

Uso de marcadores microsatélites para el análisis de paternidad en cerdos Criollos venezolanos

Rafael Galíndez^{1*}, Catalina Ramis², Gonzalo Martínez¹ y Luis Ángulo²

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Producción Animal, Aragua, Venezuela. ²Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Genética, Aragua, Venezuela. *Correo Electrónico: galindez70@yahoo.com

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el uso de un conjunto de marcadores microsatélites para el análisis de paternidad en cerdos Criollos venezolanos, se seleccionaron individuos para la colecta de muestras de folículos pilosos en los poblados de Masaguaral (22), El Socorro (26), Guayabal (31) Arismendi (31) Capanaparo (29) y Cunaviche (32), asimismo se incluyeron 21 individuos de raza Landrace y 14 de raza Large White como referenciales. Se amplificaron 13 marcadores microsatélites y tipificaron los fragmentos mediante tinción con nitrato de plata (AgNO_3). Se calculó el número total y número medio de alelos (NTA, NMA), heterocigosis media observada y esperada (HMO, HME), índice de contenido polimórfico medio (PICM), probabilidad de exclusión con ausencia de información de los dos progenitores y un progenitor (PE2, PE1) y la probabilidad de exclusión combinada para ambos casos (PEC2, PEC1). Los resultados obtenidos indican la presencia de 63 alelos con NMA de 4,5. La HMO resultó en 0,499 (0,192 - 0,708). Se obtuvo un valor de 0,560 para HME (0,345 - 0,738). El PICM se ubicó en 0,496 (0,274 - 0,678). Los valores de PE1 resultaron superiores a PE2 para todos los loci, encontrándose valores de 0,980 y 0,990 para PEC2 y PEC1, considerando 10 marcadores. El panel de microsatélites propuestos tiene la utilidad y precisión necesaria para realizar pruebas de paternidad y registros genealógicos en los cerdos Criollos venezolanos basándose en el cálculo de la probabilidad de exclusión.

Palabras clave: alelos, heterocigosis, índice de contenido polimórfico, probabilidad de exclusión.

Microsatellites use to paternity analysis in venezuelan Creole pigs

ABSTRACT

To evaluate the use of a set of microsatellite markers to paternity analysis in venezuelan Creole pigs, taken hair follicles samples of 22 Masaguaral individuals, 26 of El Socorro, 31 of Guayabal, 31 of Arismendi, 29 of Capanaparo and 32 of Cunaviche, also, 21 individuals of Landrace and 14 Large White breeds were used as a reference. Thirteen microsatellite markers were amplified, and viewed the fragments by staining with silver nitrate (AgNO_3). It was calculated the total and average allele numbers (NTA, NMA), observed and expected mean heterozygosity (HMO, HME), medium polymorphic content index (PICM), exclusion probability with no information from the two parents and one parent (PE2, PE1), and combined exclusion probability for both cases. (PEC2, PEC1). Sixty - three alleles were visualized with NMA of 4.5. The HMO was 0.499 (0.192 - 0.708). HME was 0.560 (0.345 - 0.738). The PICM was 0.496 (0.274 - 0.678). The PE1 values resulted higher than PE2 for all loci, finding values of 0.980 and 0.990 for PEC2 and PEC1, considering 10 markers. The microsatellites panel proposed has the necessary utility and precision to perform paternity test and genealogical records in venezuelan Creole pigs, basing in exclusion probabilities tool.

Key words: alleles, heterozygosity, polymorphic content index, exclusion.

INTRODUCCIÓN

Los programas de mejora genética en especies animales de interés zootécnico que utilizan métodos cuantitativos, se fundamentan en las relaciones genéticas entre los individuos. En la actualidad, el procedimiento del mejor predictor lineal inesgado usado para calcular los valores genéticos es el más aceptado (Sifuentes *et al.* 2006).

En este sentido, es requisito obligatorio la correcta identificación de los individuos y su genealogía, de manera de obtener valores precisos de su potencial genético y poder establecer objetivos claros y confiables en dichos programas. En el caso de explotaciones porcinas donde no se tiene con precisión las relaciones de parentesco entre los progenitores y la progenie, existe una alta probabilidad de incurrir en errores de pedigrí, pudiéndose afectar de forma negativa el progreso genético por generación.

En este aspecto, se citan los marcadores de ADN como una herramienta eficaz para la asignación de paternidad en animales de interés doméstico; de ellos, los microsatélites resultan ser marcadores moleculares de amplio uso para tal fin, debido a su reproducibilidad, alta fiabilidad (mayor al 95 %), bajos costos en relación a otros marcadores moleculares, elevado polimorfismo y fácil interpretación (Aranguren *et al.* 2005, Riojas *et al.* 2006).

A pesar de que el nivel tecnológico disponible para las explotaciones porcinas permite tener mucha precisión en la identificación de la genealogía, el manejo errado de los reproductores, así como los errores en los registros de inseminación y registros de montas dirigidas, pueden ocasionar fallas en el árbol genealógico.

Es por esto, que más allá de la importancia de registrar la progenie como requisito fundamental de los libros genealógicos y el correcto cálculo de los valores genéticos, las pruebas de paternidad son importantes como herramientas auxiliares en la determinación precisa del valor de cría en las explotaciones porcinas selectas (Delgado *et al.* 2005, Behl *et al.* 2017) y en aquellas poblaciones

donde no se llevan registros precisos de la identificación y los apareamientos.

Con respecto al último punto mencionado, esto es de gran importancia en las poblaciones de cerdos Criollos venezolanos, puesto que los sistemas de explotación son predominantes extensivos. La presente investigación tiene como finalidad evaluar el uso de un conjunto de marcadores microsatélites para el análisis de paternidad en cerdos Criollos venezolanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de folículos pilosos de cerdos Criollos venezolanos en los poblados de Masaguaral (22), El Socorro (26) y Guayabal (31) en el estado Guárico; Arismendi (31) en el estado Barinas; Capanaparo (29) y Cunaviche (32) en el estado Apure, asimismo se incluyeron 21 individuos de la raza Landrace y 14 de la raza Large White de una explotación intensiva en el estado Carabobo, como referencias externas.

Las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola en el Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, ubicado en la ciudad de Maracay, estado Aragua, Venezuela.

El ADN genómico de los folículos pilosos fue aislado usando nitrógeno líquido y acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) según el protocolo descrito por Galíndez *et al.* (2011). Las reacciones de PCR se llevaron cabo en un equipo termociclador marca BIORAD, modelo PTC-100, con el programa presentado en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Perfil termico usado para las reacciones de PCR.

FASE		T ¹ (°C)	t ² (s)
Desnaturalización inicial		95	240
40 ciclos	Desnaturalización	95	30
	Hibridación	específica cebador	60
	Extensión	72	120
Extensión Final		72	600

¹Temperatura termociclador. ²Duración de la fase.

La composición de la solución de reactivos usada para la amplificación por PCR, y las secuencias nucleotídicas del grupo de 13 microsatélites recomendados por la FAO (2011) para estudios de caracterización genética en cerdos, que fueron usados en este trabajo, se presentan en los cuadros 2 y 3 respectivamente.

Cuadro 2. Composición de la mezcla de PCR.

Componente (concentración)	Vol.
albúmina de suero bovino (BSA) (1mg.mL ⁻¹)	0,5 µL
tampón (5X)	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µL
polimerasa TAQ (5U.µL ⁻¹)	0,2 µL
desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP)(200 µM)	0,2 µL
ADN molde (10ng.µL ⁻¹)	5 µL
cebadores específicos (10 µM)	2 µL
agua purificada c.s.p	25 µL

Cuadro 3. Marcadores microsatélites utilizados en el análisis de paternidad en el cerdo Criollo venezolano.

Mrc ¹	Secuencia (5' → 3')	T ²
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCCTGATTCTGGGTA	58
S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	55
S0215	TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT	55
S0218	GTGTAGGCTGGCGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	55
S0225	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA	55
S0227	GATCCATTATAATTTTAGCACAAAGT GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC	55
SW24	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	58
SW240	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	58
SW632	ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAATGGGGTGTTC	58
SW857	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	58
SW911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAGCC	55
SW936	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	58
SW951	TTTCACAACCTCTGGCACCAG GATCGTGCCCAATGGAC	58

¹Marcador. ²Temperatura de hibridación (°C). Fuente: FAO (2011).

La separación de los productos de la PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (concentración del 6 %) y se reveló el resultado con solución de nitrato de plata (AgNO₃) según la metodología descrita por Badan (2003). La tipificación de los fragmentos de PCR se realizó con el apoyo de un transiluminador de luz blanca y el tamaño de los amplicones se calculó usando la metodología propuesta por Hames y Rickwood (1981), a partir de un marcador de 25 pb, con el apoyo de la aplicación Microsoft Excel®.

Se calcularon los parámetros; número total de alelos (NTA), número medio de alelos (NMA), índice de contenido polimórfico medio (PICM), heterocigosidad media esperada (HME) y heterocigosidad media observada (HMO), usando el complemento para Microsoft Excel "The Excel Microsatellite Toolkit" (Revidatti 2009). Los valores de la probabilidad de exclusión con ausencia de información de los dos progenitores (PE2), probabilidad de exclusión con ausencia de información de un progenitor (PE1), probabilidad de exclusión combinada para todos los loci, con ausencia de información de los dos progenitores (PEC2) y probabilidad de exclusión combinada para todos los loci, con ausencia de información de un progenitor (PEC1) se obtuvieron con apoyo del programa estadístico Cervus, versión 3.0 (Marshall *et al.* 1998, Kalinowski *et al.* 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 63 alelos (NTA) para las seis poblaciones de cerdos Criollos venezolanos y razas referenciales, para una media de 4,5 (NMA), esto se corresponde a una alta riqueza alélica, la cual es similar a los reportes previos de la literatura (Revidatti 2009, Landi *et al.* 2011, Costa *et al.* 2012, Montenegro 2012, Revidatti *et al.* 2014, Yu *et al.* 2015), aunque resultaron ser inferiores a los valores reportados por Pardo *et al.* (2015) y Cortés *et al.* (2016), resaltando que se usaron algunos microsatélites diferentes a los empleados en el presente estudio.

Los valores de HMO oscilaron entre 0,192 y 0,708; mientras que la HME varió entre 0,345 y 0,738 (Cuadro 4). Los valores máximos y mínimos para

Cuadro 4. HMO, HME y PICM por marcador en cerdos Criollos venezolanos.

Marcador	HMO	HME	PICM
S0005	0,708	0,647	0,568
S0155	0,561	0,673	0,595
S0215	0,192	0,345	0,274
S0218	0,549	0,577	0,525
S0225	0,543	0,731	0,669
S0227	0,296	0,380	0,326
SW24	0,665	0,705	0,635
SW240	0,690	0,656	0,585
SW632	0,573	0,639	0,558
SW857	0,599	0,582	0,517
SW911	0,515	0,738	0,678
SW936	0,516	0,667	0,588
SW951	0,577	0,500	0,430
Total¹	0,499	0,560	0,496

¹Valores medios considerando todos los marcadores.

la heterocigosidad son similares a los reportados por Fan *et al.* (2005), Vicente *et al.* (2008), Pardo *et al.* (2015), Revidatti *et al.* (2014), Yu *et al.* (2015), Cortés *et al.* (2016); destacando que, si se excluyen los loci S0215 y S0227, se presentó alta variabilidad genética en los cerdos Criollos venezolanos. Por otra parte, la diferencia entre los valores promedios para todos los loci es superior (0,061) al encontrado por los autores mencionados.

El valor de PICM para los microsatélites S0005, S0155, S0218, S0225, SW24, SW240, SW632, SW857, SW911 y SW936 fue superior a 0,5. De acuerdo a Pérez (2005) este resultado indica que son altamente informativos y demuestra su utilidad en el estudio de variabilidad y paternidad en cerdos; mientras que los marcadores S0215, S0227 y SW951 son medianamente informativos al ubicar sus PICM entre 0,25 y 0,5 (Martínez *et al.* 2005b).

La diferencia entre HMO y HME fue reportada por Galíndez *et al.* (2016) para las mismas poblaciones del presente estudio, lo que refleja, según los autores, una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg; situación que a su vez evidencia la existencia de subestructura poblacional.

De manera general, otros autores han encontrado resultados similares para el PICM en diferentes especies (Li *et al.* 2004, Thuy *et al.* 2006, Vicente *et al.* 2008, Chang *et al.* 2009, Montenegro 2012, Pardo *et al.* 2014, 2015; Sharma *et al.* 2015, Yu *et al.* 2015, Ayagirwe *et al.* 2018, Pei *et al.* 2018).

La PE2 por marcador varió en un rango de 0,085 (S0215) a 0,383 (S0225), mientras que para la PE1 el intervalo de variación estuvo entre 0,164 y 0,563 para los mismos mismos marcadores (Cuadro 5). Estos valores de PE se asemejan a los reportes de Yalta *et al.* (2014), Yu *et al.* (2015) y Pei *et al.* (2018) quienes evaluaron poblaciones de cerdos, alpacas y yaks.

Cuadro 5. PE2 y PE1 para la combinación de poblaciones de cerdos Criollos venezolanos y referenciales.

Locus	PE2	PE1
S0005	0,284	0,455
S0155	0,332	0,508
S0215	0,085	0,164
S0218	0,324	0,507
S0225	0,383	0,563
S0227	0,129	0,261
SW24	0,353	0,531
SW240	0,341	0,517
SW632	0,243	0,402
SW857	0,314	0,490
SW911	0,364	0,543
SW936	0,301	0,476
SW951	0,194	0,332
PEC¹	0,9874	0,9996
PEC²	0,9804	0,9990

¹PEC, considerando todos los loci en conjunto;

²PEC combinada descartando los loci S0215, S0227 y SW951.

Los valores de probabilidad de exclusión encontrados para los marcadores S0155, S0227, SW911, SW936 y SW951, son superiores a los reportados por Delgado *et al.* (2005), esta diferencia puede explicarse sobre la base de que se estudiaron poblaciones divergentes y, por tanto, la constitución genética de estas puede diferir.

Asimismo, los valores encontrados son inferiores a los reportados por Fan *et al.* (2005) y Vicente *et al.* (2008); en este caso debe mencionarse que los valores de probabilidad de exclusión por cada marcador aumentan con el incremento del número de alelos de estos, lo que conduce a pensar que en los trabajos citados probablemente existió una mayor riqueza alélica.

Se detectaron tres marcadores con baja probabilidad de exclusión (menor a 0,25); S0215, S0227 y SW951, de acuerdo al criterio establecido por Delgado *et al.* (2005) se consideran como poco informativos. Estos resultados concuerdan con los autores citados, estos microsatélites se corresponden con la menor heterocigosidad media e inferiores índices de contenido polimórfico medio (Cuadro 5), lo que confirma los hallazgos y teorías expresadas con anterioridad sobre la poca información que expresan los marcadores mencionados en estas poblaciones para el estudio de la diversidad genética.

La PEC incluyendo todos los loci para ambos casos resultó en valores superiores a 0,98 (Cuadro 5), resaltando que el poder de discriminación de un individuo con respecto a la población mediante la probabilidad de exclusión total es cercana al 100 % (99,9 %) en ausencia de información de uno de los progenitores (PEC1). Los resultados concuerdan con los reportes de Vicente *et al.* (2008) y Delgado *et al.* (2005) quienes informan valores de probabilidad de exclusión similares al presente estudio.

Vale la pena mencionar que, si se descartan los microsatélites S0215, S0227 y SW951, la PEC se mantiene en 99,9 % para un panel de 10 microsatélites (Cuadro 5), por lo tanto, la no inclusión de estos marcadores implica ahorro en tiempo y dinero sin afectar la precisión del análisis.

De acuerdo a Aranguren-Méndez (2002), los valores altos de la PE implican que prácticamente existe una probabilidad de 100 % de detectar una falsa paternidad con el panel de marcadores propuesto. Asimismo, es válido aseverar que la prueba propuesta constituye una herramienta muy útil para controlar la genealogía en cerdos Criollos venezolanos a través del diseño de los planes de apareamiento, sobre todo porque es

conocido que en los sistemas de explotación de estos cerdos los apareamientos no son controlados y menos aún las relaciones de parentesco que puedan ocurrir entre los individuos de las poblaciones consideradas.

Por tanto, el análisis de paternidad para minimizar o eliminar la consanguinidad representa un paso fundamental a ser considerado en los planes de conservación y recuperación de las poblaciones de cerdos Criollos venezolanos. Asimismo, la premisa de poder controlar la genealogía, usando esta técnica, en futuros planes de mejora genética luce como un objetivo fundamental a mediano plazo (Aranguren-Méndez 2002; Martínez *et al.* 2005a, Yu *et al.* 2015, Pei *et al.* 2018).

En referencia a los valores de la PEC discriminados por grupo experimental, los resultados muestran valores altos dentro de las poblaciones de cerdos Criollos venezolanos y las razas comerciales (Cuadro 6). El microsatélite que presentó menor valor para PE1 fue variable entre poblaciones, en Masaguaral, El Socorro, y Arismendi correspondió al marcador S0005, mientras que en Guayabal, Capanaparo, Cunaviche, Landrace y Large White los marcadores identificados fueron SW857, SW24, SW240, SW936 y S0218, respectivamente.

Estos marcadores fueron poco informativos para las poblaciones mencionadas, por lo tanto, la discusión sobre su poca o ninguna utilidad es válida, puesto que es muy probable que se puedan descartar en el análisis de cada población particular sin que ocurran variaciones significativas en el valor de la probabilidad de exclusión combinada.

Una distribución similar se observa con los marcadores que presentan los valores más elevados de probabilidad de exclusión dentro de cada población, ya que estos no son los mismos entre un grupo y otro (Cuadro 6).

Finalmente, la probabilidad de exclusión supera el valor de 99 % (entre 99,3% y 99,9 %) para todas las poblaciones, por tanto, el análisis posee alta precisión, en concordancia a lo expresado por Aranguren-Méndez (2002), es improbable que no se detecte una paternidad errónea con este tipo de análisis en las poblaciones y condiciones consideradas.

Cuadro 6. PE1 para cada población de cerdos Criollos venezolanos y razas comerciales.

Marcador	Masa ²	EISO ³	Aris ⁴	Guay ⁵	Capa ⁶	Cuna ⁷	Land ⁸	LaWh ⁹
S0005	0,321	0,292	0,292	0,476	0,367	0,323	0,345	0,393
S0155	0,398	0,439	0,471	0,370	0,295	0,478	0,453	0,379
S0218	0,612	0,471	0,409	0,311	0,552	0,338	0,331	0,106
S0225	0,602	0,476	0,479	0,343	0,533	0,458	0,618	0,498
SW24	0,449	0,478	0,563	0,342	0,269	0,338	0,424	0,517
SW240	0,362	0,342	0,414	0,541	0,454	0,245	0,412	0,410
SW632	0,481	0,338	0,433	0,394	0,471	0,399	0,403	0,266
SW857	0,334	0,424	0,409	0,132	0,444	0,393	0,338	0,157
SW911	0,532	0,459	0,515	0,459	0,367	0,479	0,466	0,466
SW936	0,496	0,365	0,326	0,326	0,295	0,492	0,185	0,348
PEC¹	0,999	0,999	0,998	0,995	0,995	0,997	0,997	0,993

¹Probabilidad de exclusión combinada, descartando los loci S0215, S0227 y SW951. ²Masaguaral. ³El Socorro.

⁴Arisemendi. ⁵Guayabal. ⁶Capanaparo. ⁷Cunaviche. ⁸Landrace. ⁹Large White.

Tales precisiones han sido reportadas en asnos, cerdos, vacunos, ovinos, aves y camélidos usando distintos paneles de microsatélites (Aranguren-Méndez 2002, Rodríguez *et al.* 2004, Fan *et al.* 2005, Martínez *et al.* 2005a, Delgado *et al.* 2005, Arellano *et al.* 2007, Arellano 2008, Vicente *et al.* 2008, Calvo *et al.* 2009, Delgado *et al.* 2006, Tobaruela 2011, Yu *et al.* 2015, Jan y Fumagalli 2016, Pei *et al.* 2018).

CONCLUSIONES

Se detectó alta riqueza alélica en las poblaciones estudiadas, la cual es corroborada por la alta variabilidad expresada por los valores de heterocigosidad tanto observada como esperada.

Por otra parte, de los 13 microsatélites utilizados se comprobó que 10 de estos tienen la utilidad y precisión necesaria para realizar pruebas de paternidad y registros genealógicos en los cerdos Criollos venezolanos, utilizando la herramienta de la probabilidad de exclusión.

LITERATURA CITADA

Aranguren-Méndez, J; Román-Bravo, R; Isea, W; Villasmil, Y; Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación:

una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 13(1):30-42.

Aranguren-Méndez, J. 2002. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 213 p.

Arellano, W. 2008. Asignación de paternidad en sistemas de producción de bovinos de carne mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis Maestría. Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 49 p.

Arellano, W; Sifuentes, A; Parra, G; Garcidueñas, R. 2007. Evaluación en ganado Braford de los marcadores microsatélites sugeridos por FAO/ISAG para pruebas de paternidad (en línea). *In* Congreso Latinoamericano de Producción Animal (20, Cusco, Perú). Memoria, Cusco, Perú, ALPA. Consultado 15 may. 2018. Disponible en <http://bit.ly/36FrQrX>

Ayagirwe, RBB; Meutchieye, F; Manjeli, Y; Maass, BL. 2018. Production systems, phenotypic and genetic diversity, and performance of cavy reared in sub-Saharan Africa: a

- review (en línea). *Livestock Research for Rural Development* 30(6). Consultado 04 may. 2018. Disponible en <http://bit.ly/2PMO84o>
- Badan, A. 2003. Ganho com seleção e diversidades genéticas: medidas para monitorar o melhoramento populacional de arroz. Tesis Doctorado. Campiñas, Brasil; Universidade Estadual de Campiñas. 100 p.
- Behl, R; Behl, J; Tantia, M; Nahardeka, N; Das, G; Sajeev, K; Vijh, R. 2017. Evaluation of 24 microsatellite markers for parentage exclusion in three indigenous pig types of India. *The Indian Journal of Animal Sciences* 87(4):443-446.
- Calvo, SJ; Martínez, E; Tirado, JF; Corrales, JD; Montoya, AE; Burgos, WO; Cerón-Muñoz, MF; Moreno, M. 2009. Caracterización genética de las razas criollas BON y Romosinuano (en línea). *Livestock Research for Rural Development* 21(4). Consultado 22 feb. 2015. Disponible en <http://bit.ly/2S0wqNs>
- Chang, WH; Chu, HP; Jiang, YN; Li, SH; Wang, Y; Chen, CH; Chen, KJ; Lin, CY; Ju, YT. 2009. Genetic variation and phylogenetic of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers. *Journal of Animal Science* 87(1)1-8.
- Cortés, O; Martínez, AM; Cañon, J; Sevane, N; Gama, LT; Ginja, C; Landi, V; Zaragoza, P; Carolino, N; Vicente, A; Sponenberg, P; Delgado, JV for the BioPig Consortium. 2016. Conservation priorities of Iberoamerican pig breeds and their ancestors based on microsatellite information. *Heredity* 117:14-24.
- Costa, V; Pérez-González, J; Santos, P; Fernández-Llario, P; Carranza, J; Zsolnai, A; Anton, I; Buzgó, J; Varga, G; Monteiro, N; Beja-Pereira, A. 2012. Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes* 5:479.
- Delgado, R; Torrentó, N; Trilla, N; Collell, E; Ballester, J; Tibau, J. 2005. Aplicación de microsatélites en la identificación genética de reproductores y en el estudio de parentesco en poblaciones porcinas de selección de las razas Pietrain y Duroc (en línea). *In Jornadas sobre producción animal* (11, Zaragoza, España). Memoria, Zaragoza, España, AIDA. Consultado 25 oct. 2009. Disponible en <http://bit.ly/35wWt2M>
- Delgado G, R; Trilla, N; Torrentó, N; Tibau, J. 2006. La identificación genética y análisis de parentesco de cerdos reproductores de raza porcina selecta (en línea). 3tres3.com Comunidad Profesional Porcina. Consultado 10 oct. 2010. Disponible en <http://bit.ly/34sc7v1>
- Fan, B; Chen, YZ; Moran, C; Zhao, SH; Liu, B; Yu, M; Zhu, MJ; Xiong, TA; Li, K. 2005. Individual-breed assignment analysis in swine populations by using microsatellite markers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 18(11):1529-1534.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome, Italy. No. 9.87 p.
- Galíndez, R; Ramis, C; Ángulo, L. 2011. Exploración inicial de la diversidad genética del cerdo Criollo venezolano usando RAPD. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)* 37(2):55-63.
- Galíndez, R; Ramis, C; Martínez, G; Ángulo, L; Bedoya, A; de Farías, Y. 2016. Variabilidad genética de seis poblaciones del cerdo Criollo venezolano usando marcadores microsatélites. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)* 42(2):91-100.
- Hames, BD; Rickwood, D. 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press, Oxford and Washington D.C. USA. p.1-9.
- Jan, C; Fumagalli, L. 2016. Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae) (en línea) *PeerJ* 4:e2416. Consultado 04 feb. 2018. Disponible en <https://peerj.com/articles/2416/>
- Kalinowski, S; Taper, M; Marshall, T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success

- in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1006.
- Landi, V; Negro, JJ; Vega-Pla, JL; Gortázar, C; García-Aznar N, JM; Delgado B, JV; Martínez M, A. 2011. Caracterización genética del Jabalí de la Estación Biológica de Doñana. *Archivos de Zootecnia* 60(231):373-376.
- Li, SJ; Yang, SL; Zhao, SH; Fan, B; Yu, M; Wang, HS; Li, MH; Liu, B; Xiong, TA; Li, K. 2004. Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. *Journal of Animal Science* 82(2):368-374.
- Marshall, TC; Slate, J; Kruuk, LE; Pemberton, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5):639-655.
- Martínez, AM; Calderón, J; Camacho, E; Rico, C; Vega-Pla, JL; Delgado, JV. 2005a. Caracterización genética de la raza bovina Mostrenca con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 54(206-207):357-361.
- Martínez, AM; Pérez-Pineda, E; Vega-Pla, JL; Barba, C; Velázquez, FJ; Delgado, JV. 2005b. Caracterización genética del cerdo Criollo Cubano con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 54:(206-207):369-375.
- Montenegro, M. 2012. Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha de Uruguay (en línea). Tesis M.Sc. Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. 118 p. Consultado 18 jul. 2018. Disponible en [http:// bit.ly/34yeyMH](http://bit.ly/34yeyMH)
- Pardo, E; Cavadía, T; Meléndez, I. 2014. Microsatellite characterization of the Momil, Cordoba (Colombia) domestic pig. *Archivos de Zootecnia* 63(241):215-218.
- Pardo, E; Cavadía, T; Meléndez, I. 2015. Genetic diversity of domestic pigs in Tierralta (Colombia) using microsatellites. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 28(3):272-278.
- Pei, J; Bao, P; Chu, M; Liang, C; Ding, X; Wang, H; Wu, X; Guo, X; Yan, P. 2018. Evaluation of 17 microsatellite markers for parentage testing and individual identification of domestic yak (*Bos grunniens*). (en línea). *PeerJ* 6:e5946. Consultado 04 may. 2018. Disponible en <https://peerj.com/articles/5946/>
- Pérez, E. 2005. Caracterización genética del cerdo Criollo cubano utilizando marcadores moleculares. In Congreso Centroamericano y del Caribe de Porcicultura (7, 2005, La Habana, Cuba). Taller Internacional Sobre el Cerdo Criollo de Origen Ibérico (2, 2005, La Habana, Cuba). p. 569-575
- Revidatti, M. 2009. Caracterización de cerdos Criollos del nordeste argentino. Tesis Doctoral. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 259 p.
- Revidatti, MA; Delgado-Bermejo, JV; Landi-Periati, V; Ginja, C; Álvarez, LA; Veja-Pla, JL; Martínez, AM; Biopig Consortium. 2014. Genetic characterization of local Criollo pig breeds from the Americas using microsatellite markers. *Journal of Animal Science* 92(11):4823-4832.
- Riojas, VM; Gómez, JC; Salinas, JA; Montes De Oca, R; Wong, A. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *Ciencia UANL* IX(1):41-50.
- Rodríguez, J; Wheeler, JC; Dodd, CS; Bruford, MW; Rosadio, R. 2004. Determinación de parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélite. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 15(2):113-119.
- Sharma, R; Kishore, A; Mukesh, M; Ahlawat, S; Maitra, A; Kumar, A; Sudan, M. 2015. Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers (en línea). 2015. *BMC Genetics* 16:73. DOI 10.1186/s12863-015-0221-0. Consultado 04 abril 2018. Disponible en [http:// bit.ly/35vWXGp](http://bit.ly/35vWXGp)
- Sifuentes, AM; Parra, GM; de la Rosa XF; Sánchez, A; Serrano, F; Rosales, J. 2006. Importancia de las pruebas de paternidad basadas en microsatélites para la evaluación genética de ganado de carne en empadre múltiple. *Técnica Pecuaria en México* 44(3):389-398.

- Thuy, NTD; Melchinger-Wild, E; Kuss, AW; Cuong, NV; Bartenschlager, H; Geldermann, H. 2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *Journal of Animal Science* 84:2601-2608.
- Tobaruela, M. 2011. Avances del programa de selección/conservación de la oveja roja Mallorquina. Tesis M.Sc. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 39 p.
- Vicente, AA; Carolino, MI; Sousa, MC; Ginja, C; Silva, FS; Martínez, AM; Vega-Pla, JL; Carolino, N; Gama, LT. 2008. Genetic diversity in native and commercial breeds of pigs in Portugal assessed by microsatellites. *Journal of Animal Science* 86(10):2496-2507.
- Yalta, C; Sotil, G; Veli, E. 2014. Variabilidad genética y detección de error en filiación utilizando microsatélites en dos rebaños de alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*). *Salud y Tecnología Veterinaria*: 2(2):134 -145.
- Yu, GC; Tang, QZ; Long, KR; Che, TD; Li, MZ; Shuai, SR. 2015. Effectiveness of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for parentage analysis in European domestic pigs. *Genetics and Molecular Research* 14(1):1362-1370