

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE UN CHIP DE ADN DE MEDIA DENSIDAD DE POBLACIONES PORCINAS TOLERANTES FRENTE A LA INFECCIÓN CON NUEVAS VARIANTES DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

GENETIC CHARACTERIZATION OF PORCINE POPULATIONS TOLERANT TO NEW VARIANTS OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS USING A MEDIUM-DENSITY DNA CHIP

Cañón J.¹, Gallardo C.², Dunner S.¹, Sevane N.¹, Cortés O.¹, Bishop R.⁴, Arias M.², Sánchez-Vizcaíno J.M.³, Carleos C.⁵

¹Dpto. de Producción Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España

²Centro de Investigación en Sanidad Animal-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), Ministerio de Economía y Competitividad, Valdeolmos, 28130 Madrid, España

³Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España

⁴International Livestock Research Institute (ILRI), PO Box 30709, Nairobi 00100, Kenya

⁵Dpto. de Estadística e Investigación Operativa. Universidad de Oviedo, 33007 Oviedo, España

Keywords:

African swine fever
Genetic tolerance
Genetic characterization
African wild suidae

Palabras clave:

Peste porcina africana
Tolerancia genética
Caracterización genética
Suidos salvajes africanos

Abstract

Recent studies in East Africa have revealed a complex epidemiological situation in local breeds of domestic pig that seems to show greater tolerance to the African swine fever virus (ASFV) which favors the endemic nature of the disease in these regions, allowing its dispersion. This tolerance may have higher relation with the genetic characteristics of the animal than with the viral structure itself. In this work, the genetic characterization of local African pig populations, both domestic and wild, that may be related to the ASF disease tolerance was carried out. The whole set of samples included 112 animals belonging to different European breeds (large white, berkshire, landrace, middle white), 22 hybrids of European breeds sampled in Kenya and Tanzania, 32 animals from local African populations with a proportion of other breeds, and 22 animals from the wild populations *Phacochoerus africanus* (17) and *Potamochoerus larvatus* (5). Of them 103 animals were genotyped with the Porcine SNP60 BeadChip v.2 (Illumina, San Diego, CA, USA) and 85 with the Porcine SNP60 BeadChip v.1 (Illumina, San Diego, CA, USA). For a preliminary analysis of the relative positioning of the populations included in the analysis, the selection of a representative set of markers with reduced level of linkage disequilibrium (LD) was performed using frames of 50 SNPs, leaving 5 SNPs between frames, and selecting those with < 0.01 LD. This selection process resulted on 538 SNPs that were used to obtain information about the structure of the analyzed populations. A limited usefulness of the Porcine SNP60 BeadChip on wild populations was proved owed to its low discrimination power. Hence, in a second stage we genotyped 79 animals selected among the 103 analyzed with the Porcine SNP60 BeadChip v.2 using a set of 28 microsatellite markers, obtaining as result the failure to detect hybridization between local and wild African suids. The identification of three consensus regions of homozygosity between resistant populations and wild suids, located in two chromosomes, may allow seeking out genes with a relevant role in the higher tolerance of the domestic pig populations to ASFV.

Resumen

Estudios recientes en el este de África han puesto de manifiesto una situación epidemiológica compleja en razas locales de cerdo doméstico que parecen mostrar una mayor tolerancia al virus de la peste porcina africana (VPPA), lo que favorece el carácter endémico de la enfermedad en estas regiones permitiendo su diseminación. Esta tolerancia podría tener una mayor relación con características genéticas del animal que con la propia

estructura viral. En este trabajo se llevó a cabo la caracterización genética de poblaciones porcinas africanas locales, domésticas y salvajes, que pudieran estar relacionadas con tolerancia a la enfermedad de la PPA. De los animales incluidos en el análisis, 112 pertenecían a diferentes razas europeas (large white, berkshire, landrace, middle white), 22 a híbridos de razas europeas muestreados en Kenia y Tanzania, 32 animales de poblaciones locales africanas con cierta proporción de otras razas europeas, y 22 animales de las poblaciones salvajes *Phacochoerus africanus* (17), y *Potamochoerus larvatus* (5). De ellos, 103 fueron genotipados mediante el *Porcine SNP60 BeadChip v.2* (Illumina, San Diego, CA, USA) y los 85 restantes mediante el *Porcine SNP60 BeadChip v.1* (Illumina, San Diego, CA, USA). Para un análisis preliminar del posicionamiento relativo de las poblaciones incluidas en el análisis, se procedió a la elección de un conjunto de marcadores representativos y con reducido nivel de desequilibrio de ligamiento utilizando ventanas de 50 SNPs, dejando 5 SNPs entre ventanas, y se seleccionaron aquellos que tenían un valor de LD < 0,01. Este proceso de selección proporcionó 538 SNPs que se utilizaron para obtener información sobre la estructura de las poblaciones analizadas. Se comprobó la escasa utilidad del *Porcine SNP60 BeadChip* en las especies salvajes debido a su reducida potencia de discriminación, por lo que se procedió en una segunda etapa a genotipar 79 animales seleccionados de entre los 103 anteriores con un conjunto de 28 marcadores de tipo microsatélite, obteniéndose como resultado la imposibilidad de poder detectar hibridación entre las poblaciones domésticas locales y los suidos salvajes africanos. La identificación de tres regiones de homocigosis (ROH) consenso entre las poblaciones tolerantes.c y las de suidos salvajes, ubicadas en dos cromosomas, puede permitir la búsqueda de genes que tengan un papel relevante en la mayor tolerancia de las poblaciones de cerdo doméstico al VPPA.

Introducción

La PPA fue descrita por primera vez en 1921 en Kenia, y desde entonces muchos países africanos, europeos y americanos se han visto afectados por brotes de mayor o menor duración, siendo actualmente endémica en más de 20 países del África subsahariana. La PPA es una enfermedad vírica con un enorme impacto socio-económico y, por esta razón, se incluye en la lista de obligada comunicación de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). En mayo de 2007 la PPA apareció de nuevo en Europa, concretamente en Georgia en la zona portuaria de Poti. La entrada del virus se relacionó con embarcaciones que transportaban carne o productos cárnicos contaminados procedentes de países del este de África. Desde 2007 la enfermedad se extendió a países vecinos como Armenia, Azerbaiyán y la Federación Rusa, produciendo la destrucción de más del 50% de la cabaña porcina (FAO 2009). Esto supone una gran preocupación para la UE por el aumento del riesgo de entrada y diseminación de la PPA a países miembros de la UE.

Los jabalíes europeos son más tolerantes a esta enfermedad, aunque presentan un patrón patológico y epidemiológico muy similar al de los cerdos domésticos (Sánchez-Vizcaíno, 2006). Por otro lado, las poblaciones de suidos salvajes africanos, fundamentalmente los facóqueros (warthog) (*Phacochoerus*), potamóqueros (bushpig) (*Potamochoerus*) e hilóqueros (*Hylochoerus*), aunque también pueden ser infectados por el virus de la PPA, sin embargo no manifiestan los síntomas clínicos, pero presentan bajos niveles de virus en los tejidos y en sangre que son difícilmente detectables, pudiendo actuar como reservorios del virus (De Tray, 1957, Plowright, 1981), contribuyendo al mantenimiento sostenido de la enfermedad y dificultando su erradicación del este y sur de África.

El primer contacto en África (Kenia) entre el cerdo doméstico y las especies salvajes, principalmente facóqueros, alrededor de 1920, coincide con el primer brote de PPA en cerdo doméstico, cuya exposición al virus resultaba en una letalidad próxima al 100% de los animales afectados (Costard et al, 2009). Sin embargo, actualmente, una proporción de animales de estas poblaciones locales parecen mostrar una mayor tolerancia a los efectos del virus de la PPA, sobreviviendo a la infección con escasos o nulos signos clínicos.

Por otro lado, se ha demostrado que los virus circulantes en el Cáucaso provienen de una única introducción y pertenecen al genotipo II relacionado con virus circulantes en países del este de África, y nunca detectados hasta ahora fuera del continente africano (Gallardo et al, 2009a, Rowlands et al., 2008). Es precisamente en regiones del este de África donde se ha identificado un comportamiento anómalo en las poblaciones locales infectadas. Este comportamiento está relacionado con una menor inducción de anticuerpos específicos frente al VPPA en paralelo con una alta incidencia de virus circulante, convirtiendo a estos animales en portadores asintomáticos, reservorios del virus que están favoreciendo su diseminación (Pérez-Filgueira et al., 2006; Gallardo et al., 2009b, 2011). Dichas poblaciones se encuentran más cercanas a las poblaciones de suidos salvajes que a las domésticas originalmente importadas de Europa a principios del siglo XX. Es en dichas razas locales donde

además se ha descrito una mayor tolerancia a la enfermedad, al contrario de lo que sucede con las razas europeas que son más susceptibles.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que esta mayor tolerancia de las poblaciones locales podría tener una mayor relación con características genéticas del animal, debido a una introgresión de genes procedentes de las poblaciones de suidos salvajes, que con la propia estructura viral. El objetivo será, por ello, analizar la estructura genética de poblaciones domésticas y salvajes locales, y poblaciones domésticas europeas para ver si es posible detectar la existencia de introgresión genética proveniente de las poblaciones de suidos salvajes. Una de las dificultades para llevar a cabo el trabajo mencionado es la ausencia de caracterización genética de las poblaciones porcinas locales africanas, lo cual impide conocer las características de la composición del genoma de los animales a los que se somete a desafío infeccioso. Europa y China constituyen las regiones más relevantes de domesticación de suidos, representando más del 70 % de la diversidad mundial (Scherf, 2000), y existen numerosos estudios de caracterización genética de sus poblaciones (San Critóbal et al., 2006; Megens et al., 2008). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la caracterización genética de poblaciones africanas de suidos, tanto domésticas como salvajes. Por otro lado, es bien conocido el flujo genético desde las poblaciones de suidos salvajes, que en Europa se ha mantenido hasta que las condiciones de alojamiento han dificultado o impedido dicho flujo (Zeuner, 1963). Sin embargo, en algunas regiones de África parece ser que la hipótesis adicional de una posible introgresión genética reciente y continua proveniente de alguna de las dos principales especies salvajes con las que se producen hibridaciones, warthog (*Phacochoerus africanus*); y bushpig (*Potamochoerus larvatus*), no sería descartable.

El objetivo de este trabajo es, por tanto, la caracterización genética de poblaciones domésticas y salvajes de suidos africanos, utilizando para ello información molecular desarrollada para el género *Sus*.

Material y métodos

Animales disponibles.

De los animales incluidos en el análisis, 85 pertenecían a diferentes razas europeas (large white, berkshire, landrace, y middle white), 49 individuos criados en África y pertenecientes a poblaciones con muy diferentes niveles de hibridación entre razas europeas muestreados en Kenia y Tanzania, 32 animales pertenecientes a poblaciones locales africanas con diferentes niveles de introgresión con otras razas de origen europeo, y 22 animales de las poblaciones salvajes *Phacochoerus africanus* (17), y *Potamochoerus larvatus* (5). Posteriormente, se eliminaron de los análisis tres facóqueros que se consideraron muestras erróneas mal identificadas.

De los 32 animales pertenecientes a poblaciones locales africanas, 29 fueron sometidos a un desafío infeccioso mediante inoculados por vía oro-nasal con 10 unidades hemoabsorbentes (UHA) del aislado del VPPA Ken05/K2 (genotipo X) obtenido en cerdo doméstico en Kenia en 2005. Además del seguimiento clínico y toma de temperatura diaria, se tomaron muestras de sangre completa y de suero de los animales a 0-3-7-10-14-21-29-36 días post-infección (dpi). Los animales fueron sacrificados, y tras la eutanasia, se llevó a cabo la necropsia reglada de cada uno de ellos y la toma de muestras de los órganos para los estudios virológicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales. Se tomaron muestras de bazo, nódulos linfáticos (renales, gastrohepáticos, mediastínicos, retrofaríngeos, mesentéricos e inguinales), pulmón, hígado, riñón, corazón y tejido linfoide asociado a mucosas (tonsila y estructuras linfoides del intestino). Estos 29 animales mostraron un claro retraso en la aparición de la enfermedad, un reducido nivel de efectos clínicos, baja seroprevalencia y reducida viremia y mortalidad. Concretamente, mostraron un cuadro subclínico con síntomas intermitentes y sin claros signos externos relacionados con la enfermedad, tales como: fiebre, anorexia, ataxia o cianosis. El porcentaje de supervivencia a los 21 dpi(s) fue del 93%, mientras que en los animales de razas europeas fue del 0% produciéndose la muerte del 100% de los animales inoculados entre los días 13 y 21 post inoculación. Finalmente, a los 30 dpi, 12 de los 29 animales de poblaciones locales (58,6%) continuaban vivos sin presentar síntomas claros asociados a la enfermedad. En concordancia con los datos clínicos observados, en las razas europeas el virus se pudo detectar en sangre entre los días 7 y 10 post inoculación, mientras que en las poblaciones locales africanas se detectó entre los días 14 y 21 post infección; incluso un animal de estas poblaciones no presentó viremia a lo largo de la infección.

Información molecular utilizada.

103 animales fueron genotipados mediante el *Porcine SNP60 BeadChip v.2* (Illumina, San Diego, CA, USA), y 85 habían sido genotipados previamente mediante el *Porcine SNP60 BeadChip v.1* (Illumina, San Diego, CA, USA) y proporcionados por Martin Groenen de la Universidad de Wageningen.

Por otra parte, 79 animales (32 de poblaciones locales africanas, 14 facóqueros, 5 pocamóqueros y 28 híbridos europeos) fueron genotipados para los 28 microsatélites de la tabla I.

Tabla I. Denominación de los microsatélites utilizados (*Name of the 28 microsatellites used*).

| Microsatélites | | | |
|----------------|--------|--------|-------|
| S0026 | SW2532 | SW2021 | S0178 |
| S0355 | S0225 | S0002 | S0226 |
| SW1492 | S0386 | S0155 | S0228 |
| SW2496 | SW461 | SW240 | IGF1 |
| SW857 | S0101 | S0005 | S0068 |
| S0090 | S0215 | SW632 | SW024 |
| SW072 | S0227 | SW951 | SW911 |

Análisis de los datos.

Se depuró la información descartando aquellos SNPs que presentaron un MAF (Minor Allele Frequency) <0,05 y los que no estaban situados en los autosomas, mediante el software PLINK (Purcell et al., 2007). Después de unificar la información contenida en ambas versiones del *Porcine SNP60 BeadChip* y realizar la imputación mediante el software Beagle (Browning & Browning, 2011) para aquellos marcadores de la v.1 que no existían en la v.2, el número total de SNPs disponibles fue de 27.017.

Se calculó el nivel de homocigosis para cada individuo mediante la desviación con respecto a la unidad del cociente entre homocigosis observada y la esperada bajo equilibrio H-W. Asimismo, como en el punto anterior, mediante PLINK se seleccionó un conjunto de 538 marcadores en un estado próximo al de equilibrio de ligamiento, utilizando ventanas de 50 SNPs, desplazamientos de 5, y un R² aproximado de 0,4. Este conjunto de marcadores sirvió posteriormente para realizar un primer análisis de la estructura genética del conjunto de muestras mediante el software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) con 250.000 iteraciones de “quemado” y 350.000 de MCMC, ajustando un modelo que consideraba poblaciones mezcladas y frecuencias alélicas correlacionadas entre las poblaciones.

La estimación de los principales parámetros poblacionales, utilizando la información proporcionada por los microsatélites, se realizó mediante el software GENETIX 4.05 (Belkhir et al., 2004) y adicionalmente el mencionado STRUCTURE para analizar la estructura poblacional de las muestras genotipadas con 50.000 iteraciones de “quemado” y 95.000 iteraciones MCMC, ajustando un modelo que consideraba poblaciones mezcladas y frecuencias alélicas correlacionadas entre las poblaciones.

Finalmente, se identificaron mediante el programa PLINK (Purcell et al., 2007) los ROHs (Runs Of Homozygosity) individuales incluyendo los 32 animales pertenecientes a poblaciones locales africanas y los 19 animales de las poblaciones salvajes *Phacochoerus africanus* (14) y *Potamochoerus larvatus* (5), estableciendo un tamaño mínimo de ROH de 30 SNPs, densidad mínima de 1SNP/100 kb, distancia máxima entre SNPs de 500kb, permitiendo un máximo de dos genotipos faltantes y un heterocigoto. Con el fin de minimizar el número de ROH que ocurren por azar, se calculó el número mínimo de SNPs que deben constituir un ROH (n) mediante la expresión siguiente de Lencz et al. (2007)

$$n = \frac{\log_e\left(\frac{\alpha}{n_s * n_i}\right)}{\log_e(1 - het)}$$

siendo:

n_s el número de SNPs por individuo,

n_i el número de individuos,

α el porcentaje de ROH falsos positivos (0,05 en este caso),

het el promedio de heterocigosis para todos los SNPs.

Se requirió un mínimo de 53 SNPs para producir <5% de ROH generados por azar.

Resultados y discusión

La Familia *Suidae* está constituida por tres Subfamilias: *Phacocoerinae*, *Suinae* y *Babyrouinea*. El Género *Phacochoerus* pertenece a la primera Subfamilia, y los Géneros *Potamochoerus* y *Sus* a la segunda. Mientras que existe abundante información sobre parámetros de genética de poblaciones utilizando diversas fuentes de

información molecular para las especies doméstica y salvaje del género *Sus* (Larson et al., 2005; Megens et al., 2008), para las poblaciones africanas de suidos salvajes esta es prácticamente inexistente. Los valores de endogamia, estimados de forma similar al estadístico de Wright F_{IS} , oscilaron entre -0,12 y 0,97; el primero en un individuo de la población híbrida de origen europeo muestreada en África, y el segundo en un individuo de la población de potamóqueros. En la figura 1 se representa la distribución de las frecuencias de individuos por población (razas europeas, poblaciones mezcla de razas europeas, animales tolerantes, suidos salvajes) y categoría de nivel de endogamia (-0,049, -0,05 - 0,001, 0,002 - 0,099, 0,1 - 0,1499, 0,15 - 0,1999, 0,20 - 0,299, 0,30 - 0,399, 0,4 - 0,549, 0,15 - 0,1999, 0,20 - 0,299, 0,30 - 0,399, 0,4 - 0,549, y 0,55).

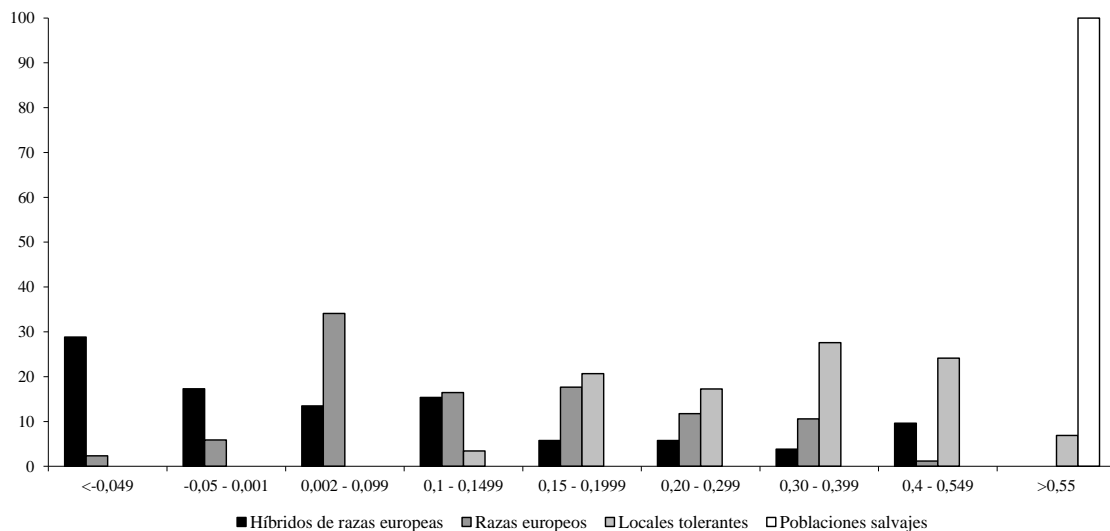


Figura 1. Distribución de las frecuencias de individuos de cada población entre las diferentes categorías de endogamia (*Distribution of the individual inbreeding frequencies of each population among the different inbreeding categories*).

Muchos de los individuos pertenecientes a poblaciones africanas, resultado de cruzamientos entre razas de origen europeo, manifestaron un exceso de heterocigotos, efecto Wahlund (Crow & Kimura, 1970), dando lugar a una proporción elevada de animales con valores de F_{IS} negativos. Se observa también en este grupo de individuos una mayor dispersión a lo largo de todas las categorías de endogamia. En el otro extremo, se aprecia que todos los suidos salvajes se sitúan dentro de la categoría de mayor endogamia. Curiosamente, la distribución de los animales pertenecientes al grupo de animales locales tolerantes ocupa las categorías de mayores endogamias, lo que podría ser consecuencia del hecho de ser portadores de fragmentos de genoma de los suidos salvajes, con una homocigosis superior al 95%.

En la tabla II figuran los valores medios de F_{IS} por población cuando se utiliza el total de SNP (27.017) y el subconjunto de SNP aproximadamente en equilibrio de ligamiento (538), tal y como se explica más arriba. La correlación de las endogamias individuales entre ambos conjuntos de datos fue de 0,985.

Tabla II. Valores de endogamia, expresada en términos de F_{IS} (*Inbreeding values estimated by the Wright's F_{IS} statistic*).

| | $^1F_{IS}^*$ (%) | $^2F_{IS}^*$ (%) |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Híbridos de razas europeas | 0,055 (0,022) | 0,095 (0,018) |
| Razas europeas | 0,138 (0,012) | 0,172 (0,011) |
| Animales locales tolerantes | 0,344 (0,024) | 0,300 (0,026) |
| Suidos salvajes | 0,958 (0,001) | 0,956 (0,001) |

* Valor calculado como $[1 - (\text{heterocigosis observada} / \text{heterocigosis esperada})]$

¹ Valor calculado con los 27.017 SNP

² Valor calculado con los 538 SNP

Resulta evidente la ausencia de polimorfismo en los suidos salvajes para una elevada proporción de los SNPs seleccionados en el *Porcine SNP60 BeadChip* de Illumina, fenómeno que, a pesar de estar bien descrito (*ascertainment bias*) para el caso de los chips de SNP, resulta llamativo. La consecuencia más evidente es la

escasa capacidad de discriminación que esta información molecular va a tener entre los individuos de las poblaciones salvajes.

En el análisis realizado con STRUCTURE, los grupos de poblaciones que figuran en la tabla II se han organizado de la siguiente manera: el grupo denominado “híbridos de razas europeas” se ha segregado en cruces de cerdo europeo y locales keniatas, el grupo de “razas europeas” se ha segregado en berkshire, landrace, large white y middle white, y el grupo denominado “suidos salvajes” se ha segregado en facóqueros y potamóqueros. Las proporciones promedio de cada uno de estos grupos, que ha sido asignada a cada uno de los tres o cinco orígenes genéticos considerados, figuran en la tabla III, mientras que en la figura 2 se representa gráficamente el resultado cuando se consideran cinco grupos genéticos, observándose la perfecta discriminación de las dos poblaciones de suidos salvajes en la parte inferior de la figura.

Tabla III. Proporciones promedio de genoma de las diferentes poblaciones asignadas a los tres o cinco grupos genéticos considerados. Los resultados se obtuvieron con la información proporcionada por 538 SNP (*Estimated membership fractions of each population assuming three and five clusters inferred using the information provided by 538 SNP markers*).

| 3 Grupos Genéticos | | | |
|----------------------|------------|----------|----------|
| Población | Tolerantes | Europeos | Salvajes |
| Tolerantes | 0,970 | 0,028 | 0,002 |
| Locales keniatas | 0,206 | 0,785 | 0,009 |
| Cruces cerdo europeo | 0,074 | 0,923 | 0,003 |
| Berkshire | 0,003 | 0,996 | 0,001 |
| Landrace | 0,004 | 0,990 | 0,006 |
| Large White (LW) | 0,008 | 0,987 | 0,005 |
| Middle White | 0,004 | 0,990 | 0,006 |
| Facóqueros | 0,000 | 0,000 | 1,000 |
| Potamóqueros | 0,000 | 0,000 | 1,000 |

| 5 Grupos Genéticos | | | | | |
|----------------------|------------|---------------|-------------------|-----------|----------|
| Población | Tolerantes | Landrace & LW | Middle White & LW | Berkshire | Salvajes |
| Tolerantes | 0,960 | 0,028 | 0,004 | 0,006 | 0,002 |
| Locales keniatas | 0,220 | 0,747 | 0,012 | 0,010 | 0,011 |
| Cruces cerdo europeo | 0,075 | 0,882 | 0,027 | 0,012 | 0,003 |
| Berkshire | 0,007 | 0,038 | 0,004 | 0,948 | 0,002 |
| Landrace | 0,002 | 0,982 | 0,008 | 0,002 | 0,006 |
| Large White (LW) | 0,008 | 0,706 | 0,278 | 0,004 | 0,004 |
| Middle White | 0,003 | 0,036 | 0,958 | 0,002 | 0,002 |
| Facóqueros | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,000 |
| Potamóqueros | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,999 |

Encabezando cada grupo genético figura la denominación de la población que hipotéticamente explicaría dicho origen genético. Así, por ejemplo, cuando se han considerado cinco orígenes genéticos, el segundo grupo figura con la denominación “landrace & LW” al incluir el 98% del genoma de los animales pertenecientes a la raza landrace y un 71% de los animales de la raza large white (tabla III). Este mismo origen genético es compartido en un 88% por los animales pertenecientes a “cruces de cerdo europeo”, y en un 75% por los animales del grupo keniatas. Al incrementar el número de grupos genéticos aumenta la verosimilitud del modelo, y las dos poblaciones de suidos salvajes permanecen agrupadas en un mismo origen, incluso cuando el número de dichos grupos es elevado (>11, datos no presentados). Esto es consecuencia, por un lado, de la subdivisión dentro de los diferentes grupos de poblaciones que figuran en la tabla III, y por otro, del elevado nivel de homocigosis dentro de las poblaciones de suidos salvajes. De hecho, cuando se analizan separadamente los facóqueros y potamóqueros el valor más verosímil para el número de orígenes genéticos es dos, apareciendo completamente homogéneas ambas poblaciones (ver figura 2).

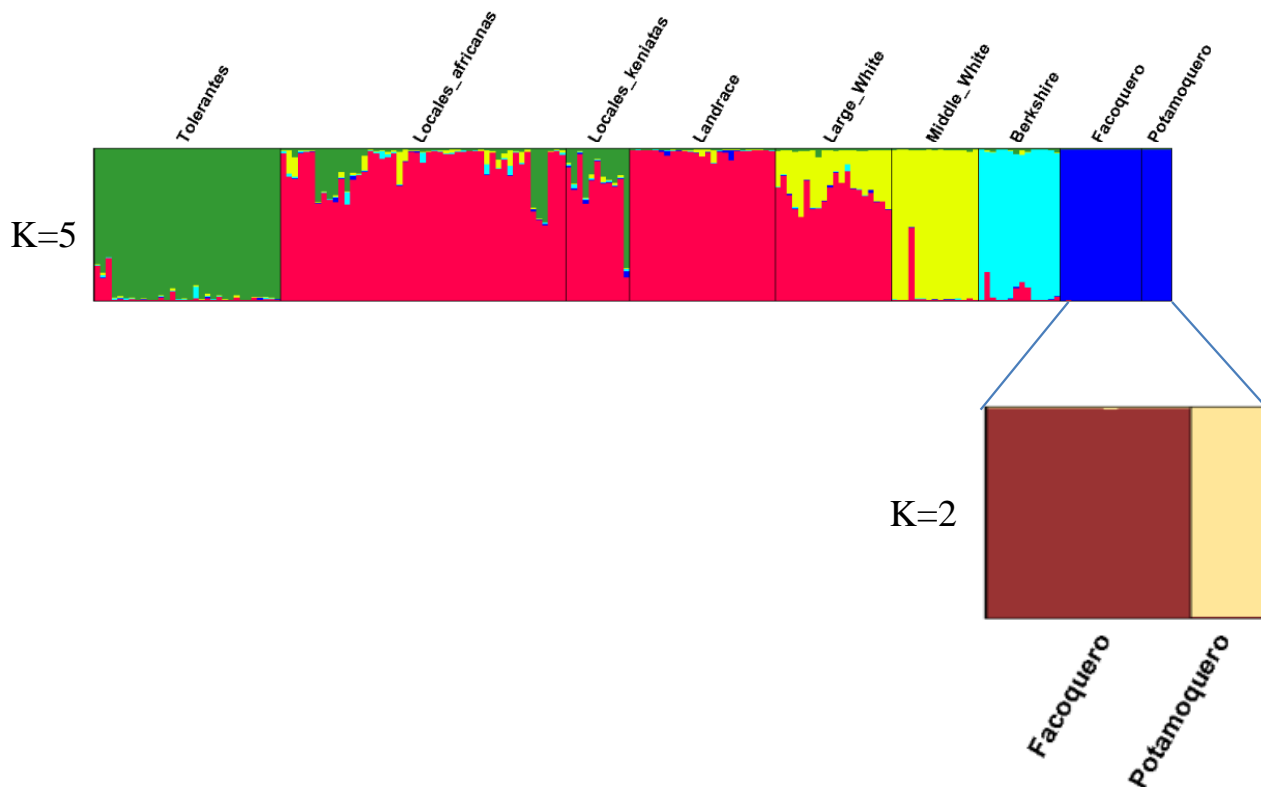


Figura 2. Cada línea vertical representa el genoma de un individuo y la proporción que de cada color (grupo genético, K) hay en cada línea vertical representa la proporción de genoma de ese individuo que proviene de cada grupo genético K. En la parte superior se presentan los resultados cuando el número de grupos genéticos considerados fue de cinco, mientras que en la figura inferior sólo están representados las proporciones de los individuos salvajes cuando se consideran dos grupos genéticos. Los resultados se obtuvieron con la información proporcionada por 538 SNP (*The genome of each individual is represented by a stacked vertical line broken into k colors, indicating the proportion of membership of each individual to the K clusters. Upper figure represents results when K=5, while the below figure represent results for wild population individuals when K=2. Results were obtained using the information provided by 538 SNP markers*).

Tabla IV. Valores de endogamia estimada mediante el estadístico de Wrigth F_{IS} y la información proporcionada por los 28 microsatélites (*Inbreeding values estimated by the Wrigth's F_{IS} statistics and the information provided by the 28 microsatellites*).

| | F_{IS} | |
|----------------------|----------|------|
| Tolerantes | 0,143 | |
| Facóqueros | 0,239 | |
| Potamóqueros | -0,014 | N.S. |
| Cruces cerdo europeo | 0,092 | |

Tabla V. Distancias genéticas entre las poblaciones analizadas expresadas en términos de F_{ST} . Todos los valores resultaron significativos para $P < 0,01$ (*Pairwise genetic distances in terms of F_{ST} . All values were significant for a P-value of 0.01*).

| | Facóqueros | Potamóqueros | Cruces cerdo europeo |
|--------------|------------|--------------|----------------------|
| Tolerantes | 0,375 | 0,473 | 0,160 |
| Facóqueros | | 0,341 | 0,271 |
| Potamóqueros | | | 0,373 |

Debido precisamente a esta reducida capacidad de discriminación de las poblaciones de suidos salvajes con la información recogida en el *Porcine SNP60 BeadChip* de Illumina, y ante la posibilidad de que los microsatélites estuvieran filogenéticamente más conservados y permitieran analizar mezclas de genomas en los animales calificados como tolerantes al VPPA, en una segunda fase se utilizó el conjunto de 28 marcadores que se

mencionan en la tabla I en 32 animales de poblaciones locales africanas, 14 facóqueros, 5 pocamóqueros y 28 híbridos europeos.

El nivel de endogamia estimado mediante el coeficiente F_{IS} de Wright figura en la tabla IV y con la excepción de la población de potamóqueros en la que no se rechazó el equilibrio H-W, en el resto de poblaciones se probó la existencia de un déficit de heterocigotos. Las distancias genéticas, en términos de F_{ST} , figuran en la tabla V, siendo todas ellas significativas para un p-valor inferior a 0,01.

Las proporciones que de cada población se asignan a diferentes orígenes genéticos, cuando se consideran dos o cuatro orígenes, se presentan en la tabla VI. Se puede apreciar que en los animales pertenecientes a las poblaciones locales de cerdos que resultaron más tolerantes al VPPA no se observó ningún fragmento de genoma compartido con el de las poblaciones de suidos salvajes. Ningún animal, dentro de los clasificados como tolerantes al VPPA, mostró ninguna proporción diferente de 0 proveniente de las poblaciones de suidos salvajes (datos no presentados).

Tabla VI. Proporciones promedio de genoma de las diferentes poblaciones asignado a los dos o cuatro grupos genéticos considerados. Los resultados se obtuvieron con la información proporcionada por 28 microsatélites (*Estimated membership fractions of each population assuming three and five clusters inferred using the information provided by 28 microsatellite markers*).

| | Grupos Genéticos | | | Grupos Genéticos | | |
|----------------------|------------------|-----------------|------------|------------------|------------|--------------|
| | Cerdo doméstico | Suidos salvajes | Tolerantes | Cerdo europeo | Facóqueros | Potamóqueros |
| Tolerantes | 0,999 | 0,001 | 0,987 | 0,001 | 0,001 | 0,011 |
| Cruces cerdo europeo | 0,998 | 0,002 | 0,001 | 0,992 | 0,005 | 0,002 |
| Facóqueros | 0,002 | 0,998 | 0,001 | 0,002 | 0,996 | 0,001 |
| Potamóqueros | 0,001 | 0,999 | 0,071 | 0,001 | 0,001 | 0,927 |

Finalmente, ante la incapacidad de estos procedimientos para reconocer fracciones de genoma comunes entre las poblaciones de animales tolerantes y salvajes, se procedió a identificar regiones de homocigosis comunes a ambas poblaciones. En la tabla VII figuran las estadísticas sobre número de regiones, tamaño medio (Kb) y promedio de SNPs incluidos por región para cada uno de los dos grupos de animales. Se identificaron tres grupos consenso que incluían más de 30 individuos, situados, uno en el cromosoma 4 y los otros dos en el 10, con un tamaño aproximado de unos 250 kb que incluían entre 3 y 7 SNPs (tabla VIII).

Posteriores trabajos deberán implicar el análisis más detallado de estas tres regiones, con el fin de llevar a cabo alguna de las estrategias de identificación de genes que pudieran explicar diferencias en la sensibilidad al virus de la PPA.

Tabla VII. Número de regiones de homocigosis (ROH), tamaño medio en Kb, y promedio de SNPs incluidos en dichas regiones (*Number of homozygosity regions (ROH), average length in Kb, and average number of SNP included in these ROH*).

| | n° ROH | Longitud (Kb) | n° SNP |
|-----------------------------|--------|---------------|--------|
| Animales locales tolerantes | 589 | 15.229 | 250 |
| Suidos salvajes | 5190 | 25.233 | 419 |

Tabla VIII. Ubicación, longitud (Kb) y número de SNPs comprendidos en las regiones de homocigosis consenso que incluyeron 30 o más individuos (*Chromosome position, average length in Kb, and average number of SNP in the ROH consensus regions including at least 30 individuals*).

| Cromosoma | Longitud (Kb) | n° SNP |
|-----------|---------------|--------|
| 4 | 222 | 3 |
| 10 | 267 | 7 |
| 10 | 264 | 5 |

Conclusiones

La información molecular utilizada, microsatélites y marcadores tipo SNP contenidos en el *Porcine SNP60 BeadChip* de Illumina, no permitió identificar ningún grado de introgresión de genoma procedente de suidos salvajes africanos en las poblaciones domésticas que resultaron tolerantes al virus de la PPA.

Agradecimientos

La financiación de este trabajo proviene del Proyecto INIA RTA2011-00060-C02-02.

Bibliografía

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France). Disponible en: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>.
- Browning B.L. & Browning S.R. 2011. A fast, powerful method for detecting identity by descent. *American Journal of Human Genetics* 88, 173-182.
- Costard S., Wieland B., Glanville W. de, Jori F., Rowlands R., Vosloo W., Roger F., Pfeiffer D.U. & Dixon L.K. 2009. African swine fever: how can global spread be prevented?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364, 2683–2696.
- Crow J.F. & Kimura M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, Publ. New York. USA.
- De Tray D.E. 1957. African swine fever in warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*). *Journal of American Veterinary Medical Association* 130, 537–40.
- Food and Agriculture Organization (FAO) 2009. EMPRES WATCH. African swine fever spread in the Russian Federation and the risk for the region. Dec 2009.
- Gallardo C., Kalabekov I., Nieto R., Yelsukova A., Simón A., Tcybanov S., Kolbasov D. & Arias M. 2009a. Genetic characterization of Caucasus African swine fever virus isolates. 14th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.
- Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., Okoth E., Martín E., Kasiti J. & Bishop R.P. 2009b. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes* 38, 85-95.
- Gallardo C., Okoth E., Pelayo V., Anchuelo R., Martín E., Simón A., Llorente A., Nieto R., Soler A., Martín R., Arias M. & Bishop R.P. 2011. African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site. *Journal of General Virology* 92, 432–44.
- Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Andersson L. & Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307, 1618–21.
- Lencz T., Lambert C., DeRosse P., Burdick K.E., Morgan T.V., Kane J.M., Kucherlapati R. & Malhotra A.K. 2007. Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Science* 104, 19942–47.
- Megens H-J, Crooijmans Richard P.M.A., San Cristóbal M., Hui X., Li N. & Groenen Martien A.M. 2008. Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. *Genetics Selection and Evolution* 40, 103-28.
- Pérez-Filgueira D.M., González-Camacho F., Gallardo C., Resino-Talavan P., Blanco E., Gómez-Casado E., Alonso C. & Escribano J.M. 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3114–21.
- Plowright W. 1981. African swine fever. In: Davis, J. W., L. H. Karstand, and D. O. Trainer (eds), *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 2nd edn, pp. 178–190. Ames, Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–59.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J. & Sham P.C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based

- linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* 81, 559–75. Disponible en: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>
- Rowlands R. J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E. & Dixon L. 2008. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1870-74.
- San Cristóbal M., Chevalet C., Haley C.S., Joosten R., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Amigues Y., Boscher M.-Y., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., Désautés C., Alderson L., Finland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla J.L., Martínez A.M., Ramos M., Glodek P., Meyer J.N., Gandini G.C., Matassino D., Plastow G.S., Siggens K.W., Laval G., Archibald A.L., Milan D., Hammond K. & Cardellino R. 2006. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers, *Animal Genetics* 37, 189–98.
- Sánchez-Vizcaino, J.M. 2006. African swine fever. In: Straw, B. E., J. J. Zimmerman, S. D’Allaire, and D. J. Taylor (eds), *Diseases of Swine*, 9th edn, pp. 291–298. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.
- Scherf B.D. 2000. World Watch List for Animal Diversity, 3rd edn., FAO, Rome, Italy.
- Zeuner F.E. 1963. *A History of Domesticated Animals*. Harper and Row Publishers, New York, NY, USA.