez. La extracción del DNA se ha realizado con el método de Kawasaki (1990). Un panel de 25 microsatélites específicos de la especie porcina fueron establecidos de acuerdo a las recomendaciones de la FAO y de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG). Se analizaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos se ha realizado mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador automático ABI 377XL (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas informáticos Genescan Analysis 3.1.2 y Genotyper 2.5, respectivamente.

Análisis estadístico

Se calcularon la Heterocigosidad esperada y observada y el número de alelos mediante la extensión MS Tools del programa EXCEL (Park, 2001). Se comparan los resultados con los encontrados en otras líneas/variedades del Ibérico:

Villalón, Dorado gaditano, Retinto, Entrepelado, Torbiscal, Lampiño y Manchado de Jabugo. Los animales de Manchado de Jabugo analizados en este proyecto se incorporan a la población de referencia de Manchado de Jabugo de la base de datos del Grupo de Investigación PAI-AGR-218 del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba. Además, se incluyeron razas comerciales como son: Duroc, Pietrain, Large White y Landrace. Se calcularon las distancias genéticas DA de Nei (Nei y cols., 1983) y se construye un árbol de distancias con el programa Populations (Langella, 1999). El árbol se dibuja mediante la utilización del programa Treeview (Page, 1996).

La asignación individual de cada animal a una raza se realiza utilizando el programa STRUCTURE (Pritchard y cols., 2000) que se basa en un método no supervisado que asume situación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias de los alelos, estimando para cada individuo incluido en el análisis la probabilidad de que pertenezca a cada una de las poblaciones consideradas ancestrales.

Esta probabilidad es en realidad la distribución posterior de cada porcentaje de genoma que proviene de las poblaciones ancestrales y es calculada aplicando un enfoque bayesiano utilizando técnicas MCMC (Monte Carlo Markow Chain). Este procedimiento presenta como ventajas más destacables el no requerir especificar las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales y el permitir tener en cuenta situaciones genéticas complejas, incluyendo el caso de muestras que provienen de mezcla entre varias poblaciones. Para realizar este estudio se utilizará la base de datos del Laboratorio de Genética molecular Aplicada que contiene todas las posibles poblaciones ancestrales que podrían haber contribuido en la conformación del genoma de los animales estudiados. Se realiza un análisis en los que se tienen en cuenta las siguientes líneas/variedades del Ibérico: Retinto del Andévalo, Villalón, Dorado gaditano, Retinto, Entrepelado, Torbiscal, Lampiño y Manchado de Jabugo. Se introducen también otras razas porcinas como Duroc, Pietrain, Large White, Landrace y un cruce comercial Landrace x Large White.

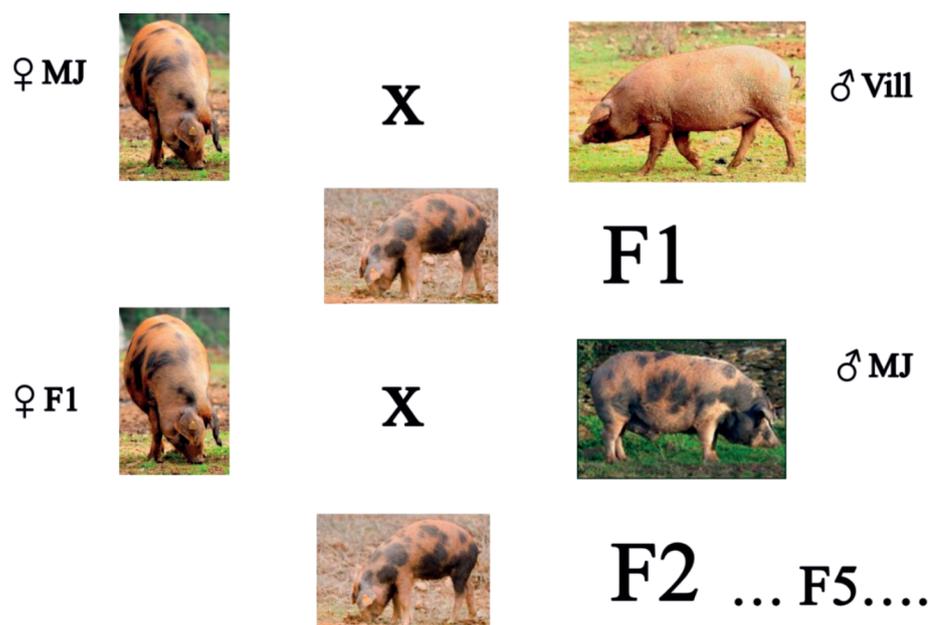


Figura 1. Cruzamientos entre los ejemplares puros de Manchado de Jabugo (MJ) y animales de la estirpe Villalón (Vill).

GENERACIÓN	% MANCHADO DE JABUGO	% VILLALÓN
F1	50	50
F2	75	25
F3	87,5	12,5
F4	93,75	6,25
F5	96,875	3,125
F6	98,4375	1,5625
F7	99,21875	0,78125
F8	99,609375	0,390625
F9	99,8046875	0,1953125

Tabla 1. Progresión esperada de la absorción por retrocruzamiento entre el Manchado de Jabugo y el Villalón.

Retrocruzamiento

Como se muestra en la **Figura 1**, se utilizaron los retrocruzamientos con la variedad Villalón, estirpe filogenéticamente próxima al Manchado de Jabugo para incrementar el tamaño real y efectivo de la población.

Si los cruzamientos se realizan según los resultados obtenidos en la asignación individual la progresión “teórica” o “esperada” de la absorción por retrocruzamiento en el pedigrí sería como se muestra en la Tabla 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Diputación de Huelva junto al Grupo PAIDI AGR218 de la Universidad de Córdoba vienen trabajando conjuntamente en la recuperación de una variedad tan importante en el sector porcino como es el Manchado de Jabugo. Uno de los objetivos perseguidos fue la mejora de la cantidad y calidad de información genealógica que será empleada posteriormente en la planificación de los apareamientos dirigidos. Desde la firma del proyecto de investigación, transcurridos ya 5 años, cada anualidad se ha ido recopilando toda la información genealógica generada y los

valores de asignación individual por los ejemplares analizados, teniendo así información que ha permitido planificar de forma objetiva los cruzamientos entre las dos variedades próximas genéticamente.

Un pedigrí bien estructurado y la inclusión permanente de los animales más próximos a la línea pura MJ garantizaran la supervivencia de la raza. En la Figura 2, se observa la evolución de la información molecular respecto a los coeficientes de asignación individual se refiere. Esta tendencia positiva es resultado de la aplicación correcta de los resultados en campo por parte de los ganaderos, produciéndose un éxito para la conservación de esta variedad tan emblemática del cerdo ibérico como es el Manchado de Jabugo.

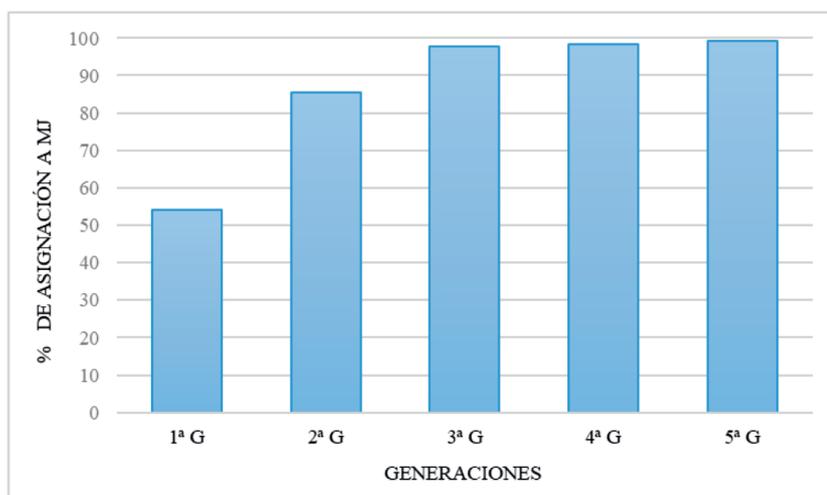


Figura 2. Evolución del porcentaje de asignación a Manchado de Jabugo (MJ).

POBLACIÓN	N	He	He SD	Ho	Ho SD	NMA	NMA SD
MJ x VILL (3-5ª generación)	47	0,4164	0,0533	0,3831	0,0151	3,65	2,46
MJ x VILL (1ª y 2ª generación)	23	0,4980	0,0561	0,5747	0,0219	3,52	2,02
Manchado Jabugo	41	0,3884	0,0514	0,3965	0,0157	3,38	1,64
Villalón	34	0,5186	0,0530	0,4380	0,0179	4,91	2,50
Retinto del Andévalo	105	0,2860	0,0497	0,2415	0,0089	3,35	1,56
Dorado Gaditano	7	0,5098	0,0552	0,5155	0,0394	3,35	1,34
Retinto	87	0,5626	0,0452	0,5278	0,0112	6,52	2,78
Entrepelado	73	0,5861	0,0476	0,5651	0,0122	6,39	2,37
Torbiscal	60	0,5496	0,0470	0,4854	0,0135	5,17	2,41
Lampiño	59	0,5971	0,0436	0,5553	0,0136	6,26	2,93
Duroc	70	0,5583	0,0386	0,5385	0,0124	4,22	1,81
Pietrain	46	0,6191	0,0321	0,6237	0,0151	5,30	1,58
Large White	29	0,5842	0,0351	0,5671	0,0194	4,70	1,55
Landrace	26	0,6056	0,0292	0,5737	0,0203	4,52	1,44

MJ x VILL: Manchado de Jabugo x Villalón

Tabla 2. Poblaciones estudiadas, tamaño de la muestra (N), Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho), Número medio de alelos (NMA) y sus desviaciones estándar (SD).

Por otro lado, no debemos olvidar el mantenimiento de la diversidad genética de la población, por ello cada año se analizaba y evaluaba estadísticamente los resultados moleculares obtenidos. En la Tabla 2 se muestran los principales indicadores de la diversidad genética en las distintas poblaciones incluidas en el estudio.

Para los 25 microsatélites analizados, un promedio de 4,66 alelos son detectados en los 707 individuos de las 14 poblaciones estudiadas, un valor más bajo (5,14) del observado por Gama y cols., (2013) aunque en el estudio se incluyen razas de toda la península Ibérica, sin embargo en línea con lo encontrado por Martínez y cols., (2000) en un estudio con todas las variedades el cerdo Ibérico. La media de la heterocigosidades esperada y observada en la estirpe MJ x Vill fueron de $0,457 \pm 0,05$ y $0,479 \pm 0,02$, respectivamente. Mientras que para el resto de las poblaciones fue de $0,530 \pm 0,04$ y $0,502 \pm 0,02$, respectivamente.

La variabilidad genética en los animales de la estirpe MJ x Vill de la 3ª a la 5ª generación es inferior a la encontrada en la línea pura Villalón (0,438), con niveles de Heterocigosidad observada inferiores (0,383). Sin embargo, son superiores a los hallados en el Manchado de Jabugo puro de la población de referencia. Con respecto al resto de las variedades y razas incluidas en el estudio, esta estirpe presenta valores inferiores a las demás líneas/variedades de cerdo Ibérico introducidas en el estudio, a excepción del Retinto del Andévalo que presentó una Ho de 0,242. Por otro lado, haciendo una comparativa entre los resultados observados en la estirpe MJ x Vill se aprecia un descenso de los niveles de variabilidad de los animales a partir de la 3ª generación con respecto a los animales de la 1ª y 2ª generación. Aunque los valores de variabilidad genética como el número de alelos y la heterocigosidad observada son bajos hay que considerar que se están comparando variedades de una raza, que por el solo efecto muestreo aportan un valor bajo, pero siempre en línea con lo observado en

otras razas locales de cerdos. El hecho que el retro cruce vuelva a valores bajos de estos parámetros era de esperarse en cuanto se va sustituyendo el genoma de la raza.

En la Figura 3 se observan las relaciones genéticas entre las poblaciones estudiadas, en ella se identifican dos clústeres. El primer clúster observado corresponde al grupo de las razas del tronco Ibérico que comparten un origen común y su distribución geográficamente cerca, mientras en el otro cluster se ubican las razas comerciales. Dentro del grupo de los Ibéricos en este dendrograma se observa como la estirpe MJ x Vill ocupa una posición muy próxima a la línea pura Manchado de Jabugo, alejándose de la otra línea de la que procede (Villalón).



Figura 3. Árbol de distancias genéticas entre las 14 poblaciones porcinas.

Como era de esperarse, el Manchado de Jabugo y su cruce con la variedad Villalón se sitúan en la misma rama del árbol a una distancia genética muy baja, pero el dato más importante que refleja este análisis es que todos los individuos utilizados convergen dentro del agrupamiento de las variedades ibéricas subrayando su pureza genética, entendida como ausencia de cruce con animales de razas mejorantes (Duroc, etc.).

ancestrales inferidas fueron $K=2$ hasta el $K=15$ con un total de 10 repeticiones para cada valor de K . Utilizando la prueba de Evano y cols., (2005) se determinó que el $K=6$ es el número más probable de poblaciones ancestrales que contribuyen a la variabilidad genética observada en las 14 poblaciones observadas (Figura 4). Se muestran en la Figura 4, los animales de la estirpe MJ x Vill se agrupan junto a los Manchados de Jabugo puros y solo algunos animales de la primera y segunda generación muestran signos de los cruces de las variedades Manchado de Jabugo (en naranja) y Villalón (amarillo), aunque estos individuos muestran diversas proporciones de ambas líneas (Tabla 3).

El enfoque Bayesiano implementado por el programa STRUCTURE fue usado para estimar el número más probable de poblaciones subyacentes a la diversidad genética observada (Gama y cols., 2013). El número de poblaciones

Por otro lado, algunos animales están compuestos por líneas de color verde (Duroc) y Azul (Pietrain). Esto puede deberse a la presencia de animales que contienen un porcentaje de genoma

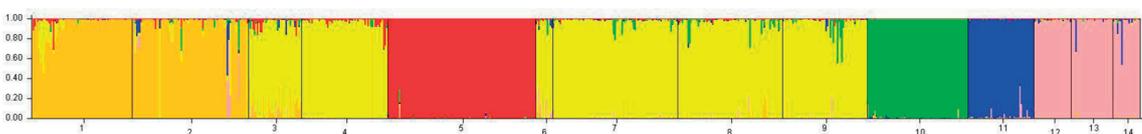


Figura 4. Representación gráfica de los resultados del análisis de la estructura genética de 14 poblaciones porcinas (1, Estirpe Manchado x Villalón; 2, Manchado de Jabugo; 3, Villalón; 4, Torbiscal; 5, Retinto del Andévalo; 6, Dorado gaditano; 7, Retinto; 8, Entrepelado; 9, Lampiño; 10, Duroc; 11, Pietrain; 12, Landrace; 13, LargeWhite y 14 Landrace x Large White).

Generaciones	Media	Mínimo	Máximo
1 ^a	54,11	4,30	91,60
2 ^a	85,33	27,90	98,60
3 ^a	97,87	88,40	99,60
4 ^a	98,40	91,60	99,40
5 ^a	99,28	99,10	99,50

Tabla 3. Resultados de asignación individual de los animales de la estirpe Manchado de Jabugo x Villalón.

de estas razas ocasionado probablemente a un cruce lejano. Por lo tanto, esta herramienta no solo nos permite monitorear la composición genómica del retrocruce sino también a detectar individuos cuya “pureza” genética obliga a una utilización más atenta en el plan de conservación del MJ.

asignan a Manchado de Jabugo con valores similares a los presentados por los animales Manchado de Jabugo puros. Lo mismo sucede en los animales de la 4^a y 5^a generación: genéticamente pueden considerarse animales Manchado de Jabugo puros.

Los valores de asignación individual, expresados en porcentaje, de cada uno de los animales analizados se encuentran en la Tabla 3. Los animales de la primera generación presentan valores muy dispares de manera que algunos se asignan a la variedad Manchado de Jabugo con valores elevados (91,60%) mientras que otros presentan valores muy bajos (4,30%). En la segunda generación los valores son en general más elevados, aunque sigue habiendo animales con porcentajes de asignación reducidos. Sin embargo, los animales de la tercera generación de retrocruzamientos se

Estos mismos resultados de forma gráfica se presentan en la Figura 5. Se observa cómo los valores de asignación individual van aumentando y se van estabilizando, alcanzándose porcentajes próximos al 100%.

CONCLUSIONES

Estos resultados muestran que los animales Manchado de Jabugo x Villalón sometidos a retrocruces con Manchado de Jabugo se podrían integrar en la población pura de Manchado de Jabugo a partir de la tercera generación. Con el desarrollo de este proyecto se ha conseguido aumentar el tamaño real y efectivo de la población, garantizando su supervivencia y minimizando al máximo su erosión genética.

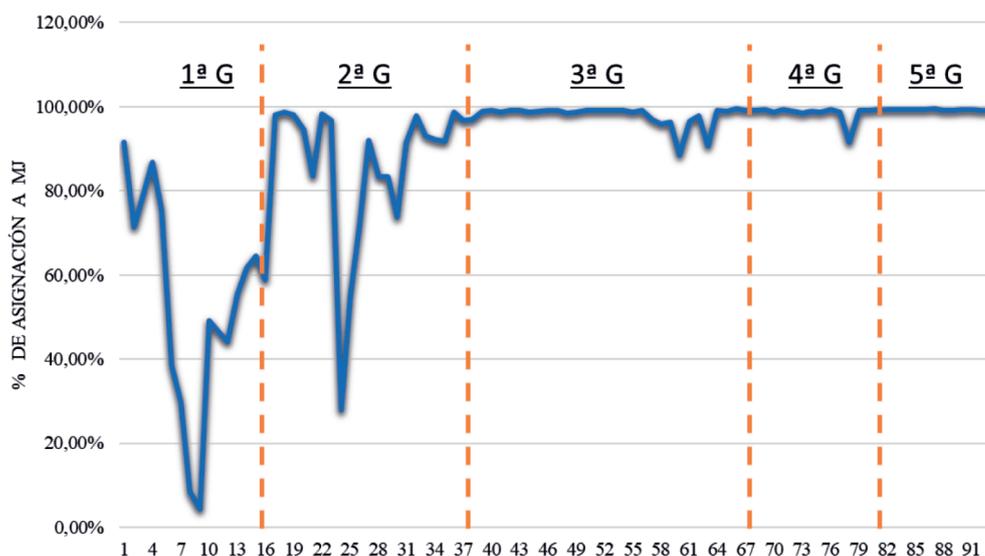


Figura 5. Representación gráfica de los resultados de asignación individual de los animales de la estirpe Manchado de Jabugo x Villalón.

BIBLIOGRAFÍA

Clemente I., Membrillo A., Azor P., Dorado G., Rodero A. & Molina A. (2006) Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino ibérico: una propuesta integradora. *Sólo Cerdo Ibérico*, 7-23.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-20.

Forero J. (1999) Estudio comparativo de cinco estirpes de cerdo Ibérico. *Excma. Diputación Provincial de Huelva*.

Gama L.T., Martínez A.M., Carolino I., Landi V., Delgado J.V., Vicente A.A., Vega-Pla J.L., Cortés O. & Sousa C.O. (2013) Genetic

structure, relationships and admixture with wild relatives in native pig breeds from Iberia and its islands. *Genetics Selection Evolution* 45, 18.

Kawasaki E. (1990) Sample preparation from blood, cells and other fluids. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 146-52. Academic Press Inc., New York.

Langella O. (1999) Populations version 1.2. 31. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). Available:

<http://www.bioinformatics.org/download.php?fileid=430>.

Martinez A., Delgado J., Rodero A. & Vega-Pla J. (2000) Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics* 31, 295-301.

Nei M., Tajima F. & Tateno Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-70.

Page R.D. (1996) "TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers". *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-8.

Park S. (2001) The Excel microsatellite toolkit. *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection*.

Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-59.

www.agrodiariohuelva.es (2016) El manchado de Jabugo se salva en Huerto Ramírez gracias al Villalón.



FABRICACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS PARA TODO TIPO DE INSTALACIONES GANADERAS



GER® Climatización Ganadera

Equipamiento necesario para óptimas condiciones en el interior de la nave



Granjas Llave en Mano

Realizamos estudios personalizados para dar soluciones tecnológicas eficientes

