

G. Dorado<sup>1</sup>, A. Molina<sup>2</sup>, I. Clemente<sup>2</sup>, A. Membrillo<sup>2</sup>,  
P. J. Azor<sup>2</sup>, F. Peña<sup>3</sup>, M. Valera<sup>4</sup>, A. Rodero<sup>2</sup>, P. Cañuelo<sup>5</sup>,  
I. Plasencia<sup>5</sup>, J. C. Fernández<sup>5</sup>, F. J. Ambrona<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17,  
14071 Córdoba, email: bb1dopeg@uco.es;

<sup>2</sup> Dep. Genética, Universidad de Córdoba. Campus Rabanales Ed. C5,  
e-mail: ge1moala@uco.es

<sup>3</sup> Dep. Producción Animal, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba.

<sup>4</sup> Dep. Ciencias Agroforestales, EUITA, Universidad de Sevilla.

<sup>5</sup> Dpto. Técnico de la Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino  
Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico Puro(AECERIBER).



Asociación Española de Criadores  
de Ganado Porcino Selecto del Tronco  
Ibérico (AECERIBER)

## Identificación y trazabilidad del cerdo ibérico y productos derivados mediante técnicas genómicas

### INTRODUCCION

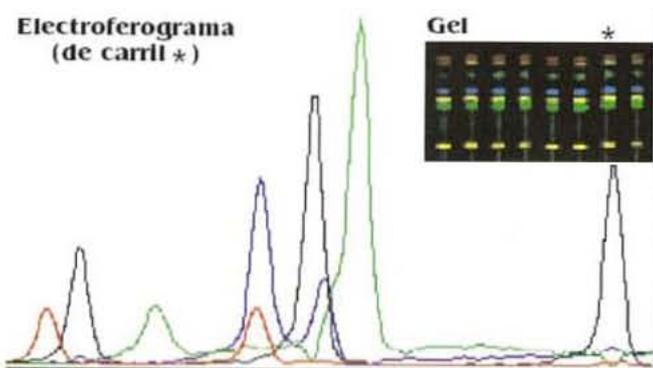
El pasado mes de junio tuvo lugar la firma de un convenio de colaboración entre la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación y la Universidad de Córdoba para la realización de un **"estudio genómico del porcino ibérico que permita la identificación de secuencias génicas distintivas para la catalogación, certificación del origen, trazabilidad y control de calidad"**. Este proyecto cuya duración es de 3 años está siendo desarrollado por un equipo de trabajo multidisciplinar constituido por investigadores del campo de la etnología y la producción animal, la genética, la genómica, la bioquímica y biología molecular y la bioinformática, pertenecientes a los grupos de investigación **CTS-413** (*"Sistema endocrino de la vitamina D, biotecnología y envejecimiento"*, del **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**), **AGR-158** (*"Esquemas de selección de razas autóctonas, caracterización y conservación de recursos genéticos animales y de sus sistemas productivos tradicionales. Genética y citogenética aplicada y molecular"*, del **Departamento de Genética**) y **AGR-134** (*"Conservación, caracterización y mejora de las razas en peligro de extinción"*, del **Departamento de Producción Animal**). Posteriormente y como complemento a éste se firmó un convenio Específico entre el anterior equipo y la **Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico Puro (AECERIBER)**.

Desde siempre el ser humano ha intentado clasificar el mundo natural que le rodea, identificando entidades biológicas (virusoides, viroides y virus) y seres vivos

(microorganismos, plantas y animales). Esta identificación en el caso de los animales domésticos se realizó inicialmente mediante caracteres etnológicos, empleando criterios morfológicos, fanerópticos, etc. Los desarrollos en bioquímica y genética permitieron añadir los polimorfismos proteico-enzimáticos, que detectan diferencias en las proteínas de los distintos individuos (el caso más conocido son los grupos sanguíneos). Del mismo modo, el desarrollo de la inmunología posibilitó la identificación mediante anticuerpos y reacciones acopladas. Posteriormente, los polimorfismos genéticos permitieron el desarrollo de herramientas de identificación muy poderosas, capaces de detectar diferencias en secuencias de ácidos nucleicos; tanto para los genes que codifican la información para sintetizar proteínas (Fig. 1), así como diversas moléculas de DNA que no se traducen a proteínas (como los microsátélites).

Se llegó así al desarrollo de los denominados marcadores moleculares de proteínas y de DNA, a los cuales nuestros grupos de investigación han aportado numerosas secuencias y marcadores (publicados en GenBank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>). Estos marcadores moleculares de DNA representan hoy día el método de identificación más utilizado, conociéndose popularmente como "la prueba de DNA". Se trata de técnicas en las que los grupos responsables de este estudio comenzamos a trabajar hace más de 25 años, habiendo estudiado durante todo este tiempo tanto entidades biológicas (virusoides, viroides y virus), como seres vivos (microorganismos, plantas y animales). Esta dilatada experiencia se ha visto avalada por numerosos proyectos, convenios y publica-

**Figura 1. Cuantificación de la expresión génica mediante GeneScan. Se muestra el electroferograma fluorescente correspondiente a un carril del gel**



ciones de prestigio, en el campo de la etnología, genética, genómica, bioquímica, biología molecular y la bioinformática. Asimismo, hemos desarrollado marcadores moleculares de DNA para la identificación y diagnóstico precoz de diversas patologías y enfermedades en plantas y animales (incluido el hombre). De manera específica en el caso del cerdo ibérico, gracias a sendos convenios con AECERIBER y la Dirección General de Ganadería del MAPYA, y la participación en el proyecto europeo "Gen Banking Pig Resources", se ha caracterizado desde el punto de vista genético a las diferentes estirpes reconocidas del cerdo ibérico y se han realizado estudios de diferenciación genética con otras razas (p.e., Martínez et al, 2000<sup>a,b</sup>). Del mismo modo, otros investigadores también han contribuido con trabajos relevantes al conocimiento genético del tronco ibérico (p.e. Alves et al, 2003; Toro et al, 2003).

El objetivo planteado en los Convenios de colaboración de la Universidad de Córdoba con la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y con AECERIBER, pretende ir mucho más allá, al tratarse de un estudio genómico del cerdo ibérico que permita el desarrollo de herramientas genómicas específicas para la "identificación de secuencias génicas distintivas para la catalogación, certificación del origen, trazabilidad y control de calidad".

Se trata por tanto de una aproximación totalmente innovadora en nuestro país, que incluye metodologías genómicas, genéticas, bioquímicas (Leal et al, 1995) y bioinformáticas (Hernández et al, 2000), alguna de las cuales específicamente desarrollada por componentes de nuestro grupo de trabajo para la optimización de los distintos Proyectos Genoma, incluido el propio Proyecto Genoma Humano (Lario et al, 1997)<sup>1</sup>.

Si bien el objetivo principal de proyecto es el desarrollo de una herramienta fiable, rápida y barata de identificación genética del cerdo ibérico y sus productos derivados, tendrá también aplicación directa en la caracterización y catalogación racial, identificación individual y tra-

zabilidad de los productos del mismo, certificación y control de fraudes al consumidor, identificación de secuencias relacionadas con la resistencia a enfermedades, así como desarrollo de marcadores genéticos para la mejora genética porcina entre otras muchas.

Por lo tanto se trata de caracterizar genómicamente a las diferentes poblaciones porcinas del tronco ibérico, buscando la identificación de secuencias genéticas distintas y únicas de las razas y estirpes, para poder acometer con garantías de éxito programas de identificación, trazabilidad, control de calidad y certificación del origen de los productos derivados.

**Foto 1. Lote de Cerdos de D. José Martí Martí, de Valencia**



Primer Premio y Campeonato.  
Concurso Nacional de Ganados, 1930.

El sector del ganado porcino ibérico representa un capítulo importante en la economía del sector ganadero nacional. En España se han producido 2'7 millones de piezas de jamones curados ibéricos y 1'9 millones de piezas de paletas, en el año 2003, de las cuales 950.000 tenían denominación de origen. En el año 2004 se exportaron mil toneladas de jamones y paletas de cerdo ibérico por un valor de 50 millones de euros. Sin olvidar que nos referimos a una materia prima que proporciona al mercado unos productos cárnicos de la más alta calidad, única en el mundo. En el año 2005 se ha asistido a un relanzamiento de estas exportaciones, principalmente a mercados muy exigentes como el estadounidense o el japonés.

Además, al estar unida su cría a la explotación de la dehesa del sureste español, supone un importantísimo valor añadido desde el punto de vista de protección medioambiental a un medio con más de un millón y medio de hectáreas.

Su importancia se ha traducido en distintas disposiciones ministeriales que intentan regularizar y normalizar la producción y comercialización de sus productos. Sin embargo, dichas producciones y comercializaciones no están exentas de problemas, como los referentes a su normalización, homogenización, fraudes e imitaciones, o el uso indiscriminado de animales procedentes de diversos

<sup>1</sup> Puestas a disposición de todos los investigadores, al no haber sido patentadas.

cruces con bajo porcentaje de sangre del tronco ibérico.

Hay que resaltar que el problema fundamental radica en la discriminación entre animales puros y los distintos tipos de cruces. La "Norma de Calidad", Real Decreto 1083/2001 de 5 de octubre y posteriores modificaciones (R.D. 144/2003 y R.D. 1781/2004), admite como productos que se puedan cobijar bajo la denominación de ibérico, a los obtenidos de animales ibéricos puros y del cruce de reproductoras ibéricas puras con machos de la raza Duroc o Duroc-Jersey, pudiendo ser éstos últimos a su vez tanto puros como cruzados con ibérico; obteniéndose por tanto los tipos comerciales "Puro o Selecto" (animales 100% ibéricos) e "Ibérico" (animales cruzados con Duroc con un mínimo del "50%" de sangre ibérica, es decir, cruces al 50% y 75%). En cualquier caso, es interesante de cara al mercado, poder identificar de manera fehaciente a qué tipo corresponde determinado producto, para lo que resultará de enorme utilidad la herramienta que estamos desarrollando.

Por otra parte hay que recordar que la raza porcina ibérica está constituida por un conjunto de estirpes cuyas diferencias genéticas han sido estudiadas por nosotros<sup>2</sup>, y que es necesario tener en cuenta para caracterizar genéticamente los animales y diferenciarlos de otras razas o cruces. Aunque se han distinguido por algunos autores hasta nueve estirpes distintas, nuestro trabajo utilizando el polimorfismo de microsatélites de ADN demostró que solamente las variedades Lampiño y Torbiscal quedaban bien definidas, siendo poco claras las distancias entre otras estirpes (Retinto Extremeño, Entrepelado y Silvela), y quedado más dudosa la situación de los animales Manchado de Jabugo, Mamellado y Dorado Gaditano.

Resulta por tanto esencial identificar y diferenciar dichas razas y variedades del tronco porcino ibérico de forma inequívoca, para poder llevar a cabo programas eficientes de identificación, trazabilidad, control de calidad y certificación de la denominación de origen de los productos derivados.

La identificación clásica fenotípica (parámetros morfoestructurales o morfométricos) y genética (marcadores microsatélites) son herramientas útiles para llevar a cabo dicha catalogación en la mayoría de los casos, pero no resultan suficientes para realizar una identificación concluyente de los cruces y generalmente no son de aplicación en los productos derivados.

En los trabajos realizados con anterioridad por los Grupos de Investigación proponentes<sup>3,4,5</sup>, y otros grupos especialistas en Porcino Ibérico, no se llegó a establecer de forma concluyente un método fiable de identificación de las diferentes razas y variedades de porcino mediante

marcadores moleculares como PCR-SSCP, PCR-RFLP, RAPD o mediante microsatélites. Con respecto a este último marcador queremos reseñar que nuestro Grupo no sólo los ha puesto a punto en el caso del cerdo ibérico<sup>6</sup>, sino que los hemos clonado y propuesto para algunas especies como caprino<sup>7</sup> y equino<sup>8</sup>.

Es por ello muy importante y urgente la identificación de secuencias génicas distintivas de las razas y variedades del tronco ibérico involucradas en la elaboración de productos comercializados con el distintivo "ibérico", y que asimismo permitan la identificación, trazabilidad y certificación del origen de sus productos derivados.

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente proyecto son los siguientes:

1. Obtener secuencias genómicas de diferentes razas relacionadas con los productos ibéricos y de las principales variedades del tronco ibérico de interés, mediante la comparación bioinformática de las secuencias genómicas.
2. Obtener información del grado de polimorfismo entre las razas y estirpes estudiadas y dentro de ellas.
3. Desarrollar un sistema inequívoco de caracterización molecular e identificación de cada una de dichas razas y estirpes porcinas (basado en secuencias genómicas), mediante el empleo de marcadores moleculares contrastados, como son deleciones/inserciones y SNPs (Fig. 2).
4. Proponer una herramienta genómica molecular de primer orden para la identificación, trazabilidad, control de calidad y certificación de la denominación de origen de los productos derivados.
5. Desarrollar un sistema de multiplexado y mezclas de DNA ("DNA pooling"), recientemente desarrollado en nuestros laboratorios (Quesada et al, 2004), que reduce muy significativamente el tiempo y costo necesario para determinar las frecuencias alélicas de grandes poblaciones o mezclas de DNA en productos derivados mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR) (Fig. 3).
6. Posibilitar que cualquier animal o producto chacinero de él derivado pueda ser identificado como puro, o como del tipo de cruce del que derive, con lo que se clarificará el mercado, permitiendo de manera efectiva el empleo de la mención de ibérico, puro o selecto en el etiquetado, contribuyendo de esta forma a una leal y correcta competencia en el mercado y a la defensa de los derechos del consumidor.

Por lo indicado se infiere que el trabajo que se está llevando a cabo supone el desarrollo, innovación y puesta a punto de distintas técnicas, totalmente novedosas, que estarán a disposición del sector y la administración, una vez sean desarrolladas y validadas.

<sup>2</sup> Animal Genetics 2000, 31: 295; Arch Zootec 2000, 49: 45; Book Abstract 49th Meeting of the EAAP 2000, Polonia.

<sup>3</sup> Convenio de colaboración Científico-Técnico entre AECERIBER y la Universidad de Córdoba para la caracterización morfológica y productiva de las variedades del "Tronco Ibérico".

<sup>4</sup> Convenio de Colaboración entre la Dirección General de Producciones y Mercados Ganaderos y la Universidad de Córdoba para la caracterización genética de poblaciones minoritarias diferenciadas dentro de la raza porcina ibérica.

<sup>5</sup> Proyecto "European Gene Banking for Pig Genetic Resources".

<sup>6</sup> Animal Genetics 2000, 31: 295; Arch Zootec 2000, 49: 45; Book Abstract 49th Meeting of the EAAP 2000, Polonia.

<sup>7</sup> GenBank accession U80587 a U80595 enBank accession U36493 a U36498.

Fig. 2. Polimorfismos de base única (SNPs). Se muestra el proceso de detección mediante ddNTPs y marcaje fluorescente

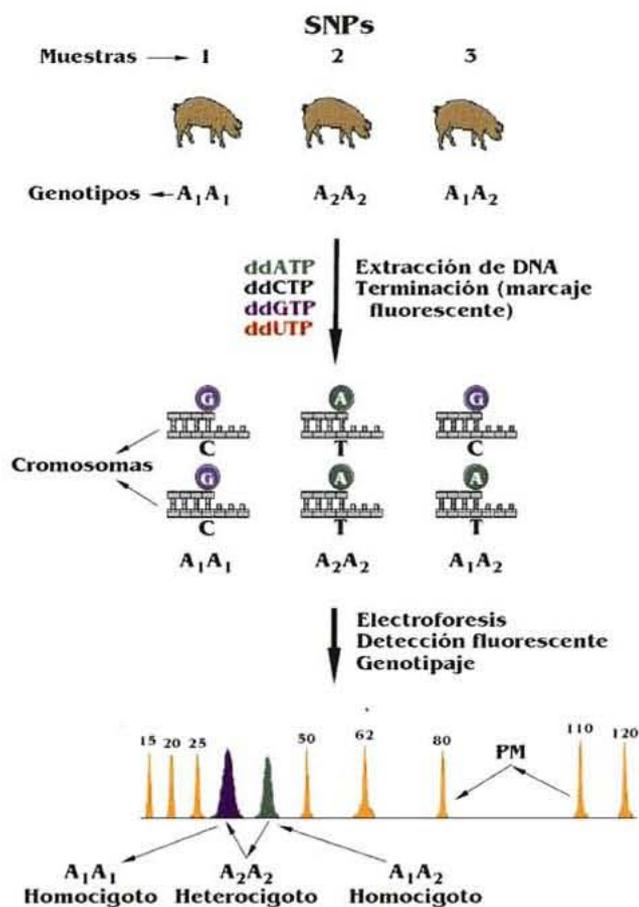
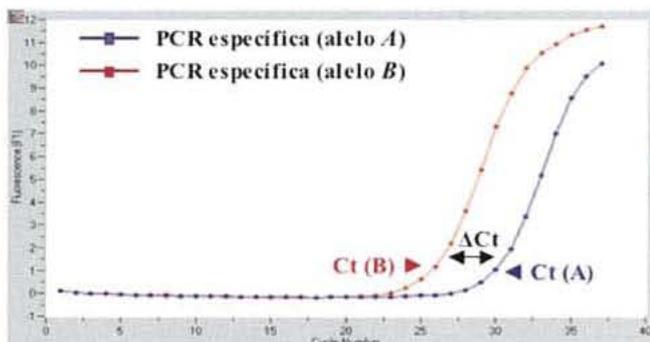


Fig. 3. PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR). Se muestran las curvas de amplificación



Todo ello redundará en beneficio de los ganaderos y de las industrias del sector del cerdo ibérico. Éste es un sector que, con gran esfuerzo, procura mantener en pureza la raza y está necesitado de técnicas objetivas que identifique con claridad la calidad de los productos derivados.

Para ello en este proyecto de Genómica del Cerdo Ibérico se llevará a cabo la clonación de DNA genómico mediante la construcción de las correspondientes genote-

Foto 2. Cerdo Cebado, de Doña Isabel Figueroa, viuda de Leyún. Primer Premio Concurso Nacional de Ganados, 1930.



cas, secuenciación masiva redundante para evitar errores y análisis bioinformático de las secuencias generadas. Ello permitirá el diseño de cebadores de PCR para el desarrollo de marcadores y sondas moleculares específicos de las diferentes estirpes de cerdo ibérico y de las razas que pudieran estar siendo utilizadas en la obtención de productos derivados del cerdo ibérico.

## PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA

El proyecto se está realizando según el siguiente plan de trabajo:

### 1ª Fase: Elección de los donantes de DNA y preparación de las muestras

- Elección en base al historial de la ganadería y al análisis del pedigrí de los candidatos de un animal representante de cada una de las cuatro estirpes principales del cerdo ibérico (Negro Entrepelado, Torbiscal, Retinto Extremeño y Negro Lampiño). Asimismo, se

Foto 3. Obtención de muestra de sangre a un ejemplar de la estirpe Negro Entrepelapo por parte del personal de este proyecto. Realizado en septiembre de 2005



utilizarán diversas razas de contraste (especialmente el Duroc).

- Obtención de muestras biológicas, extracción y purificación del DNA.

### 2ª Fase: Construcción de genotecas, subclonación y secuenciación

- Para cada una de las razas y estirpes estudiadas se construirá una biblioteca ("library") genómica con fragmentos insertados en vectores.
- Secuenciación masiva redundante hasta una redundancia mínima de seis veces (6X) para cada clon.
- Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

### 3ª Fase: Identificación de secuencias génicas distintivas y desarrollo de Marcadores Moleculares

- Identificación de secuencias génicas distintivas (marcadores moleculares específicos) de cada una de las razas y estirpes.
- Desarrollo de sistemas de identificación basados en los marcadores moleculares de DNA previamente descritos.

### 4ª Fase: Contraste, diseño y optimización del sistema de multiplexado de rutina

- Elección de muestras de las diferentes estirpes, razas y sus cruces y obtención de material biológico para el aislamiento del DNA.
- Amplificación mediante PCR y secuenciación.
- Análisis bioinformático y elección de los marcadores.
- Descripción de un sistema de PCR simple y de multiplexado y mezclas de DNA ("DNA pooling") basado en PCR para estudios poblacionales masivos.
- Estudio poblacional de las frecuencias obtenidas.
- Desarrollo del protocolo de actuaciones en campo propuesto y emisión del correspondiente informe.

Brevemente, la metodología a seguir será la siguiente:

- Purificación de DNA mediante kits comerciales (Qiagen) y cuantificación espectrofotométrica.
- Construcción de genotecas usando el vector *λ*-DASH II de Stratagene y el cósmido *pHC79* de Roche y amplificación del DNA clonado en cada clon lambda mediante la técnica de PCR de larga distancia ("long PCR"), usando el kit "LA-PCR" de Takara Shuzo.
- Secuenciación masiva redundante ("shotgun") hasta una redundancia mínima de seis veces (6X) para cada clon según técnica desarrollada por el Grupo CTS-413.
- Amplificación mediante PCR y secuenciación de los productos (Fig. 4).
- Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas con herramientas específicas para la identificación de secuencias y genes, Alineamiento y comparación de

secuencias, genes y genomas seleccionados de las diferentes razas y variedades y detección de secuencias específicas.

- Experimentos de reconstrucción (Fig. 5)
- Diseño de sistema de PCR simple y de multiplexado y mezclas de DNA ("DNA pooling") basado en PCR (Fig. 6).

Fig. 4. Amplificación de productos subclonados. Se muestra la separación de los mismos en gel de agarosa

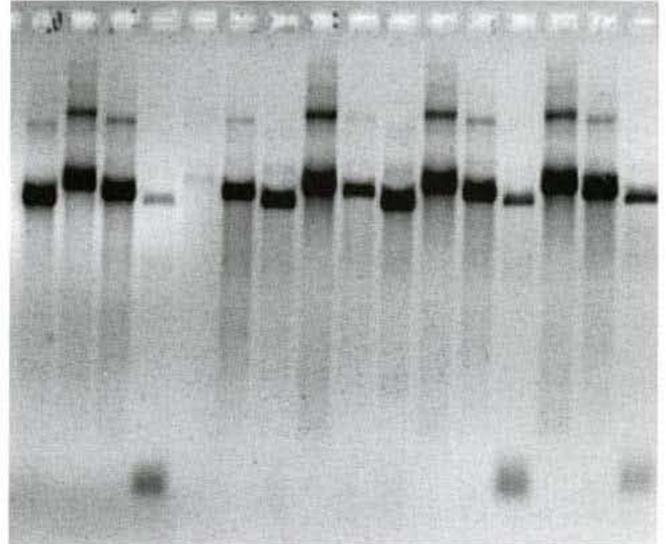


Fig. 5. Experimento de reconstrucción. Se muestra la amplificación de cantidades decrecientes de producto

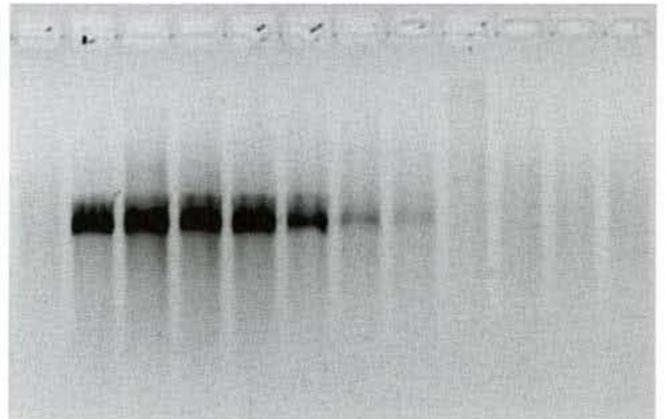
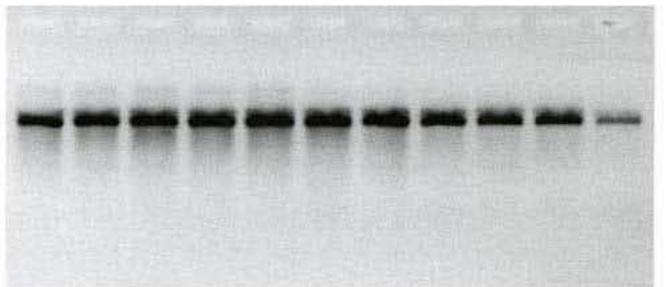


Fig. 6. Amplificación mediante PCR. Se muestra la separación de los productos en gel de agarosa



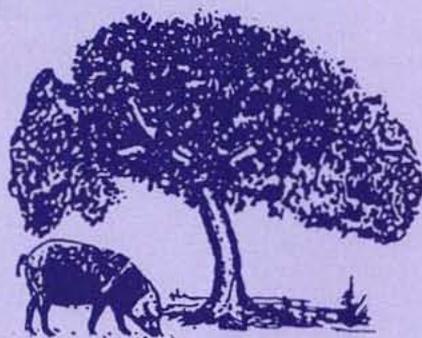
## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no sería posible sin la financiación de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Nuestro especial reconocimiento al apoyo de D. Manuel Sánchez Jurado, Director General de la Producción Agraria y D. Fernando Gómez Torre, Jefe del Servicio de Producciones Ganaderas, de dicha Consejería. Queremos agradecer el trabajo de los técnicos de AECERIBER y la colaboración de los ganaderos de dicha Asociación. Asimismo, agradecemos la ayuda recibida por parte de los Grupos de Investigación PAI CTS-413, AGR-158 y AGR-134 de la Junta de Andalucía.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves E, Óvilo C, Rodríguez MC, Silió L (2003): Mitochondrial DNA sequence variations and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genet* 34: 319-324.
- Asociación General de Ganaderos del Reino (1930). Memoria del VI Concurso Nacional de Ganados. Madrid.
- Hernandez P, Martin A, Dorado (2000): The BLAST algorithms: practical application in molecular cloning, marker-assisted selection (MAS) and introgression of wheat. *DNA Seq* 11: 339-347.
- Lario A, Gonzalez A, Dorado G (1997): Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Anal Biochem* 247: 30-33.
- Leal JF, Lopez-Barea J, Dorado G (1995): T-vector cloning and high performance PCR with *SuperTth* from *Thermus thermophilus*. *Genet Anal* 12: 119-121.
- Martínez AM, Delgado JV, Rodero A, Vega-Pla JL (2000a): Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genet* 31: 295-301.
- Martínez AM, Rodero A, Vega-Pla JL (2000b): Estudio con microsatélites de las principales variedades de ganado porcino del tronco ibérico. *Arch Zootec* 49: 185-186.
- Quesada JM, Casado A, Diaz C, Barrios L, Cuenca-Acevedo R, Dorado G (2004): Allele-frequency determination of BsmI and FokI polymorphisms of the vdr gene by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 209-214.
- Toro, MA, Alves E, Barragán C, Castellano C, Fabuel E, Fernández A, Oslo C, Rodríguez MC (2003): Use of molecular genetic techniques: a case study on the Iberian pig. En Simm G. (ed): "Farm Animal Genetic Resources". Capítulo 30: 281-293. Nottingham University Press - Blackwell Publishing (Ames, EUA).

## Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico (AECERIBER)



**AECERIBER**

**Avda. Antonio Chacón, 7 - 1º B**

**06300 Zafra (Badajoz)**

**Teléf.: 924 55 49 83**

**Fax: 924 55 37 03**

**E-mail: [aeceriber@infonegocio.com](mailto:aeceriber@infonegocio.com)**