

Juan Menéndez Fernández

Estructura genética de la raza porcina Gochu Asturcelta

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los
Alimentos

Director/es

Alvarez Fernandez, Maria Isabel
Goyache Goñi, Félix

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA RAZA PORCINA GOCHU ASTURCELTA

Autor

Juan Menéndez Fernández

Director/es

Alvarez Fernandez, Maria Isabel
Goyache Goñi, Félix

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2017



**Universidad
Zaragoza**

Tesis Doctoral

***“Estructura genética de la raza porcina Gochu
Asturcelta”***

Juan Menéndez Fernández

Directores

Félix Goyache Goñi

Isabel Álvarez Fernández

Tutor

Juan Altarriba Farrán

Facultad de Veterinaria

Programa de Doctorado en Producción Animal

2017



**Universidad
Zaragoza**

Tesis Doctoral

“Estructura genética de la raza porcina Gochu Asturcelta”

Juan Menéndez Fernández

Facultad de Veterinaria

Programa de Doctorado en Producción Animal

2017

Este trabajo ha sido realizado con la autorización expresa de la Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA) y se ha realizado en el marco del Convenio de Colaboración suscrito entre ACGA y el Gobierno del Principado de Asturias. El Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA ha recibido financiación de la Consejería de Economía y Empleo del Principado de Asturias mediante la ayuda GRUPIN14-113 GENEREPRO.



Asociación Criadores Gochu Asturcelta

670 36 69 66 • gochuasturcelta@gmail.com

DECLARACION DE INTERÉS Y AUTORIZACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DE UN PROYECTO DE TESIS DOCTORAL SOBRE LA RAZA PORCINA GOCHU ASTURCELTA

José Manuel Iglesias Fernández, con DNI Nº 11436331-H en calidad de Presidente de la Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (en adelante ACGA) desea hacer constar ante quien proceda:

1. Que ACGA conoce el interés de D. Juan Menéndez Fernández para la realización de una Tesis Doctoral, con la dirección de los Dres Félix Goyache e Isabel Álvarez del SERIDA, sobre la raza Gochu Asturcelta con el título provisional de "Estructura genética de la raza porcina Gochu Asturcelta".
2. Que ACGA considera que la ejecución de la citada Tesis Doctoral es de interés para la asociación y para la ejecución del programa de conservación del Gochu Asturcelta.
3. Que en consecuencia, declaramos expresamente nuestro interés en la realización de la misma autorizando al doctorando y sus directores a la utilización de los registros del Libro Genealógico y muestras del banco de Germoplasma de la raza que sean necesarios para su realización.

Esta autorización se condiciona al reconocimiento de la colaboración prestada por ACGA para la realización de los trabajos necesarios para realizar la Tesis Doctoral en cuantos trabajos, artículos, documentos o comunicaciones se deriven de la misma



En Avilés, a 23 de octubre de 2014

Agradecimientos

Bufff, que momento; posiblemente me enfrente a la página que más me va a costar rematar, sobre todo porque en el resto el trabajo de Félix e Isabel junto con Iván, y el resto del personal del departamento han hecho que el trabajo haya sido muy agradable.

Vamos a la faena.

Pienso que en la vida de todos existe una parte personal y otra profesional que afortunadamente a veces se entremezcla. Creo que debo realizar dos tipos de agradecimientos, unos personales y otros profesionales, son diferentes, complementarios y no excluyentes.

Comencemos con los personales:

a Papi y Mami, con ellos empezó casi todo.

a mis Padres: luchadores, trabajadores, honrados, honestos, buenos, generosos, y todavía no me explico cómo se las arreglaron para sacarnos a los tres...

a mis hermanos; ¡que bien nos lo pasamos y nos lo seguimos pasando juntos!; nos quedan todavía un montón de conciertos de Sabina.

a Elena, hay quien piensa que lo nuestro tiene mucho mérito, es fácil con gente como ella, Pepa y Jose Carlos tienen mucha de la “culpa”.

A Jorge y Alicia, son los que tienen que recoger el testigo de dos grandes familias. Lo de los fíos ye algo que por mucho que intentes explicarlo no hay manera.

Hay una gran cantidad de personas que a lo largo de mis casi 50 años de una manera u otra han dejado huella en mí, pero hay dos que están aunque no los podemos ver y que especialmente me gustaría recordar: Andréseldemariaester. Es sorprendente después de más de 30 años como recuerdo la mecedora donde Andrés me dijo todo lo que necesitaba ser

dicho cuando le dije que tenía la intención de estudiar veterinaria, y el sabor del vino de Grandas.

Nacho Cruz, ijodo maño, como te echo de menos en la clínica diaria!. Profesor y maestro veterinario, bellísima persona, humilde, con las ideas claras y ayudando a todo el que se lo pedía. La vida fue injusta privándonos de la compañía física de ambos tan pronto.

Hay más gente, claro que la hay, el tío Arturo, la tía Nieves...

A mis amigos, los de verdad, esos que se cuentan con los dedos de una mano, ellos saben quién son, en Gijón, en Zaragoza; es fantástico ver cómo pasa el tiempo y seguimos reuniéndonos a tomar algo como si el tiempo no hubiera pasado...

Ahora los profesionales:

A Félix e Isabel, gracias por su confianza en mis posibilidades. Su guía en la realización de la tesis ha sido de tal maestría que han hecho que el camino haya sido fácil y placentero pese a la complicación que para ellos sé que supone trabajar con un veterinario más rural que científico.

Al resto del Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA; muy especialmente a Iván, sin él, imposible.

Al resto de trabajadores del SERIDA que trabajan con el Gochu Asturcelta.

A Carlos Méndez "el de ASCOL", necesitamos más gente como él. Buen jefe, mejor persona, justo, leal, compañero. Es un verdadero placer trabajar con él y para él.

Al montón de compañeros con los que día a día nos batimos el cobre y compartimos vivencias de esta magnífica profesión.

A todos los ganaderos de Gochu Asturcelta; representan al grupo de gente preocupada por el futuro, por las cosas ahora pequeñas que en el pasado fueron fundamentales para llegar hasta dónde estamos y que debemos conservar para generaciones venideras. Muy especialmente a todas las juntas directivas de la asociación; cada una con sus particularidades pero todas ellas luchando por evitar la extinción de nuestra raza autóctona. Me consta que hay muy pocas personas conscientes del esfuerzo económico, pero sobre todo humano y personal, que todos los miembros de las diferentes juntas directivas realizaron y realizan. A todos ellos muchas gracias por confiar en mi trabajo.

Por último, “no hay mayor desprecio que no hacer aprecio”; esta tesis doctoral es el fruto de un trabajo desarrollado mirando al futuro y en positivo, no quiero estropearlo con un nombre o hechos que retrasaron años esta tesis doctoral debido a su escasa capacidad (profesional y como persona), su odio, su rencor y su nulidad absoluta como ser humano. Espero que el tiempo y la justicia lo pongan en su sitio.

Índice

1. Introducción	13
2. Revisión Bibliográfica	23
2.1. La raza porcina Gochu Asturcelta	25
2.1.1. Perspectiva histórica	25
2.1.2. Origen del ganado porcino	30
2.1.3. descripción morfológica: <i>Prototipo racial</i>	32
2.2. Programas de conservación.	34
2.2.1. Importancia	34
2.2.2. El programa de Conservación del Gochu Asturcelta	36
2.2.3. El Libro Genealógico del Gochu Asturcelta	39
2.2.4. El núcleo de multiplicación del Gochu Asturcelta	43
2.3. Herramientas para la conservación de la variabilidad genética	46
2.3.1. Información de pedigrí	46
2.3.2. Marcadores moleculares	55
2.3.3. Información molecular	59
3. Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed	65
4. Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation	71
5. Genetic characterization of the endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: insights for the composition of the Iberian native pig stock	83
6. Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered Gochu Asturcelta pig breed	99

7. Resultados y Discusión	113
7.1. Multipaternidad en ganado porcino	115
7.1.1. Resultados obtenidos	115
7.1.2. Importancia para el programa de conservación	116
7.2. Política de apareamientos en la raza Gochu Asturcelta.....	118
7.2.1. Resultados obtenidos	118
7.2.2. Comparación con otros escenarios de conservación	121
7.2.3. Importancia para el programa de conservación	122
7.3. Relaciones genéticas de la raza porcina Gochu Asturcelta en el contexto ibérico	124
7.3.1. Resultados obtenidos	126
7.3.2. Relaciones genéticas y diferenciación del Gochu Asturcelta con las poblaciones porcinas de su entorno	127
7.3.3. Importancia para el programa de conservación	130
7.4. Utilidad de la información molecular en la estimación del tamaño efectivo en poblaciones ganaderas	131
7.4.1. Resultados obtenidos	132
7.4.2. Utilidad de las estimas moleculares del tamaño efectivo en pedigrís con generaciones solapadas	134
7.4.3. Importancia para el programa de conservación	136
7.5. Perspectivas de futuro.....	138
8. Conclusiones.....	141
9. Bibliografía.....	145
10. Resumen	161
11. Sumary.....	167



1. Introducción

Desde la última década del siglo XX se asume que la conservación de las razas autóctonas de animales domésticos se basa en los siguientes criterios (Hodges 1992; Simon 1999): a) económicos o productivos; b) científicos; y c) históricos o culturales. Las razones subyacentes a esos criterios asumen que una raza ganadera que hoy se considera de utilidad limitada puede ser interesante en el futuro y que de su estudio o investigación pueden desprenderse resultados de interés general. Los animales domésticos, y la diversidad que ellos representan, se han desarrollado en el curso de 12.000 años de domesticación, siendo el resultado de la selección realizada por las comunidades humanas y de su adaptación a nuevos ambientes. Las poblaciones locales o minoritarias de animales domésticos pueden constituir la base sobre la que desarrollar sistemas de producción sostenibles y la clave para evitar amenazas de seguridad alimentaria. Por otra parte, en sociedades desarrolladas como las europeas los componentes de arraigo cultural suponen un argumento fundamental para el aprecio social de las iniciativas de conservación.

En 1992, la FAO crea la Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos (WWL-DAD), como parte del Sistema Global de Vigilancia de los Recursos Genéticos de Animales de Granja para la identificación de aquellos recursos genéticos de animales domésticos que están en riesgo de perderse. La WWL-DAD pretende servir de catalizador para frenar y revertir la tendencia a la erosión de la diversidad genética en los animales domésticos. En la tercera edición de la lista (WWL-DAD:3; Scherf 2000) se define “raza” como un grupo homogéneo, subespecífico, de animales domésticos que poseen características externas definidas e identificables que permiten distinguirlos a simple vista, de otros grupos definidos de la misma manera en la misma especie.

España no escapa a esta corriente conservacionista internacional. En nuestro país existe desde el último cuarto del siglo XX una vigorosa demanda social que promueve la conservación de las razas locales como consecuencia de la despoblación de amplias zonas rurales, la intensificación de las producciones ganaderas y la introducción de razas foráneas especializadas. Tras la firma del Instrumento de Ratificación de 16 de

noviembre de 1993 del Convenio sobre la Diversidad Biológica de Río de Janeiro, de 5 de junio de 1992, se dicta el Real Decreto 1682/1997 de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, como instrumento legal para la consecución de los fines previstos y, finalmente, el Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa Nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas y que incluye como Anexo I el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España. Asimismo, en la primera década del siglo XXI el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) instrumentó Planes de Actuación 2004-2007 en Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos y Zoogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, incluyendo una línea de ayudas dentro del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias del Plan Nacional de I+D+I (2004-2007). Estos Planes de Actuación constituyeron una iniciativa fundamental para la caracterización y promoción de una gran cantidad de razas, variedades y ecotipos autóctonos de las diferentes especies de animales domésticos y para garantizar la disponibilidad de los genotipos necesarios para la mejora genética. Asimismo, en el marco de esas iniciativas se desarrollaron las técnicas que se han aplicado en la presente memoria.

La conservación del Gochu Asturcelta es una iniciativa más dentro de este gran proyecto social. El cerdo asturiano, Gochu Asturcelta o *gochu l'país*, fue durante siglos un pilar fundamental en la economía de las ganaderías asturianas y fuente importante de proteína en la dieta de las familias (Álvarez Sevilla 2001, 2005). Su carácter dócil, rústico, productivo y de fácil adaptación a un medio como el asturiano, agreste y húmedo con épocas de escasez de alimentos, fueron durante cientos de años las herramientas en la que sustentó su supervivencia en las caserías asturianas, constituyendo uno de los más importantes aportes de alimento. En una sociedad rural en la que la ganadería principal estaba constituida por rumiantes, vacas principalmente, pero también ovejas y cabras, el cerdo era un complemento que ayudaba a mantener la biodiversidad y el aprovechamiento racional de los alimentos obtenidos de pastos y montes

con la máxima eficiencia. Esta situación se mantuvo hasta aproximadamente la mitad del pasado siglo XX (Aparicio 1944). Paradójicamente, sus características productivas le permitieron ser el artífice del arranque de una floreciente industria chacinera que fue, en última instancia, responsable de su regresión tanto en censo como en distribución geográfica.

Además de su interés histórico y cultural en Asturias, la importancia de la conservación del Gochu Asturcelta está plenamente justificada en términos estrictos de conservación de la diversidad ya que es uno de los pocos representantes del tronco porcino de estirpe celta de la Península Ibérica que fue mayoritario en España y Portugal hasta mediados del siglo XX (Aparicio 1944; Sotillo y Serrano 1971). Las razas porcinas de tronco celta de la Península Ibérica reconocidas por las diferentes administraciones públicas son el cerdo Bísaro portugués (Beja-Pereira *et al.* 2001) y el Porco Celta de Galicia (Carril *et al.* 2001). Por otra parte, las razas célticas de Chato Baztanés y Chato Vitoriano se encuentran extintas. Existen iniciativas de recuperación en el País Vasco y en Navarra de la población de cerdo Vasco (*Euskal txerria*), también conocida en Francia como *Porc Basque* (Gómez *et al.* 2003). Otras razas porcinas pertenecientes al mismo tronco celta (Santos e Silva *et al.* 2008) están representadas en Francia con la *craonesa*, la *normanda*, la *bretona*, la *alsaciana*, la *meusiana* y la *champanoise*. En Bélgica: la *flamenca*, la *hesbignon* y la *ardanesa*. En Dinamarca: el *Jutland* y el *seeland*. En Rusia la *polonesa*. En Suiza el *Schwyzoise*, en situación muy crítica. En Alemania, Suecia, Noruega, Austria y Hungría también existen razas con origen en el tronco celta.

El inicio de la recuperación del Gochu Asturcelta (Álvarez Sevilla 2005; Argamentería y Menéndez 2012; Menéndez, 2012) comienza en la década de los 80 cuando un grupo de personas interesadas en la recuperación de las razas autóctonas del Principado de Asturias recorren multitud de aldeas asturianas, principalmente en los municipios de Allande, Illano, Cangas del Narcea y Belmonte de Miranda, buscando los últimos ejemplares de cerdo Asturcelta. Este esfuerzo fue realizado sin ayuda, ni financiera ni de infraestructuras ni logística, por parte de las administraciones públicas y

con la incomprensión por parte de muchos de los ganaderos propietarios de estos últimos animales que muchas veces no eran conocedores del estado crítico en el que se encontraba la raza, lo que dio lugar a que no pudieran ser recuperados muchos de los ejemplares que todavía existían aquellos años. En 1998 comienza la recuperación de forma reglada con un reducido número de criadores, que poco a poco van incrementando el número de efectivos, hasta que a finales del 2002 inicia su andadura la Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA). En el año 2003 todos los propietarios de Gochu Asturcelta se integran en la asociación y establecen un primer censo de 22 animales, 8 verracos y 14 hembras. Comienzan también las conversaciones con el Gobierno del Principado de Asturias para establecer un Plan de Recuperación y Conservación de la raza Gochu Asturcelta y el trabajo de caracterización preliminar mediante información molecular. Con la información recogida se establece el vigente Programa Integral de Recuperación del Gochu Asturcelta a desarrollar por parte de la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias, el SERIDA y ACGA. Este Plan de Recuperación, Conservación y Promoción de la raza Gochu Asturcelta es el que se contempla en el convenio de colaboración suscrito a mediados del año 2005 entre ACGA y la Consejería de Medio Rural y Pesca con la participación del SERIDA con los siguientes objetivos:

1. Evitar la desaparición definitiva de la raza mediante la constitución de un núcleo de multiplicación.
2. Mejorar el conocimiento sobre la raza y sus producciones.
3. Establecer las bases para la creación y mantenimiento del libro genealógico de la raza.
4. Conseguir la recuperación del censo, promoviendo la cría en pureza y la difusión de esta raza entre las explotaciones ganaderas.

5. Asegurar la conservación de material genético que permita mantener una reserva de recursos y variabilidad genética.

Las acciones de conservación tienen como finalidad el mantenimiento del patrimonio genético de las poblaciones amenazadas. Sin embargo, en razas de censo reducido es frecuente no poder realizar apareamientos entre animales no emparentados, lo que provoca un aumento de la endogamia, disminución del tamaño efectivo de la población y pérdida de variabilidad genética (Falconer y Mackay 1996). Consecuentemente, una de las primeras etapas para llevar a cabo un programa de conservación, consistiría en la monitorización de su variabilidad genética (Goyache *et al.* 2003) y la distribución de ésta entre sus poblaciones, así como la posible detección de alelos raros que nos indicaran la presencia de variantes genéticas únicas. La fundación de ACGA ha permitido un cambio en la situación de la raza que cuenta actualmente con un mayor número de reproductores que permite asegurar el mantenimiento de la población. Sin embargo, la variabilidad genética que representan es muy limitada, por lo que resulta necesario instrumentar medidas que aseguren la viabilidad de la población.

El objetivo general de las actividades llevadas a cabo por ACGA dentro del programa de conservación de la raza pretende evaluar las políticas de apareamientos puestas en marcha para el mantenimiento de la variabilidad genética de la población así como conocer el grado de diferenciación del Gochu Asturcelta con otras poblaciones porcinas de su entorno. Para cumplir con ese objetivo general, que está en la base de la presente Memoria, se ha realizado el siguiente compendio de publicaciones científicas:

Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., de la Roza, B. y Goyache F.
Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig

breed. Archives of Animal Breeding, 2015, Volume 58, 217-220. doi:10.5194/aab-1-1-2015

Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I. y Goyache, F. Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation. Czech Journal of Animal Science, 2016a, Volume 61, 140-143. doi: 10.17221/8787-CJAS

Menéndez, J., Goyache, F., Beja-Pereira, Fernández, I., Menéndez-Arias, N.A., Godinho, R. y Álvarez, I. (2016) Genetic characterization of the endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: insights for the composition of the Iberian native pig stock. Livestock Science, 2016b, Volume 187, 162-167. doi:10.1016/j.livsci.2016.03.013

Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., Menéndez-Arias, N.A. y Goyache, F. (2016) Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered Gochu Asturcelta pig breed. Ecology and Evolution, 2016c, Volume 6, 4971-4980. doi: 10.1002/ece3.2240

En todo caso, estos trabajos han sido llevados a cabo en conexión con otros no incluidos en la presente Memoria, como son:

Menéndez, J. y Goyache, F. Analysis of preweaning growth traits in Gochu Asturcelta piglets. Archivos de Zootecnia, 2011, Volume 60, 337-340.

Menéndez, J., 2012. La asociación de criadores de Gochu Asturcelta. En: Manual del Gochu Asturcelta (Ed. A. Argamentería). Asturgraf, Oviedo (Asturias) pp. 29-34. ISBN:978-84-695-3049-8.

Argamentería, A., Menéndez, J., 2012. La recuperación del Gochu Asturcelta. En: Manual del Gochu Asturcelta (Ed. A.

Argamentería). Asturgraf, Oviedo (Asturias) pp. 35-46. ISBN:978-84-695-3049-8.

De la Roza-Delgado B., Cueto M.A., Menendez J., Argamenteria A. Preliminary results of productivity of Gochu Asturcelta's breed in semiextensive systems. Series A: Mediterranean Seminars 2012 Number 101 7th International Symposium on the Mediterranean Pig 14-16/10/2010 pp 219-225.

Vieira C., Martínez B., Fernández A.M., Sánchez C.I., Rubio., Menendez J., Gochu Asturcelta semiextensive production: Carcass and meat quality and fatty acid profile. Series A: Mediterranean Seminars 2012 Number 101 7th International Symposium on the Mediterranean Pig 14-16/10/2010 pp 487-493.

En consonancia con los trabajos publicados en revistas internacionales indexadas, el planteamiento de esta Memoria se inicia realizando estudios para la evaluación de herramientas moleculares y genealógicas que permitan una buena gestión del pedigrí del Gochu Asturcelta, se continúa mediante la evaluación del grado de diferenciación de la raza con las razas porcinas más importantes de su entorno geográfico para finalizar testando la utilidad de metodologías basadas en información molecular para la determinación del tamaño efectivo en pequeñas poblaciones.



2. Revisión Bibliográfica

2.1. La raza porcina Gochu Asturcelta

2.1.1. Perspectiva histórica

La cría de cerdo ha sido una constante en el territorio cantábrico que hoy conocemos como Asturias. Los primeros datos de los que disponemos son los obtenidos en las excavaciones arqueológicas realizadas en el castro de la Campa de Torres (Gijón) y en el castro de Cellagú (Oviedo) con 766 restos pertenecientes a 65 ejemplares en el primer caso y restos de 33 ejemplares en el segundo.

También son numerosas las referencias históricas acerca de la presencia de los cerdos en la región:

Estrabón habla de excelentes jamones del cerdo cantábrico que hacían competencia a los de Cerretania (Cerdeña).

En el documento de fundación del Monasterio de Oubona (Tineo) , fechado en el 780 aparecen inventariados *“duodecim porcos et quatuor porcas”*.

En 1604 en el Libro Tumbo del Monasterio de Balmonte (Miranda) aparece una referencia al precio de los carneros y los cerdos: *“... y las marranas [valen] ocho y nueve reales y cada día valdrán más...”*.

En 1622, Luis de Valdés en sus *“Memorias de Asturias”* dice: *“Hay gran abundancia de jabalíes y, por los montes está lleno de cerdos, criados con la bellota de roble y castañas, a causa de lo cual es sabrosísimo su tocino cocido, porque es hebra, pero no es tan bueno para ser asado, pues no tiene el grosor del de Castilla”*.

En 1711 Fray Toribio de Pumarada y Toyos, en el municipio de Colunga, escribe el tratado geopónico titulado *“Arte General de Granjerías”*, donde en el capítulo cuarto alude al manejo del ganado porcino bajo el epígrafe *“Grangería del ganado cerduno”* donde se puede reconocer al gochu asturcelta como *“lanudo”*, *“de la tierra”*: *“... debes tener cerdo de tres géneros. Castellanos finos,*

mestizos y lanudos aí de la tierra. Pero de todos nunca pases del número de cabezas que puedas bien sustentar, ya con las castañas, ya con el boruyo, ya con el fariellu, ya con el grano, etc. Y por más rico que te veas, nunca pases de dos castellanas finas parideras. Dos mestizas. Y cuatro lanudas”; hace recomendaciones también para obtener buenos cerdos cruzados y advierte que los mestizos y lanudos “... nunca debe ser de color blanco, sino negro, pezo o brazado; y ninguno bermejo.”. También describe el manejo extensivo en el que se produce la cría de los cerdos: “se deben de traer de invierno al monte, y de verano al puerto, en un rebaño, con zagalejo y perrillo cuando fuere necesario. Y en el puerto, junto al cabanín, y en el monte junto a alguna cabaña, se les debe hacer su cobil”; recomienda también que se guarde por las noches y que se lleve a los castañedos en el otoño para aprovechar las castañas y se tenga paciando todo el año.

En las *Ordenanzas Concejiles* de Arenas de Cabrales del año 1726, en el capítulo 12, se recoge como eran escogidos entre todos los cerdos jóvenes cuatro de ellos para padrear.

En la mayor parte de las parroquias de Asturias, y desde el siglo XVIII, las Juntas Vecinales dictaban normas sobre el manejo de los cerdos para que se les colocara un alambre o palo y así no pudieran hozar por el monte.

En 1805 Francisco de Paula Caveda y Solares escribe su “*Descripción geográfica del Concejo de Villaviciosa*” en donde se refleja la importancia que para municipios como Villaviciosa tenía en esta época el cerdo celta o “*del país*”, destacando el hecho de que en los mercados que se desarrollaban en los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero se vendiera gran número de ellos para concejos limítrofes así como para Castilla y Extremadura principalmente. Los que no se vendían se sacrificaban y los jamones y las hojas de tocino se salaban y se vendían en las ferias de marzo en cantidad siempre superior a cincuenta mil libras. La

venta de estos productos transformados y del ganado en pie es valorado por Francisco de Paula en más de medio millón de reales.

En 1859 el Dr. Pascual Pastor y López, publica su libro titulado "*Apuntes sobre la Fauna Asturiana*"; al hablar del cerdo comenta que "*...no hay familia en las aldeas que no crie por lo menos un par de ellos*".

En el siglo XX, ya existen publicaciones que hablan con más detalle de las características morfológicas de los animales de raza asturiana y corrobora las anotaciones ya citadas de su adaptación al manejo extensivo; así en 1917, Santos Arán en su tratado "*Ganado de Cerda. Explotación e industrialización del cerdo*" concluye que la raza que principalmente forma la ganadería de porcino asturiana está constituida por animales de la raza céltica de color negro y con excelente proporción de carne. Su descripción morfológica habla de animales de gran cabeza, orejas muy alargadas, prolongadas y péndulas, ojos pequeños y brillantes, capa negra y pelo no muy largo, dorso convexo, buena amplitud del tercio posterior, cuerpo aplanado y piernas regularmente largas.

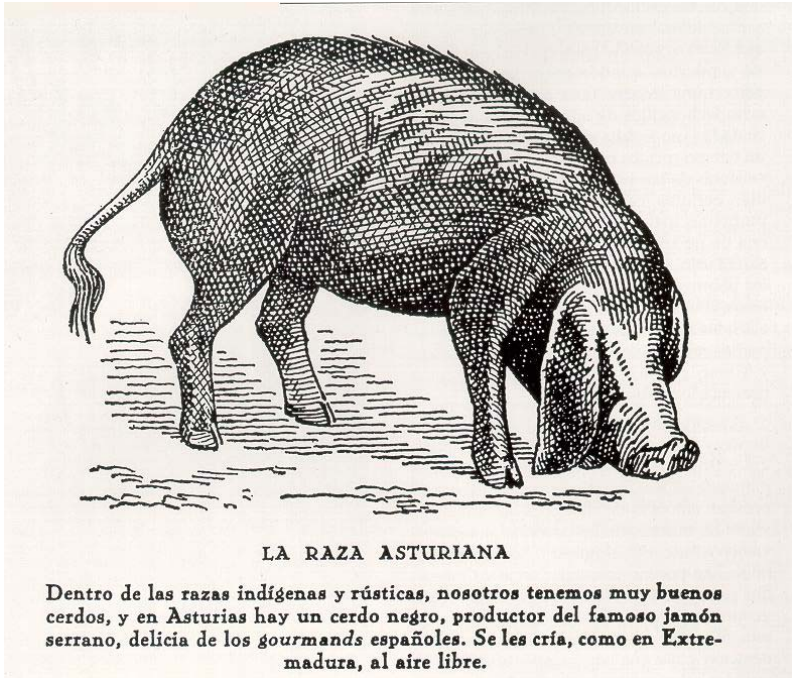
En 1923 la "*Topografía Médica del Concejo de Illas*" refleja que el cerdo de la comarca es negro y *pezu* (con manchas) y que alcanza los 160 kg a la edad de un año.

En 1944 Aparicio publica su obra "*Zootecnia especial. Etnología compendiada*" en la que aunque con algunas imprecisiones se realiza una primera descripción de la raza. Aparicio describe así la *Raza asturiana*: "*es la región asturiana, en relación con su total superficie y en cuanto al ganado porcino se refiere, una de las más intensamente pobladas de España, contribuyendo a ello su próspera industria chacinera, incrementada a favor de la calidad de sus productos, jamones especialmente, reconocidos como de alta calidad. Esta densa población porcina, distribuida en la totalidad de sus partidos judiciales, pertenece desde antiguo a un tipo combinado,*

formado a base de la unión entre los tipos ancestrales Céltico e Ibérico; del primero, posee su tronco alargado de costillares aplanados, dorso abovedado y grupa esencialmente inclinada con nacimiento bajo de la cola; corresponde en cambio al tipo ibérico, su cabeza francamente cónica de perfil subcóncavo y orejas de tamaño más reducido y en alero, sus extremidades fuertes y acortadas y su coloración negra, con piel revestida de cerdas. Este conjunto porcino en el que como carácter funcional destaca su gran propensión a la producción de carne, ha sido cruzado, como todos los del litoral Cantábrico, con el Large White y de forma más intensa, durante estos últimos años; como resultado se ha llegado a la obtención de mestizos con más amplio grado de precocidad y facilidad de engorde, pero ofreciendo particularidades dispares que no rinden hasta el momento la debida fijeza para formar a base de ellas agrupación racial”.

Posiblemente, la falta de datos acerca de la raza hace pensar a Aparicio que el pelaje negro corresponde únicamente al cerdo ibérico. Sin embargo, Aparicio es consciente de que los cerdos de origen celta presentan esa capa, como se podía apreciar en la raza Bísara de Portugal, y por ello habla de una posible unión de los tipos ancestrales ibérico y celta. Esta hipótesis sigue siendo objeto de discusión en Asturias.

En 1947, Fernando Alburquerque publica su libro *“La riqueza en la mano. El cerdo. Cómo se ganan cinco mil duros en seis meses.”* En este trabajo se reproduce un grabado del cerdo de Raza Asturiana en el que se destacan sus largas orejas, su lomo arqueado y el rabo que carece del típico enroscado. La descripción de Fernando Alburquerque es: *“Dentro de las razas indígenas y rústicas, nosotros tenemos muy buenos cerdos, y en Asturias hay un cerdo negro productor del famoso jamón serrano, delicia de los gourmands españoles. Se les cría como en Extremadura, al aire libre”.*



En 1972, la tesis doctoral "*El habla del Valle de Suarna (Lugo)*" defendida por Antonio Santamarina Fernández destaca en su apartado dedicado a la ganadería del porcino, destacando el cerdo asturiano y el cerdo gallego como razas más conocidas.

El primer censo regional del que se tiene noticia aparece publicado en Oviedo en la "*Monografía de Asturias*" de Félix de Aramburu y Zuloaga en 1898 donde contabiliza 134.955 ejemplares. En 1955, las estadísticas oficiales para todo el estado recogen un total de 224.000 cerdas madres del tronco céltico. En 1970 el censo disminuyó a 94.000 cerdas; 42.000 en 1974 y desaparece de las estadísticas oficiales en 1978.

2.1.2. Origen del ganado porcino

De todas las especies ganaderas domesticadas es el cerdo, probablemente, la que demuestra con más fuerza que las visiones simplistas de los procesos de domesticación están equivocadas. Análisis combinados de registros arqueológicos y genéticos (Frantz *et al.* 2016) sugieren que el cerdo se domesticó en el Oriente Próximo en un largo y complejo proceso que se desarrolló desde entre los años 12000 y 8300, incluyendo diferentes fases desde el comensalismo a la explotación intensiva, y, separadamente, en el sur de China, a lo largo del río Yangtsé, entre 9000-8000 años antes del presente. El cerdo doméstico explotado en Europa en un primer momento fue el domesticado en Oriente Medio (Larson *et al.* 2007). Sin embargo, este cerdo se extinguió en Europa por causas desconocidas entre los años 7000 y 5500 antes del presente. Sin embargo, la técnica de domesticación del ancestro salvaje ya estaba perfectamente asumida por las poblaciones humanas y el cerdo doméstico se sustituyó a partir de líneas locales de jabalí (Larson *et al.* 2007). Este escenario que ha incluido introgresión de poblaciones locales de jabalí en poblaciones de cerdo proto-domesticadas ha debido ser frecuente en toda Eurasia. Los primeros estudios genéticos de la domesticación del cerdo encontraron hasta 14 líneas principales de ADN mitocondrial en la especie en todo el mundo con, por lo menos, 6 áreas geográficas donde la línea genética domesticada se encontraba presente en el ancestro salvaje (Larson *et al.* 2005). Eso llevó a pensar que la domesticación del cerdo se llevó a cabo de forma independiente en un número considerable de lugares repartidos por el Viejo Mundo cuando es más probable que la composición genética del ADN mitocondrial del cerdo doméstico pueda deberse a la yuxtaposición de fenómenos de migración de poblaciones domesticadas en el Oriente Medio y sur de China con múltiples sucesos de incorporación a los rebaños neolíticos protodomesticados de representantes de poblaciones locales de jabalí (Larson *et al.* 2007; Frantz *et al.* 2016). En todo caso, la realidad genética de las poblaciones locales de cerdo doméstico es compleja y difícil de discernir ya que la mayor parte de las poblaciones

domesticadas han intercambiado efectivos entre sí y con el ancestro salvaje en los últimos quinientos años (Larson y Fuller 2014).

La Península Ibérica no escapa al escenario general antes descrito. Tras la extinción del cerdo procedente del Oriente Medio se domesticaron poblaciones de jabalí en toda Europa con dos líneas de ADN mitocondrial que se han generalizado en el continente, exceptuando la Península Itálica. La línea europea de ADN mitocondrial de cerdo doméstico, que incluye los jabalíes del norte de África, parece tener muy baja variabilidad genética que, a su vez, se encuentra distribuida en dos subfamilias principales (Alves *et al.* 2003; Larson *et al.* 2005; Ramírez *et al.* 2009): la familia haplotípica "A", encontrada más frecuente en cerdos centroeuropeos, y la familia haplotípica "C", más frecuente en cerdos de estirpe Ibérico-Lusitana y en los jabalíes del Magreb. Desde el punto de vista de composición del ADN mitocondrial es posible sugerir que la incorporación de jabalíes a los rebaños domesticados pudo realizarse con especial intensidad en el territorio de la actual Alemania y en la Península Ibérica (Alves *et al.* 2003; Larson *et al.* 2005; Ramírez *et al.* 2009). En todo caso, estas dos subfamilias haplotípicas podrían provenir de los mismos procesos de domesticación. Su similitud genética es grande y no es posible conocer cuáles eran las primitivas áreas de distribución de esos haplotipos debido al fuerte movimiento comercial de los cerdos en el continente, lo que ha mezclado las líneas maternas ancestrales en las poblaciones presentes (Alves *et al.* 2003; Larson *et al.* 2005; Ramírez *et al.* 2009). Asimismo, el Islam contribuyó a oscurecer estos hechos eliminando el cerdo doméstico de la práctica totalidad del norte de África.

La composición del ADN mitocondrial de las poblaciones porcinas autóctonas de la península ibérica no está todavía suficientemente aclarada. Se conoce que en el noroeste de la Península ibérica se puede encontrar un tronco porcino ancestral de tipo Celta, morfológicamente diferente del cerdo Ibérico-Lusitano, y que podría estar emparentado con los cerdos centroeuropeos (Alves *et al.* 2003; Aparicio 1944; Santos e Silva *et al.* 2008; Royo *et al.* 2008). Si bien, la mayor parte de los cerdos de estirpe Ibérico-Lusitana y los jabalíes muestreados en la Península

pertenecen a la subfamilia haplotípica C, incluyendo los jabalíes del noroeste peninsular, los cerdos de estirpe céltica, ente otros el porco Bísaro o el Gochu Asturcelta, se asignan, preferentemente, a la subfamilia A (Alves *et al.* 2003; Ramírez *et al.* 2009). Las diferencias morfológicas y genéticas existentes entre los cerdos célticos del noroeste ibérico y los cerdos de estirpe ibérica podrían estar ligadas a migraciones humanas como se ha sugerido respecto de los ponis de tipo céltico de España y Portugal (Royo *et al.* 2005). Los cerdos domésticos que acompañaban a estas migraciones indoeuropeas habrían sustituido, en alguna medida, a la población porcina preexistente en el Noroeste ibérico.

2.1.3. descripción morfológica: *Prototipo racial*

La primera descripción morfológica completa de la raza Asturcelta es la que aparece en la “Etnología compendiada” de Aparicio (1944) donde se describe la “Raza asturiana” como animales de tronco alargado de costillares aplanados, dorso abovedado y grupa esencialmente inclinada con nacimiento bajo de la cola; cabeza cónica de perfil subcóncavo con extremidades fuertes y coloración negra, si bien se referencia la presencia de animales con manchas, y también blancos, aunque en menor proporción.

En el libro “La riqueza en la mano. El cerdo. Cómo se ganan cinco mil duros en seis meses”, publicado en 1947 por Fernando Albuquerque, aparece un grabado del cerdo de Raza Asturiana en el que se destacan sus largas orejas, su lomo arqueado y el rabo sin enroscar característico de la raza, haciendo a su vez referencia al color negro de su capa. La descripción de Santos Arán de 1917 es idéntica a la realizada por estos dos autores.

Actualmente las características morfológicas de la raza reconocidas por la Asociación de Criadores son (Resolución de 22 de marzo de 2012 de la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos):

Animales eumétricos y longilíneos.

Cabeza: Grande, ancha y alargada. Perfil subcóncavo. Con los ojos pequeños y las orejas largas, caídas y dirigidas hacia delante. El hocico apretado y cóncavo, con la jeta ancha.

Cuello: Estrecho y largo.

Tronco: largo, costillar aplanado, con el dorso en carpa y estrecho; grupa caída. Vientre recogido. Musculatura de tipo rústico.

Piel gruesa con abundantes cerdas largas y fuertes.

Mamas: Con 5 pares como mínimo.

Testículos: Bien formados en longitud y tamaño.

Extremidades: Largas y huesudas. Pesuños duros.

Rabo: Muy largo, sin enroscar y con cerdas en el extremo.

Peso: Entre 180 y 230 kilogramos en las hembras y entre 230 y 280 kilogramos en los machos.

Alzada: Alcanza los 80 cm. Algunos machos pueden sobrepasar 1 m

Longitud: Desde la nuca al nacimiento del rabo llega en algunos ejemplares a 1.8 metros.

Color: Blanco, negro o prieto y con manchas negras y blancas o pezu, nunca rojo.

Zoometría realizada sobre animales reproductores adultos en el Núcleo de Multiplicación del SERIDA de Villaviciosa proporciona valores medios para peso vivo de 271 kg para los machos reproductores y 229 kg para las hembras adultas. La longitud dorso-lumbar media obtenida fue de 175 cm en los machos y 166 cm en las hembras. Los peso medios al nacimiento fueron de 1.580 kg, variando entre 0.685 kg de mínimo y 2.815 kg de máximo, en los animales viables. El peso medio al destete a 51 días de los animales fue de 14,3 kg.

2.2. Programas de conservación.

2.2.1. Importancia

Los programas de conservación de recursos genéticos animales pueden ser considerados como un importante componente dentro de los programas de conservación de la biodiversidad que, planteados en 1992 en la Conferencia de Río de Janeiro (Brasil), culminaron en diciembre de 1993 con la ratificación formal en la Convención sobre Diversidad Biológica con tres objetivos:

conservación de la diversidad biológica

utilización sostenible de sus componentes

reparto justo y equitativo de los beneficios que genere su utilización.

El segundo informe sobre la situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura elaborado en 2015 por la comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura de la FAO (<http://www.fao.org/3/a-i5077s.pdf>) en el marco del Plan de Acción Global para los Recursos Genéticos Animales (FAO 2007) constataba que la proporción de razas de ganado clasificadas como en peligro de extinción en todo el mundo aumentó del 15% al 17% entre 2005 y 2014. Por otro lado, para un 58% de las razas se desconocía su estado de riesgo al no disponerse de datos recientes. En términos generales, se consideró que la situación de amenaza global sobre los recursos genéticos animales podría estar siendo subestimada sugiriendo la instrumentación de métodos de seguimiento eficaces de las poblaciones de animales domésticos para evitar la extinción de numerosas razas de ganado y la erosión de la diversidad intrarracial incluso en aquellas razas que mantienen un elevado censo total de población.

El citado segundo informe sobre la situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura (2015) sigue

considerando necesario instrumentar esfuerzos para la conservación de recursos genéticos animales debido a las siguientes razones:

La diversidad del ganado facilita la adaptación de los sistemas de producción a los desafíos futuros y es una fuente de resistencia frente a una mayor variabilidad climática.

Los roles y el valor de los recursos zoogenéticos siguen siendo diversos, sobre todo en los medios de subsistencia de los pueblos pobres.

Se hace necesario entender mejor las adaptaciones de determinadas especies y razas a ciertos desafíos ambientales.

Se está acentuando el impacto de muchos cambios del sector ganadero sobre los recursos zoogenéticos y su gestión.

La diversidad ganadera mundial sigue estando en peligro.

Se precisa una mejor evaluación de las amenazas a los recursos zoogenéticos.

Es necesario reforzar los marcos institucionales para la gestión de los recursos zoogenéticos.

El establecimiento y mantenimiento de programas eficaces de mejora sigue suponiendo un reto exigente para muchos países, sobre todo en los sistemas de producción con bajos insumos del mundo en desarrollo.

Los programas para la conservación de los recursos zoogenéticos se han generalizado pero su alcance sigue siendo desigual.

Las tecnologías emergentes están creando nuevas oportunidades y retos en la gestión de los recursos zoogenéticos.

La diversidad del ganado y la gestión sostenible de los recursos zogenéticos gozan de una posición cada vez más afianzada en las agendas políticas.

La recuperación de la raza porcina de Gochu Asturcelta contribuye, modestamente, a esta corriente conservacionista internacional.

2.2.2. El programa de Conservación del Gochu Asturcelta

La puesta en marcha de un programa de conservación para el Gochu Asturcelta es una iniciativa reciente y bien documentada (Menéndez 2012). La creación, a finales del año 2002, de la Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA), es la culminación del esfuerzo realizado por un grupo de personas, escaso pero muy entusiasta, en la recuperación de los últimos ejemplares de la raza.

Hasta la creación de ACGA, un pequeño grupo de conservacionistas se dedicaba a recorrer la geografía asturiana comprobando la certeza de informaciones sobre la presencia de cerdos "como los de antes". Tras muchas decepciones al llegar a lugares donde los cerdos que se describían no cumplían las expectativas raciales o ya habían sido vendidos o sacrificados, la recuperación efectiva de la raza comenzó en 1998 con tres cerdas reproductoras y un verraco en dos ganaderías. En el año 2000, se incorporaron dos nuevos animales reproductores. En el año 2004 ACGA contaba ya con ocho socios que poseían cinco verracos y nueve cerdas madres. En ese momento se planteó la necesidad de una reestructuración de la recuperación de la raza, ya que los esfuerzos individuales y colectivos de este grupo de criadores no resultaban suficientes. Los animales se encontraban distantes físicamente unos de otros y, se hizo imprescindible contar con un lugar donde reunir a los últimos representantes de la raza, con el propósito de evitar su extinción.

En mayo de 2005, gracias al trabajo de los socios y al apoyo de los entonces responsables de la Consejería de Medio Rural y Pesca, se estableció un Convenio de Colaboración entre el Principado de Asturias y ACGA. Este Convenio de Colaboración incluyó, entre otras medidas, la creación de un Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta en las instalaciones del SERIDA de Villaviciosa, donde se reunieron casi todos los animales de la raza: dos verracos y cuatro cerdas de vientre.

El comienzo de la actividad del Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta no fue fácil. Uno de los verracos inicialmente incluidos tuvo que ser sacrificado de resultas de la agresión que sufrió por parte del otro. Se le sustituyó más tarde por un hermano suyo, en régimen de cesión temporal. Se agregaron también dos hembras más que presentaron problemas reproductivos, bien por edad o por trastornos fisiológicos, y nunca resultaron gestantes. Es decir, no llegaron a intervenir en la recuperación de la raza.

Paralelamente, con la colaboración del SERIDA y la Consejería de Medio Rural y Pesca, ACGA comenzó la redacción del informe técnico a presentar al Comité de Razas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación con el objetivo de lograr la inscripción del Gochu Asturcelta en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, como raza porcina autóctona en peligro de extinción. Esta importante meta se alcanzó mediante Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación APA/53/2007, de 17 de enero (BOE de 24 de enero), por la que se modifica el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España. El reconocimiento ministerial permitió solicitar a la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias la designación de ACGA como la Asociación responsable del Libro Genealógico de la raza. Este reconocimiento tuvo lugar mediante Resolución de 13 de abril de 2007 (BOPA de 16 de abril) donde, asimismo, se aprobó la primera reglamentación específica del Libro Genealógico de la raza . En ese momento, ACGA contaba con 30 criadores en 21 municipios, que reunían un total de 150 animales.

En noviembre de 2007, el número de criadores ascendió a 46, en 26 concejos diferentes y con 242 animales. Actualmente (mayo de 2017), el número de criadores se mantiene en 46 en 25 concejos diferentes con 2.319 animales vivos inscritos en el Libro Genealógico (Tabla 1). Con altibajos (Figura 1), la inscripción de animales en el Libro Genealógico de la raza de Gochu Asturcelta mantiene una tendencia creciente desde los 73 individuos inscritos en 2006 hasta los 1.178 animales inscritos en 2016.

Aptitud reproductiva	Situación	
	Baja	Activo
Castrado	3.383	750
Hembra	2.563	1.426
Macho	691	143
Totales	6.637	2.319

Tabla 1. Número de animales inscritos en el Libro Genealógico de la raza de Gochu Asturcelta hasta mayo de 2017 por aptitud reproductiva (castrado, hembra o macho) y situación (baja –muerto- o activo –vivo-).

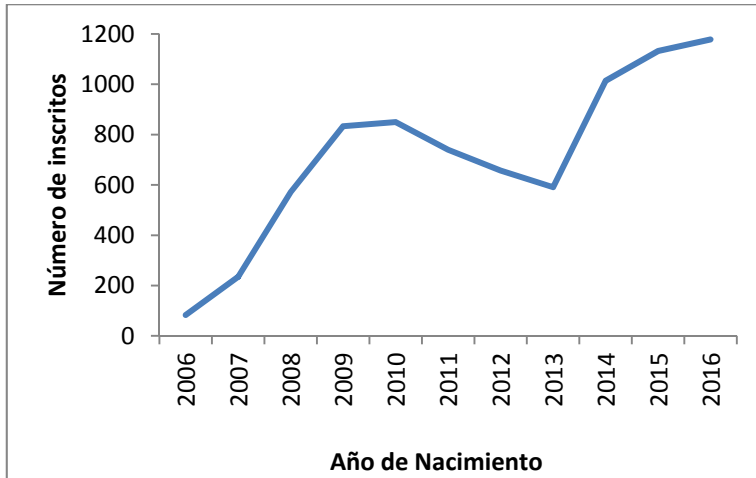


Figura 1. Evolución del número de animales nacidos e inscritos en el Libro Genealógico de la raza de Gochu Asturcelta entre los años 2006 y 2016.

2.2.3. El Libro Genealógico del Gochu Asturcelta

El libro genealógico es la principal herramienta de mejora de una raza. Permite conocer cuáles son los animales más destacados tanto en el aspecto productivo como morfológico y su descendencia. Su situación a mayo de 2017 se describe en la Tabla 2.. Asimismo, a medida que se incrementan los datos, posibilita establecer políticas de apareamientos que permitan conservar la variabilidad genética de la población y realizar evaluaciones genéticas. El libro genealógico del Gochu Asturcelta se regula por la Resolución de la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos de 22 de marzo de 2012. En dicha Resolución se establece el estándar racial así como las diferentes secciones que componen el libro. Estas son: Registro Fundacional (R.F.), Registro Auxiliar (R.A.), Registro de Nacimientos (R.N.), Registro Definitivo (R.D.), Registro de Méritos (R.M.) y Registro de Castrados (R.C.).

El Registro Fundacional incluye todos los ejemplares que sirvieron de base para la creación del Libro Genealógico de la Raza.

El Registro Auxiliar incluye las hembras que, presentando los caracteres definidos en el prototipo racial, cumplan los siguientes requisitos:

Edad no inferior a 10 meses.

Haber parido al menos una vez.

Tener un peso y desarrollo acorde con su edad.

No manifestar defectos determinantes de descalificación e impedimentos para su posterior utilización como reproductora.

A efectos de inclusión de sus crías en el R.N., las hembras de este R.A. se clasifican como de Categoría A cuando se limiten a cumplir las condiciones anteriormente establecidas y en la Categoría B si son las descendientes de hembras de categoría A y de padre inscrito en el R.D. o en el R.F. Las hembras inscritas en el R.A. lo estarán durante toda su vida salvo que, a resultas de su descendencia, la Comisión de Gestión del Libro Genealógico acuerde lo contrario. Este registro permanecerá abierto mientras se considere procedente por parte de la Comisión de Gestión de la Raza.

En el Registro de Nacimientos se inscriben todas las crías de ambos sexos obtenidas de progenitores pertenecientes al R.F o R.D. o progenitores machos pertenecientes al R.F. o R.D. cruzados con hembras del R.A. categoría B. La inclusión de las crías en este registro estará condicionada al cumplimiento de las siguientes exigencias:

Que la declaración de cubrición o inseminación de sus madres haya sido comunicada a la oficina del Libro Genealógico dentro de los dos primeros meses de gestación.

Que la declaración de nacimiento haya sido comunicada antes de los 30 días postparto y, en cualquier caso, antes del destete.

Que no se aprecien defectos que impidan su uso como reproductor.

Que posea las características fenotípicas propias de la raza, sin defectos descalificantes.

Los ejemplares permanecerán en este R.N. hasta su inscripción en el R.D., salvo que previamente hayan sido declarados no aptos por la Comisión de Gestión del Libro Genealógico.

El Registro Definitivo incluye los animales procedentes del R.N. que cumplan las siguientes condiciones:

Edad mínima de 6 meses tanto para machos como para hembras.

Ser descendientes de padres inscritos en el R.F. o R.D. o de madre de categoría B del R.A. y padre del R.F. o R.D.

Tener un peso y desarrollo acorde con su edad.

Las hembras deberán tener controlado al menos un parto antes de los 18 meses de edad.

Cumplir el prototipo racial y no poseer ningún defecto descalificante o de otro tipo que impida la reproducción.

La permanencia en este R.D. estará condicionada a los resultados de su descendencia. Tanto machos como hembras podrán ser dados de baja en el Libro Genealógico en caso de observarse influencias desfavorables y previo informe de la Comisión de Gestión del Libro Genealógico. También causarán baja en el Libro Genealógico, previo informe de la Comisión de

Gestión del mismo, todos los reproductores machos y hembras, así como su descendencia, en los que puedan apreciarse defectos hereditarios muy graves tanto morfológicos como productivos, reproductivos o de otra índole.

En el Registro de Méritos se inscribirán aquellos animales que, por sus especiales características genealógicas, morfológicas o productivas así lo merezcan, pudiendo ostentar los animales inscritos los siguientes títulos:

Gocha de mérito: para las hembras reproductoras inscritas en el R.D. que cumplan las siguientes exigencias:

Tener una calificación morfológica de 85 o más puntos.

Haber logrado desde el inicio de su actividad reproductora al menos 1,8 partos al año en sus primeros tres años de vida y haber destetado al menos seis lechones en cada parto.

En el caso de que exista, tener una evaluación genética positiva para los principales caracteres productivos.

Gochu de mérito: para los machos reproductores inscritos en el R.D. que cumplan las siguientes exigencias:

Tener una calificación morfológica de 85 o más puntos.

Tener controlados desde el inicio de su actividad reproductora al menos 10 partos con tres hembras diferentes y 20 hijos inscritos en el R.N. o R. D.

En el caso de que exista, tener una evaluación genética positiva para los principales caracteres productivos.

El Registro de Castrados incluye todos aquellos animales de ambos sexos que hayan sido castrados.

Registro	Situación	
	Baja	Activo
R.F.	8	
R.A.	38	17
R.N.	6	189
R.D.	2.830	1.330
R.C.	2.486	781

Tabla 2. Número de animales inscritos en los diferentes Registros del Libro Genealógico de la raza de Gochu Asturcelta hasta mayo de 2017 por situación del animal en el Libro (baja –muerto- o activo –vivo-). Los Registros detallados son: Registro Fundacional (R.F.), Registro Auxiliar (R.A.), Registro de Nacimientos (R.N.), Registro Definitivo (R.D.) y Registro de Castrados (R.C.). El Registro Fundacional incluye dos reproductoras que no dejaron descendencia.

2.2.4. El núcleo de multiplicación del Gochu Asturcelta

El funcionamiento del Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta en la finca del SERIDA de Villaviciosa, inicialmente bajo la tutela del Dr. Alejandro Argamentería (Argamentería y Menéndez 2012), ha sido esencial para la recuperación de la raza. La situación de partida era desalentadora: el número de ejemplares viables era mínimo, estaban muy dispersos. Casi ninguno era propiedad de ganaderos profesionales sino de personas cuya motivación principal era su interés por las razas autóctonas asturianas. El total inicial de animales que llegó al SERIDA de Villaviciosa, donde se decidió instalar el núcleo de multiplicación, fue de dos machos y cuatro hembras, adquiridos por el SERIDA o en régimen de cesión temporal. La creación del Núcleo de Multiplicación pretendía cubrir los siguientes objetivos:

actuar como reservorio de genes de la raza

permitir el aumento de los censos conservando la variabilidad genética de la población fundadora

surtir de animales de raza pura a explotaciones comerciales, incluidas en ACGA, mediante concurrencia pública.

permitir la realización de proyectos de investigación para la caracterización de la raza y sus producciones

Los seis ejemplares se distribuyeron inicialmente en cuatro líneas, dos de las cuales tenían macho base y hembra base. Las otras dos, sólo hembra base. Lamentablemente, el macho base de la línea 3 (*Tixu*) fue agredido por el de línea 4 (*Siero*) y tuvo que ser dado de baja como consecuencia de las lesiones recibidas. Con posterioridad, pudo ser sustituido por otro (*Kéndano*), que procedía de los mismos ascendientes que *Tixu*, pero durante un tiempo relativamente largo, *Siero* fue el único semental disponible. Además, las reproductoras base de las líneas 1 y 4 resultaron infértiles y ello exigió realizar todos los cruces posibles, algunos de ellos entre hermanos.

El éxito se consiguió gracias a la buena prolificidad y cualidades maternas de las reproductoras viables.

Inicialmente se optó por seguir un régimen semiextensivo. Los cerdos no admitían una estabulación permanente, requiriendo actividad física y soportaban mal el confinamiento. Para cumplir esos requerimientos y realizar un buen control de la reproducción, cría y recría, se aplicó un sistema de estabulación similar al de explotación intensiva del cerdo Ibérico: alimentación con piensos compuestos y alojamientos para partos y posterior lactación, pero con suficiente espacio exterior para ejercicio. Se aplicaron normas de manejo facilitadas por centros y organismos españoles que trabajan sobre el tronco Mediterráneo: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes de la Universidad de Córdoba, Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada) y Centro de Pruebas del Porcino (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, ITACyL, Salamanca).

Los ejemplares del Núcleo de Multiplicación se alojaron en parcelas al aire libre, delimitadas por malla ovejera, protegidas por cerca eléctrica, provistas de refugios tipo "camping", comederos tolva, bebederos de nivel y cepo para inmovilización momentánea. En un edificio anexo se habilitó una sala de partos con corrales provistos de jaulas de lactación totalmente equipadas, lámparas de infrarrojos en un área de refugio de los lechones y comederos para pienso de arranque de los mismos. Los dos machos estaban en parcelas separadas. Las cuatro hembras se mantuvieron, inicialmente, en grupo. Todos los animales del núcleo de multiplicación y sus descendientes fueron debidamente identificados por su número de saneamiento, crotal identificativo de pertenencia a ACGA y, además, mediante un microchip inyectado intraperitonealmente.

Se siguió un programa de apareamientos diseñado para reducir lo más posible la acumulación de consanguinidad que consistía en mantener la carrera reproductiva de los animales fundadores del núcleo y sus descendientes directos el mayor tiempo posible, evitar cruzamientos dentro de línea y fomentar el cruzamiento entre los individuos más jóvenes, con más profundidad de pedigrí, y más viejos. Cuando las relaciones de parentesco entre animales se acumularon se planificaron los apareamientos con la asistencia del programa ENDOG (Gutiérrez y Goyache 2005). El manejo de los animales en un centro sin experiencia en ganado porcino no fue sencillo. Los hermanos completos de las primeras camadas obtenidas en el Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta se manejaron sin separación de machos y hembras hasta edades superiores a los seis meses. Como consecuencia, las hembras de primera generación obtenidas resultaron preñadas por sus hermanos completos. Además de la súbita aparición de niveles de consanguinidad indeseables para el éxito del programa la necesidad de asignar con certeza la paternidad de los ejemplares obtenidos hizo necesario la puesta a punto en el SERIDA de una batería de marcadores de tipo microsatélite que permitió realizar, posteriormente, pruebas de filiación de forma rutinaria. La asignación de las paternidades de los productos F2 se realizó con la ayuda del programa CERVUS (Kalinowski *et al.*, 2007).

El Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta ha jugado un papel esencial en el aumento de los censos y la regulación de los apareamientos entre los socios de ACGA. Sin embargo, aunque más desconocido, ha contribuido significativamente a la caracterización de los rendimientos esperables en condiciones de explotación no intensivas, incluyendo la prolificidad, supervivencia hasta el destete y crecimiento, cebo y acabado en régimen semiextensivo. Fruto de esas experiencias y proyectos algunos de los cuales todavía se están desarrollando se dispone de los primeros datos productivos (pesos a diferentes edades, crecimientos) y rendimientos de las canales del Gochu Asturcelta así como del análisis físicoquímico y la calidad sensorial de la carne (Argamentería y Menéndez 2012)

2.3. Herramientas para la conservación de la variabilidad genética

2.3.1 Información de pedigrí

2.3.1.1. La consanguinidad o endogamia (F)

Habitualmente, la preservación de la base genética de una población se realiza mediante la monitorización de los niveles de consanguinidad (Toro y Pérez-Enciso 1990; Windig *et al.* 2004), definida como la probabilidad de que dos alelos de un determinado locus de un individuo sean idénticos por descendencia, ya que este parámetro caracteriza las pérdidas de variabilidad genética e indica la probabilidad de acumulación de alelos letales recesivos; el aumento de la endogamia provoca la reducción del tamaño efectivo de la población y, en consecuencia, la pérdida de variabilidad genética (Falconer y Mackay 1996). Asimismo, este parámetro está altamente relacionado con la heredabilidad mediante la fórmula

$$h_t^2 = \frac{h_0^2(1 - F_t)}{1 - (h_0^2 \cdot F_t)}$$
 (Falconer y Mackay 1996; donde h_t^2 , h_0^2 y F_t son, respectivamente, la heredabilidad en la generación t , la heredabilidad en la generación base y la consanguinidad en la generación t , siendo, por tanto, un buen indicador del potencial de selección que posee una población.

El coeficiente de consanguinidad, coeficiente de endogamia o identidad por descendencia de un individuo se define como la probabilidad de que los dos alelos que lleva un individuo en cualquier locus sean idénticos por descendencia (Wright 1931; Malécot 1948). Es probablemente el parámetro más importante en el análisis de la estructura genética ya que mide la probabilidad de homocigosis en una genealogía, y es precisamente la homocigosis la causante de la depresión consanguínea y de la manifestación de genes deletéreos.

Así, los niveles de consanguinidad altos conducen a fenómenos de depresión consanguínea. De forma general, la depresión produce la aparición de efectos deletéreos en la población y una disminución del rendimiento de los caracteres muy afectados por la acción no aditiva de los genes, es decir de los caracteres de baja heredabilidad (Ollivier 1981), que están generalmente relacionados con la reproducción (Wright 1977).

Sin embargo, el cálculo de los coeficientes de endogamia depende de la calidad de las genealogías disponibles lo que hace que este parámetro sea difícil de interpretar en el caso de pedigrís poco profundos, ralos o en el caso de la presencia de un número importante de migrantes (Boichard *et al.* 1997; Gutiérrez *et al.* 2003; Goyache *et al.*, 2003; Woolliams y Mäntysaari 1995) ya que, en esas condiciones, los pedigrís incompletos presentan valores de endogamia menores de lo que debieran y la introducción de nuevos animales produce una inmediata reducción de la consanguinidad. La existencia de solapamiento generacional y el desigual conocimiento genealógico por las vías paterna y materna imposibilita la asignación de individuos a generaciones discretas. Una forma de afrontar esta dificultad es utilizar el número de generaciones completas equivalentes que se obtiene como la suma para todos los antepasados conocidos de $(\frac{1}{2})^n$, siendo n el número de generaciones que separan al individuo de cada antepasado (Maignel *et al.* 1996).

Por otra parte, los resultados obtenidos en poblaciones en que se planifican apareamientos entre animales emparentados o no dependen también de los tamaños familiares (Caballero y Toro 2000). Realmente, la

estimación de la consanguinidad de una población mediante el uso de información de pedigrí sólo es completamente informativa en poblaciones cerradas, no seleccionadas y panmicticas, pero en poblaciones reales existen dificultades para tener en cuenta todos los factores que afectan a la deriva genética, en especial el hecho de que las generaciones se superponen, que los apareamientos no tengan carácter aleatorio o que la población pueda estar dividida en subpoblaciones o líneas (Caballero 1994). En consecuencia, diversos autores (Caballero y Toro 2000, 2002; Fernández *et al.* 2005) prefieren utilizar la heterocigosis esperada o diversidad genética (Nei 1973) como criterio para cuantificar la variabilidad genética existente en una población; la diversidad genética representa la proporción esperada de heterocigotos que se encuentran en una población en equilibrio Hardy-Weinberg, está directamente relacionada con la varianza aditiva esperable en caracteres cuantitativos (Falconer y Mackay 1996) y la coascendencia de la población (Caballero y Toro 2000, 2002; Fernández *et al.* 2005), esto es, a la probabilidad de que dos alelos de dos individuos i y j muestreados al azar en el mismo locus sea idéntica por descendencia (Malécot 1948). Las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg pueden evaluarse mediante el parámetro α (Caballero y Toro 2000; Toro *et al.* 2000), equivalente al parámetro F_{IS} de Wright (1977), que caracteriza el grado en que los apareamientos de una población no son aleatorios: un α positivo significa que la consanguinidad media de una población supera al coascendencia media entre individuos lo que ocurre cuando no se evitan los apareamientos entre individuos emparentados.

2.3.1.2. El tamaño o censo efectivo (N_e)

Aunque los apareamientos entre individuos emparentados, y la consiguiente acumulación de consanguinidad, son inevitables en poblaciones de efectivos limitados, el valor predictivo del coeficiente de consanguinidad sobre la viabilidad de una población o el potencial genético de los individuos para caracteres productivos o reproductivos es limitado. Los apareamientos consanguíneos se han utilizado históricamente como instrumento para purificar una población de genes deletéreos y acumular

en ella los genes de interés y no siempre es fácil encontrar casos de depresión consanguínea incluso en poblaciones con medias de consanguinidad muy altas (ver Gómez *et al.* 2009 para una revisión). Incluso, la acumulación de consanguinidad puede ser beneficioso para incrementar el mérito genético para caracteres de importancia económica (Fernández *et al.* 2002). Las dificultades para que los coeficientes de consanguinidad puedan ser útiles para predecir la viabilidad o capacidad evolutiva de una población puede deberse a hechos como que los coeficientes de consanguinidad no tiene una relación lineal con la profundidad del pedigrí de cada individuo (Falconer y MacKay 1996; Gómez *et al.* 2009) y que los efectos de depresión consanguínea pueden aparecer más probablemente cuando la consanguinidad se acumula de forma muy rápida (Fernández *et al.* 2002; Hinrichs *et al.* 2007) impidiendo la acción de mecanismos purificadores.

Estos inconvenientes pueden solventarse considerando el incremento

$$\Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$$

en consanguinidad (ΔF) calculado como (Falconer y McKay 1996) donde F_t y F_{t-1} son la consanguinidad media en las generaciones t y $t-1$ y el tamaño efectivo de la población (N_e), definido como el número de individuos que daría lugar al incremento de la varianza de muestreo (coascendencia) o incremento de consanguinidad observados si los individuos se reprodujeran en la manera indicada en la población ideal,

$$N_e = \frac{1}{2\Delta F}$$

calculado en poblaciones diploides como . El parámetro N_e es el análogo evolutivo del censo real (N). El censo real depende de múltiples causas sociales, ecológicas o productivas que tienen su reflejo en la tasas de crecimiento de la población. Sin embargo, N_e caracteriza procesos con reflejo genético como la deriva, pérdidas de diversidad, selección o flujo de genes que causan contribuciones genéticas dispares de los individuos que componen la población.

El concepto de tamaño efectivo tiene un comportamiento asintótico en sistemas de apareamientos estables y permite realizar predicciones sobre

una población, por ejemplo su riesgo. En todo caso, el cálculo del incremento en consanguinidad (ΔF) sólo es preciso en las condiciones de una población ideal (Wright, 1931) de censo infinito, no subdivida, con apareamiento al azar incluyendo la autofecundación y, especialmente, generaciones no solapadas. Estas condiciones no se dan en poblaciones reales por lo que la utilidad de las estimas clásicas de ΔF y N_e es escasa. Para solventar este problema se han propuesto soluciones como considerar las diferencias de consanguinidad entre los individuos de una población de referencia y sus padres (Sölkner *et al.* 1998; Leroy *et al.* 2013) intentando simular una renovación generacional, considerando el coeficiente de regresión (b) de F sobre el año de nacimiento de los individuos y considerando posteriormente el intervalo generacional (Gutiérrez *et al.* 2003; Pérez-Enciso 1995).

En todo caso, la definición de una generación discreta cuando la norma es el solapamiento generacional es difícil ya que padres e hijos suelen convivir en las poblaciones de referencia. Por otra parte, los métodos basados en la regresión asumen que la política de apareamientos es estable con acumulación constante de la consanguinidad en genealogías cerradas. Sin embargo, estos métodos son muy sensibles a cambios bruscos en la política de apareamientos pudiendo aparecer incrementos de consanguinidad incluso negativos que llevarían a valores de N_e infinitos (Cervantes *et al.* 2008; Leroy *et al.* 2013; Goyache *et al.* 2013).

Para solventar estos problemas Gutiérrez *et al.* (2008) propusieron la utilización de los incrementos individuales de consanguinidad (ΔF_i) calculado como $\Delta F_i = 1 - \sqrt[t]{1 - F_i}$, donde F_i es el coeficiente de consanguinidad del individuo i y t el número de generaciones completas equivalentes de ese individuo (Maignel *et al.*, 1996). Contra los métodos anteriores, que calculan la media de la consanguinidad de los individuos que forman una población de referencia para después compararla con la de la “generación” anterior, Gutiérrez *et al.* (2008) proponen considerar cada uno de los individuos incluidos en la población de referencia como una “población renovada” que tiene un incremento de consanguinidad propio

(ΔF_i) siendo el incremento de la consanguinidad en la población de referencia la media de esos valores ($\overline{\Delta F}$) y, por lo tanto, su tamaño

efectivo $\overline{N_e} = \frac{1}{2\overline{\Delta F}}$ (Gutiérrez *et al.* 2008; Cervantes *et al.* 2008). Este

método permite la estandarización de las profundidades de pedigrí de los individuos que forman una población de referencia e, indirectamente, tiene en cuenta los efectos de las generaciones solapadas, selección, cambios en las políticas de apareamientos, migración y diferentes contribuciones de ancestros a una población en la medida en que estos se reflejan en el pedigrí de los individuos (Gutiérrez *et al.* 2008; Cervantes *et al.* 2008). Por otra parte, al estar basado en el cálculo de la raíz de los coeficientes de consanguinidad sobre el número de generaciones no se pueden producir valores negativos incluso si se producen cambios bruscos en la política de apareamientos (Cervantes *et al.* 2008; Leroy *et al.* 2013). Este método se refinó por Gutiérrez *et al.* (2009), que propusieron el cálculo de los coeficientes individuales de consanguinidad como $\Delta F_i = 1 - \sqrt[t]{1 - F_i}$ que

tiene en cuenta que la autofertilización no es posible en poblaciones con sexos separados y que, por lo tanto, en la primera generación no se puede producir consanguinidad en una población ganadera. Esta mejora del método ha permitido obtener estimas fiables de N_e en pedigrís con una media de t de 3 generaciones (Gutiérrez *et al.* 2009). En todo caso, la

fiabilidad de las estimas de $\overline{N_e}$ pueden evaluarse mediante el cálculo de su desviación estándar en la forma $\sigma_{\overline{N_e}} = 2\overline{N_e}^2 \sigma_{\Delta F} \frac{1}{\sqrt{\overline{N_e}}}$ (Gutiérrez *et al.*

2008).

Las ventajas de esta metodología se han extendido a la coascendencia. Cervantes *et al.* (2011a) propusieron el cálculo de los incrementos individuales de coascendencia entre cada par de individuos j y k (Δc_{jk}) en

una población de referencia en la forma $\Delta c_{jk} = 1 - \left(\frac{g_j + g_k}{2}\right) \sqrt{1 - c_{jk}}$, donde c_{jk} es la consanguinidad de la descendencia de los individuos j y k , y g_j y g_k

son el número de generaciones completas equivalentes de los individuos j y k . La media de los valores Δc_{jk} de cada par de individuos en una población

de referencia permite calcular el tamaño efectivo como $\bar{N}_{ec} = \frac{1}{2\Delta c}$. De

nuevo, es posible calcular una desviación estándar de \bar{N}_{ec} puede calcularse a partir de la desviación estándar de los incrementos individuales de

$$\sigma_{\bar{N}_{ec}} = 2\bar{N}_{ec}^2 \sigma_{\Delta c} \frac{1}{\sqrt{\frac{\bar{N}_{ec}(\bar{N}_{ec}-1)}{2}}}$$

coascendencia ($\sigma_{\Delta c}$) en la forma

(Cervantes *et al.* 2011a). Nótese que en poblaciones con cierto grado de subdivisión $\bar{N}_e < \bar{N}_{ec}$ por lo que su comparación puede ser informativa de la situación de la población estudiada (Cervantes *et al.* 2011a).

2.3.1.3. Probabilidad de origen de los genes

Debido a las dificultades prácticas que surgen en la interpretación de los tamaños efectivos e incrementos de consanguinidad, cuando se analizan poblaciones con generaciones solapadas se ha propuesto la utilización de diversos parámetros basados en la coascendencia para monitorizar las poblaciones y detectar pérdidas de variabilidad genética. Todos los genes presentes en una población proceden de alguno de sus fundadores pero la representación de cada uno de ellos en los individuos que forman una población de referencia es muy variable dependiendo del uso preferente que pueda realizarse de los individuos reproductores. Estimar la probabilidad de origen de los genes proporciona información sobre la política de apareamientos, el flujo de los genes dentro de la población y pérdidas de variabilidad genética.

Si bien en la población ideal, todos los animales de la población base se consideran fundadores (Wright 1931), esto es individuos no emparentados con padre y madre desconocidos, en la poblaciones reales, donde se producen problemas de registro de datos y migración la situación es más

compleja: puede existir un individuo con uno solo de sus padres desconocido (fundador “fantasma”) o se pueden identificar individuos con los dos padres conocidos que, por la aparición de un cuello de botella, han podido influir más que sus ascendientes en la variabilidad genética presente en la población de referencia y que Boichard *et al.* (1997) denominaron “ancestros”. Si un fundador influye más que sus descendientes en población de referencia Boichard *et al.* (1997) consideraban este fundador también como ancestro.

Basándose en la desigual probabilidad de origen de los genes presentes en la población de referencia se definen tres parámetros relacionados: el tamaño efectivo de fundadores (f_e), el tamaño efectivo de ancestros (f_a) y el número efectivo de genomas fundadores (N_g). La relación entre estos parámetros y el número real (incluyendo fundadores fantasma; N_f) es clara $N_f \leq f_e \leq f_a \leq N_g$.

James (1972) y Lacy (1989) definieron el tamaño efectivo de fundadores (f_e) como el número de fundadores necesario para producir la diversidad genética de la población de referencia si hubieran contribuido a la misma de forma equilibrada y lo calcularon como $f_e = \frac{1}{\sum_{k=1}^f q_k^2}$, donde q_k es la

probabilidad de origen de los genes del fundador k (James 1972; Lacy 1989). El parámetro f_e y el ratio f_e/N_f informan sobre las pérdidas de variabilidad genética producidas por contribuciones desequilibradas de los fundadores.

El tamaño efectivo de ancestros (f_a) propuesto por Boichard *et al.* (1997) es el mínimo número de ancestros, no necesariamente fundadores, que explicarían la diversidad genética de la población de referencia. El parámetro f_a se calcula como $f_a = \frac{1}{\sum_{j=1}^a q_j^2}$, donde q_j es la contribución

marginal de un ancestro j , esto es la contribución genética de un ancestro a la población de referencia que se explica por sus ascendientes. El

parámetro f_a y el ratio f_a/f_e informan sobre la pérdida de variabilidad genética que se debe a cuellos de botella (Boichard *et al.* 1997).

El número efectivo de genomas fundadores (N_g ; Ballou y Lacy 1995) se define como el número de fundadores que producirían la diversidad genética presente en la población en estudio si todos los fundadores estuvieran igualmente representados y no se hubiera producido pérdida de alelos. En este sentido este parámetro tiene en cuenta todas las causas posibles de las pérdidas de variabilidad genética, incluyendo la deriva. Caballero y Toro (2000) proponen su cálculo como el doble de la inversa de la coascendencia media de los individuos incluidos en la población de referencia.

Estos parámetros no solo tienen un valor diagnóstico sino que pueden usarse para la toma de decisiones en política de apareamientos. Alderson (1991) propuso equilibrar las contribuciones genéticas de los fundadores en la población actual eligiendo como reproductores los individuos que presenten mayores coeficientes individuales de número efectivo de fundadores. Sin embargo, si la información genealógica para un individuo dado no está equilibrada, los animales de las primeras generaciones pueden no considerarse como los mejores reproductores al tener pocos animales fundadores en su pedigrí. En consecuencia, la maximización de la diversidad genética no es resultado directo del equilibrado de la contribución genética de los fundadores (Ballou y Lacy, 1995). Es por ello que Gutiérrez *et al.* (2003) y Goyache *et al.* (2003) proponen la generalización del uso de las contribuciones de los fundadores mediante el cálculo del parámetro "relación media" (AR). AR se calcula como la media de las filas de la matriz de parentesco para cada animal de la genealogía y se define como la probabilidad de que un alelo escogido al azar de la población pertenezca a ese individuo. El coeficiente AR de un fundador coincidiría con su contribución para el cálculo del tamaño efectivo de fundadores (f_e) si se consideran todos los individuos del pedigrí como población de referencia. AR puede interpretarse como la representación del individuo en el pedigrí independientemente de la generación en que se encuentre. Por tanto es una medida del porcentaje que por término medio

comparte cada individuo con el resto de los individuos en el pedigrí. La selección de los animales reproductores exclusivamente por sus menores coeficientes AR produciría un incremento del tamaño efectivo de fundadores mediante el incremento de la representación de los fundadores en la población de referencia.

2.3.2. Marcadores moleculares

El genoma de los individuos de la misma especie es, en conjunto, muy similar, pero presenta algunas diferencias alélicas; es decir su ADN es polimórfico. Estos polimorfismos pueden ser desde variaciones puntuales a reordenaciones de secuencias. El desarrollo de la PCR, *Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al.*, 1986), ha permitido identificar, de forma fiable, variabilidad en el ADN que puede ser utilizada como prueba en el estudio de especies, variedades o individuos concretos. Aunque los trabajos que componen esta memoria no pretenden profundizar en el conocimiento de los marcadores moleculares sino el aprovechamiento de la información que proporcionan, describiremos someramente los marcadores disponibles para los trabajos que se incluyen en esta memoria tanto en el ADN autosomal (repeticiones en tándem o microsatélites y sustituciones nucleotídicas puntuales o SNPs) y en el ADN mitocondrial, fundamentalmente en la región de control de la replicación.

2.3.2.1. Marcadores autosomales

Desde su caracterización en los años 80 del siglo XX, las repeticiones en tándem (Variable Number Tandem Repeats, Jeffreys *et al.* 1985), más conocidas como microsatélites, fueron los marcadores más utilizados en estudios de genética de poblaciones hasta los comienzos del siglo XXI. La variación en el número de repeticiones crea un amplio repertorio de alelos de diferente tamaño para cada marcador. El éxito de los microsatélites se basó fundamentalmente en que podían amplificarse simultáneamente en la misma reacción de PCR (PCR-multiplex), son muy frecuentes, se distribuyen uniformemente a lo largo del genoma, por lo general en regiones no codificantes, son muy polimórficos y se comportan de forma estable y

codominante lo que simplifica su determinación laboratorial y permite su automatización. Estas características los convirtieron en los marcadores genéticos de elección para una gran cantidad de aplicaciones, como la realización de mapas genéticos, la caracterización de poblaciones y la realización de pruebas de identificación individual y control de filiación, entre otros. Como consecuencia, los microsatélites se han utilizado ampliamente en estudios demográficos (Laval *et al.* 2000; Boitard *et al.* 2010; Pham *et al.* 2014), debido a que con ellos se puede cuantificar la variación genética dentro y entre poblaciones o razas, permiten la identificación de introgresiones y, por último, pueden usarse para asignar individuos dentro de una población, raza o especie (Paetkau *et al.* 2004). Estos marcadores son muy sensibles a procesos de selección y de cuellos de botella (Luikart y Cornuet 1998), ambos casos recurrentes en poblaciones domésticas.

Las variaciones en el ADN genómico, normalmente de un solo nucleótido, son sustituciones nucleotídicas o, simplemente, polimorfismos de ADN, más conocidas por sus siglas en inglés SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Son el tipo de variación más frecuente en el genoma, tanto en áreas codificantes como no codificantes. Aunque en una misma posición del genoma puede haber hasta cuatro nucleótidos diferentes (Adenina, Timina, Citosina o Guanina), por lo general los SNPs son bialélicos. Cuando están presentes en las áreas genómicas codificantes, pueden producir un cambio en la secuencia de la proteína o incluso interrumpir su síntesis, de forma que se produzca una proteína truncada. Es por ello que muchas de las mutaciones localizadas en áreas codificantes son “depuradas” por la selección natural. Este es el motivo principal de que los SNPs sean mucho más frecuentes en áreas no codificantes. Otra categoría distinta de polimorfismo consistirían en la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos en una zona del genoma. Aunque la información analizada en la presente Memoria no incluye SNPs, consideramos necesario remarcar sus importantes ventajas para la realización de estudios de genética de poblaciones: desde el punto de vista laboratorial, su carácter bialélico permite la automatización de técnicas de genotipado a gran escala

incluyendo decenas de miles de SNPs por individuo. Además, su número y distribución uniforme permite considerarlos una muestra representativa de la variabilidad del genoma de un individuo. Para ganado porcino, se ha desarrollado un chip (60 k SNP BeadChip de Illumina; Ramos *et al.* 2009) que permite genotipar 62163 SNPs. Aunque una parte importante de los SNPs que contiene el chip no pudieron asignarse a uno de los 18 autosomas porcinos o tuvieron una asignación ambigua (Ramos *et al.*, 2009). En todo caso, el chip todavía contiene cerca de 50.000 polimorfismos de utilidad completa, lo que debe suponer una herramienta formidable para estudios de diversidad. La utilidad de la información del 60 k SNP BeadChip en estudios de poblaciones es clara (Ramayo-Caldas *et al.*, 2010; Burgos-Paz *et al.* 2013). La utilización de este tipo de información en una población cerrada con población base conocida puede dar una información importantísima sobre la relación entre la consanguinidad genealógica y la autocigosis realmente producida (Bosse *et al.* 2012; Silió *et al.* 2016). El abaratamiento progresivo de este tipo de chips hará de los SNPs los marcadores de elección para los estudios en el Gochu Asturcelta.

2.3.2.2. ADN mitocondrial:

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos. Su característica principal es que poseen un genoma de ADN propio, de pequeño tamaño y forma circular. En términos prácticos, el ADN mitocondrial se transmite a la descendencia sólo por vía materna, a través de las mitocondrias presentes en el óvulo fecundado. Aunque las mitocondrias de los espermatozoides se transmiten al oocito durante la fertilización, su contribución genética es prácticamente nula (Sutovsky *et al.* 2003).

La estructura y organización del ADN mitocondrial es muy similar en todas las especies mamíferas: se trata de un genoma circular, con un tamaño entre 16.000 y 18.000 pares de bases, que contiene 13 genes codificantes de proteínas, 22 genes codificantes de ARN de transferencia y 2 genes de ARN ribosomal, con apenas secuencias intergénicas. Entre las secuencias intergénicas cabe destacar la región control del ADN

mitocondrial, región no codificante de aproximadamente 1000 pares de bases, que regula su transcripción y replicación (Pesole *et al.* 1999). Esta región de control, a pesar de su pequeño tamaño, es de especial importancia para el estudio de las relaciones genéticas entre poblaciones animales ya que es “hipervariable”. En esta pequeña región se acumulan aproximadamente tres cuartas partes de las mutaciones que aparecen en todo el ADN mitocondrial, con una frecuencia que es aproximadamente 20 veces mayor que la tasa de mutación del ADN nuclear o somático (Pesole *et al.* 1999).

La región control del ADN mitocondrial, pese a presentar una tasa de mutación elevada, se considera un marcador estrictamente neutro. Al ser haploide y de herencia uniparental materno proporciona una información complementaria a la de los marcadores autosomales. El estudio de un gran número de mutaciones (polimorfismos) acumulados en un pequeño fragmento de ADN permite obtener mucha información sobre la historia genética de las poblaciones bajo estudio (Awise, 2004). El hecho de que cada célula posea cientos o miles de copias de ADN mitocondrial, mientras que sólo hay dos copias de ADN nuclear, permite que, incluso en fósiles, se pueda encontrar ADN en cantidad suficiente como para realizar determinaciones laboratoriales.

El hecho de que el ADN mitocondrial proporcionara una información complementaria a la de los marcadores de tipo microsatélite convirtió a este tipo de marcadores en uno de los más empleados en estudios de genética de poblaciones de animales domésticos. En la especie porcina ha contribuido significativamente al conocimiento del origen, domesticación y dispersión de la especie (Larson *et al.* 2005; Larson *et al.* 2007; Ramírez *et al.* 2009) y al conocimiento de la estructura genética de las poblaciones porcinas locales incluyendo la península Ibérica (Alves *et al.* 2003).

2.3.3. Información molecular

Cualquiera que sea el marcador molecular utilizado, la información que proporciona debe cuantificarse para facilitar su interpretación. Procede, por tanto realizar una descripción, no exhaustiva, de los parámetros genéticos más utilizados para la evaluación de la diversidad dentro y entre poblaciones.

2.3.3.1. Heterocigosis e identidad genética

Los parámetros básicos para la evaluación de la diversidad son la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e), los valores complementarios de las homocigosis observada y esperada. H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci muestreados y se calcula por cómputo directo, mientras que la H_e , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. H_e , también conocida como diversidad génica de Nei (Nei 1987), se calcula para todos los alelos y loci (L) como $H_e = 1 - \sum_{i=1}^L p_i^2$ siendo p_i^2 la homocigosis esperada. Para marcadores de herencia uniparental, como los del ADN mitocondrial, la homocigosis esperada se suele referir como probabilidad de identidad (Álvarez *et al.* 2012).

La identidad genética esperada entre dos individuos o poblaciones (J_{XY} en la notación de Nei 1987) es igual a $\sum_{i,j} x_{ij} y_{ij}$, donde x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del $i^{\text{ésimo}}$ alelo del $j^{\text{ésimo}}$ locus en los individuos o poblaciones X e Y . Para todos los loci analizados se puede calcular simplemente como la multiplicación de los vectores formados por las frecuencias alélicas de los i alelos identificados en los j locus muestreados en las poblaciones X e Y , divididos por su norma. J_{XY} es la probabilidad de que dos alelos muestreados al azar del mismo locus de dos individuos sean idénticos y es coincidente con el coeficiente de coascendencia de Malècot en el modelo

genealógico, mientras que la homocigosis esperada coincidiría con el coeficiente de consanguinidad.

2.3.3.2. Estadísticos F

Wright (1965) definió tres estadísticos F: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , como correlaciones entre dos gametos tomados al azar de una subpoblación (F_{IS}), del total de la población (F_{IT}) o de cada una de las subpoblaciones (F_{ST}). F_{IS} y F_{IT} caracterizan un exceso o déficit de heterocigotos, mientras que F_{ST} mide el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Estos parámetros se relacionan a través de la expresión $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) \cdot (1 - F_{ST})$. Nei (1977) reformuló los índices F basándose en los valores de heterocigosis observada y esperada. En este modelo, que es independiente del número de alelos presentes en cada locus, la diferenciación o estructura de la población se mide por un parámetro denominado G_{ST} , análogo al F_{ST} y que cumple la siguiente relación $(1 - G_{IT}) = (1 - G_{IS}) (1 - G_{ST})$, donde $G_{ST} = (H_T - H_e) / H_T$, siendo H_e la heterocigosis esperada en una subpoblación (o la media de las heterocigosis esperadas de las subpoblaciones) y H_T la heterocigosis esperada en la población total. Una vez introducida la definición de diversidad genética de Nei (G_{ST}), H_e viene a representar la diversidad genética dentro de la subpoblación y H_T la diversidad genética en la población total. A su vez, el análogo al parámetro F_{IS} , se calcularía como $G_{IS} = (H_o - H_e) / H_e$, siendo H_o la homocigosis esperada y H_e la homocigosis esperada en la subpoblación. Esta forma de afrontar los estadísticos F permite su obtención directa mediante información genealógica (Caballero

$$F_{IS} = \frac{\tilde{F} - \tilde{f}}{1 - \tilde{f}}$$

y Toro 2002), pudiendo calcularse esos parámetros como

$$F_{ST} = \frac{\tilde{f} - \bar{f}}{1 - \bar{f}} \quad \text{y} \quad F_{IT} = \frac{\tilde{F} - \bar{f}}{1 - \bar{f}}, \quad \text{donde } \bar{f}, \tilde{F} \text{ son, respectivamente, la}$$

coascendencia media y el coeficiente de consanguinidad para el total de la población y \tilde{f} la coascendencia media en la subpoblación.

Los estimadores clásicos de diferenciación genética entre poblaciones F_{ST} y G_{ST} están considerados herramientas de trabajo apropiadas en los casos de razas en recesión en que las líneas genealógicas pueden estar relativamente próximas y en las que la deriva genética y no la mutación parece tener el papel más relevante en el proceso de diferenciación. En ese sentido, el modelo de Reynolds *et al.* (1983), que asume condiciones puras de ausencia de mutación, está fuertemente relacionado con la F_{ST} ya que la distancia de propuesta por esos autores (distancia de Reynolds) se calcula

$$F_{ST} \cong \frac{\frac{J_X J_Y}{2} - J_{XY}}{1 - J_{XY}}$$

como $D_R = -\ln(1 - F_{ST})$, donde D_R , que, a su vez, se relaciona linealmente con la distancia mínima (D_m) de Nei (1987) que se encuentra en el numerador. Eding y Laval (1999) encuentran que D_R es la distancia que mejor caracteriza procesos evolutivos recientes.

2.3.4. Tamaño efectivo molecular

La importancia de la información proporcionada por el tamaño efectivo (N_e), unido a la progresiva disponibilidad de información molecular, hizo que a partir de la década de los 80 del siglo pasado se propusieran diferentes métodos para la estimación del tamaño efectivo en poblaciones naturales (Hill 1981; Waples 1989; Waples 1991). El objetivo de estos métodos era obtener, en ausencia de genealogías, estimas de un parámetro esencial para conocer la capacidad evolutiva de una población en términos del riesgo de su viabilidad o su capacidad productiva o extractiva.

La dificultad de instrumentar un registro genealógico fiable en muchas poblaciones pequeñas de animales domésticos y la necesidad de acumular genealogías suficientemente profundas durante mucho tiempo, especialmente en especies con intervalo general largo, ha provocado el

interés de los ganaderos en estas técnicas (Cervantes *et al.* 2011b; Goyache *et al.* 2011). La asunción principal de las metodologías de estimación del N_e mediante información molecular es que la deriva genética de una población se manifiesta en las frecuencias alélicas observadas empíricamente en loci neutros a la selección. En términos generales, las diferentes metodologías propuestas se pueden clasificar en metodologías de muestra única y métodos temporales.

2.3.4.1. Desequilibrio de ligamiento

Aunque se han propuesto métodos para estimar el N_e mediante una muestra única basados en la coascendencia molecular ($\sum_{i,j} x_{ij} y_{ij}$; Nei 1987; ver sección 2.3.3.1) entre los individuos que componen una muestra (Nomura, 2008), los métodos de muestra única se basan, fundamentalmente, en la información proporcionada por el desequilibrio de ligamiento (Hill 1981; Waples 1991). Este método asume que, en un sistema de apareamientos al azar, las diferencias entre las frecuencias gaméticas y genotípicas esperadas y las observadas se deben a deriva genética y pueden utilizarse para estimar el N_e de la población estudiada.

Originalmente, se propuso el cálculo del tamaño efectivo basado en desequilibrio de ligamiento ($N_{e(LD)}$) entre loci no ligados y neutros a la selección como $N_{e(LD)} = 1/(3 \times (r^2 - 1/S))$, donde r^2 es media aritmética de la correlación entre alelos para cada loci y S la media armónica del tamaño muestral (Hill 1981; Waples 1991). Waples (1991) derivó los intervalos de confianza de las estimas de $N_{e(LD)}$ mediante Chi cuadrado.

Aunque la metodología se aplicó inicialmente en loci no ligados, no excluye la utilización de loci ligados (Hill 1981). Sin embargo las estimas de $N_{e(LD)}$ pueden verse afectadas por numerosas fuentes de sesgo, especialmente el tamaño muestral, el número de loci genotipados y el número de alelos que se presentan en baja frecuencia en la población estudiada (England *et al.* 2006; Luikart *et al.* 2010; Waples y Do 2010). Si el tamaño muestral es menor que el verdadero N_e de la población estudiada

las estimas de $N_{e(LD)}$ resultados obtenidas pueden estar muy sesgadas ya que el desequilibrio de ligamiento producido por el muestreo puede confundir la señal real de la población estudiada (England *et al.* 2006). De forma similar, un número de loci insuficiente puede ser incapaz de recoger la señal de deriva de la población. Cuando el número de marcadores disponible es escaso es recomendable realizar estimas de $N_{e(LD)}$ con números creciente de loci para comprobar la estabilidad de las estimas de $N_{e(LD)}$. Ese mismo razonamiento se aplica a los alelos en baja frecuencia: puede haber notables diferencias entre estimas obtenidas excluyendo alelos que estén por debajo de diferentes umbrales de frecuencia (Waples y Do 2008).

2.3.4.2. Métodos temporales:

Los métodos de estimación del tamaño efectivo de única muestra tienen el atractivo de reducir notablemente el esfuerzo de muestreo. Sin embargo, las notables fuentes de sesgo que pueden afectar a las estimas de $N_{e(LD)}$ ha aconsejado la adopción de otros métodos basados en remuestrear en diferentes momentos la misma población para obtener una mejor estima de las fuerzas de deriva genética que actúan sobre ella. Los así llamados métodos temporales pueden dar mejores resultados que los de muestra única cuando la señal producida por la deriva tiende a ser mayor que el ruido producido por el muestreo de un número finito de individuos en poblaciones de censo reducido (Waples 1989; Waples y Yokota 2007). En todo caso, las estimas de los métodos temporales pueden estar muy condicionadas por el intervalo generacional de la especie estudiada y, en casos de señal de deriva muy débil puede estar aconsejado analizar muestras separadas entre cinco y diez generaciones (Waples y Yokota 2007) lo que resulta claramente inviable en ganadería.

Los métodos temporales se basan en el cálculo de la varianza de las frecuencias alélicas (F_k) en la forma propuesta por (Waples 1989)

$$\hat{F}_k = \frac{1}{A-1} \sum_{i=1}^A \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i + y_i)/2}$$
, donde A es el número de alelos de un locus dado y x_i e y_i las frecuencias del i ésimo alelo en la primera y la segunda muestras, respectivamente. Así, N_e puede calcularse como
$$N_e = \frac{T}{2\left[\hat{F}_k - 1/(2S_0) - 1/(2S_t)\right]}$$
, donde T es el número de generaciones entre la primera y la segunda muestra y S_0 y S_t los tamaños muestrales en la primera y la segunda muestras, respectivamente.

Al igual que los métodos basados en desequilibrio de ligamiento, los métodos temporales han experimentado un notable refinamiento en busca de estimas insesgadas de N_e , especialmente mediante la comparación x_i e y_i con los valores correspondientes al conjunto de las muestras (Jorde y Ryman 2007). De esta forma se reduce el sesgo de las estimas de N_e especialmente en tamaños muestrales pequeños y con frecuencias alélicas muy asimétricas.

2.3.3.3. Ajuste demográfico:

En todo caso, la mayor fuente de sesgo de las estimas de N_e se debe a que las muestras no son independientes por la presencia de generaciones solapadas. Los métodos para estimar el N_e mediante información molecular se propusieron, inicialmente, para su utilización en especies semélparas, cuyos individuos poseen un único episodio de reproducción antes de la muerte y cuyas muestras, por tanto, corresponden a generaciones discretas. Esto no coincide con las especies ganaderas cuyos individuos se reproducen repetidamente a lo largo de su vida (iteróparas) y que no presentan pedigrís estructurados sino generaciones solapadas (Goyache *et al.* 2011).

En estas condiciones, el muestreo resulta de gran importancia ya que los resultados obtenidos cuando los individuos que conforman la muestra se han reproducido o se han muestreado de forma no destructiva y se han

devuelto a la población (Plan I; Waples 1989) pueden variar notablemente si, por el contrario, los individuos se han muestreado antes de la reproducción o no se han devuelto a la población (Plan II; Waples 1989).

La flexibilidad de los métodos temporales permitieron a Jorde y Ryman (1995, 1996) proponer el ajuste de las estimas obtenidas para el efecto de la presencia de generaciones solapadas mediante el conocimiento de la demografía de la población estudiada entre las dos muestras disponibles. Jorde y Ryman (1995, 1996) propusieron corregir las estimas multiplicándolas por el ratio C/G , donde C es un factor de corrección obtenido a partir de las tasas de supervivencia observadas a una edad i dada (l_i) y las tasas de reproducción a cada clase de edad i (b_i) y G es el intervalo generacional. El factor de corrección obtenido C corrige por el efecto de que los mismos individuos (o sus descendientes directos) puedan estar presentes en los diferentes momentos de muestreo provocando que las frecuencias alélicas de las diferentes muestras covaríen.

En el caso de generaciones solapadas las estimas de $N_{e(LD)}$ pueden estar totalmente sesgadas, correspondiéndose con el número efectivo de reproductores (N_b) que ha producido la muestra analizada (Waples 2006). Solo muy recientemente, Waples *et al.* (2014) han propuesto ajustar las estimas de $N_{e(LD)}$ para sesgo demográfico mediante el ratio N_b/N_e . El ratio N_b/N_e puede calcularse de forma precisa mediante información demográfica basada en las tasas de supervivencia a cada edad y las tasas de nacimientos de cada uno de los sexos (Waples *et al.* 2011, 2013).

3. Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed



Multiple paternity in domestic pigs under equally probable natural matings – a case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed

J. Menéndez¹, I. Álvarez², I. Fernández², B. de la Roza³, and F. Goyache²

¹Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA), 33403 Avilés, Spain

²Área de Genética y Reproducción Animal, SERIDA-Deva, 33203 Gijón, Spain

³Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, SERIDA-Villaviciosa, 33300 Villaviciosa, Spain

Correspondence to: F. Goyache (fgoyache@serida.org)

Abstract. Here we provide evidence of multiple paternities in naturally mated sows under conditions ensuring that (a) sows had the same probability of being mated by any of the available boars and (b) no differences in hybrid vigour existed. Total DNA was obtained from 19 Gochu Asturcelta piglets from three different sows, each with the same chance of natural mating with two different boars. A set of 20 microsatellites were typed on all the individuals. The program CERVUS was used to assess the informative ability of the microsatellite set and to perform paternity assignment. Allelic frequencies at population level were obtained using a total of 141 Gochu Asturcelta individuals. Offspring were always assigned to a candidate boar with high statistical confidence. All litters had different parents. Our results show that multiple paternities are possible in domestic pigs under natural mating. Furthermore, the current study can be useful to further understand the mating system of the wild boar.

1 Introduction

Whatever the cause (male copulatory competition, post-copulatory competition or differences in semen quantity and quality), multiple paternity in wild boar has been widely reported (see Delgado et al., 2008, for a review). However, this issue has not been fully addressed with regard to domestic pigs. Heterospermic artificial inseminations give litters with multiple paternities in domestic pigs (Berger et al., 1996; Stahlberg et al., 2000). In addition, Aguilera-Reyes et al. (2006) have reported multiple paternities in naturally mated sows under a planned mating system with intervals of 12 h between each mating. The experiment by Aguilera-Reyes et al. (2006) included a few variables, namely the hybrid vigour of the most successful boar and the interval among subsequent matings that could affect the reported results. Here we give evidence of multiple paternities in naturally mated sows under the following conditions: (a) assuming the same vigour, sows had the same probability of being mated for all the available boars, and (b) no differences in hybrid vigour existed. Results were obtained from the endangered Asturcelta pig breed (Royo et al., 2008; Santos e Silva

et al., 2008), reared in very traditional conditions in Asturias (Spain).

2 Materials and methods

Two groups (A and B) of Asturcelta individuals were assessed. Group A consisted of four full sibs (two sows – A₇₂ and A₇₃ – and two boars – A₇₄ and A₇₅), born on 5 August 2005 and kept together, under loose housing, from weaning to 6 months old, in cubicles of about 450 m². Group B consisted of two full sibs, born on 30 December 2005 (one sow – B₆₉ – and one boar – B₇₆); after they were 6 months old, they were kept in a paddock together with an adult boar (B₆₆, born on 1 October 2003). There was no contact or mating restrictions within groups. Litter size was six for A₇₃ and B₆₉ and seven for A₇₂. The offspring of group A were born on 19 April (A₇₂) and 22 April (A₇₃) 2006, and those belonging to group B were born on 10 December 2005.

Skin samples were obtained from the 26 individuals. Total DNA was isolated from samples following standard procedures (Sambrook et al., 1989). Individuals were genotyped with a set of 20 microsatellites (IGF1, S0002,

Table 1. Description of the informative ability of the 19 polymorphic microsatellites genotyped.

Locus	<i>k</i>	<i>H</i> _{Obs}	<i>H</i> _{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	<i>F</i> (Null)
IGF1	8	0.490	0.601	0.565	0.793	0.616	0.420	0.195	0.500	NS	+0.105
S0002	9	0.600	0.801	0.772	0.562	0.386	0.200	0.067	0.368	–	+0.142
S0026	5	0.562	0.740	0.691	0.683	0.507	0.332	0.116	0.410	–	+0.139
S0071	6	0.688	0.747	0.702	0.664	0.488	0.306	0.108	0.405	NS	+0.028
S0101	11	0.452	0.511	0.492	0.847	0.669	0.467	0.258	0.560	NS	+0.039
S0155	6	0.712	0.708	0.656	0.708	0.538	0.356	0.137	0.431	NS	–0.007
S0225	5	0.431	0.521	0.475	0.858	0.705	0.540	0.276	0.560	NS	+0.077
S0226	10	0.609	0.714	0.679	0.682	0.498	0.298	0.115	0.423	NS	+0.063
S0227	4	0.119	0.535	0.454	0.855	0.736	0.598	0.298	0.558	–	+0.646
S0228	6	0.250	0.304	0.290	0.952	0.831	0.703	0.499	0.723	NS	+0.145
SW240	9	0.636	0.787	0.756	0.585	0.406	0.216	0.075	0.377	NS	+0.101
SW632	10	0.688	0.787	0.754	0.590	0.413	0.227	0.077	0.377	NS	+0.065
SW911	7	0.421	0.618	0.565	0.791	0.628	0.451	0.198	0.492	–	+0.205
SW936	9	0.669	0.793	0.760	0.583	0.405	0.220	0.074	0.373	NS	+0.084
SW951	4	0.324	0.323	0.298	0.947	0.832	0.713	0.484	0.710	NS	+0.001
SW857	9	0.581	0.821	0.794	0.532	0.358	0.179	0.057	0.355	–	+0.175
S0005	5	0.485	0.532	0.480	0.856	0.703	0.539	0.271	0.556	NS	+0.024
S0090	3	0.576	0.533	0.415	0.862	0.777	0.664	0.335	0.571	NS	–0.061
SW24	3	0.938	0.520	0.396	0.869	0.794	0.689	0.354	0.582	–	–0.298

k: number of alleles per locus; *H*_{Obs}: observed heterozygosity; *H*_{Exp}: expected heterozygosity; PIC: polymorphic information content; NE-1P: combined non-exclusion probability (first parent); NE-2P: combined non-exclusion probability (second parent); NE-PP: combined non-exclusion probability (parent pair); NE-I: combined non-exclusion probability (identity); NE-SI: combined non-exclusion probability (sib identity); HW: deviation from Hardy–Weinberg equilibrium; *F*(Null): frequency of null alleles.

S0026, S0071, S0101, S0155, S0225, S0226, S0227, S0228, SW240, SW632, SW911, SW936, SW951, SW857, S0005, S0090, S0218 and SW24) in an automatic sequencer (ABI 310, Applied Biosystems). Most microsatellites used were included in the ISAG-FAO panel (<http://www-igc.toulouse.inra.fr/pig/panel/panel2004.htm>). Primer sequences and PCR (polymerase chain reaction) conditions can be found on the aforementioned website and in Laval et al. (2000). Microsatellite S0218 was monomorphic in our sample and was not used in further analyses. Microsatellite information and paternity assignment analyses were carried out using the program CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Allelic frequencies at population level were obtained using a total of 141 Gochu Asturcelta individuals.

3 Results and discussion

Parameters describing the variability and informative ability of the microsatellite set used are given in Table 1. Probabilities of non-exclusion were 0.00384536 when the two parents were unknown, 0.00005149 when one parent was unknown and 0.00000005 when the two parents were known. Simulations showed that the use of the microsatellite set assayed gave 98 % successful paternity assignments with a confidence of 95 % if the genotype of the mother was not known and 100 % when this was known. Six of the microsatellites tested showed significant deviations from the Hardy–Weinberg proportions, probably due to inbred matings. Since

the analysed samples came from inbred individuals, this scenario can be considered acceptable. In a recent report, Costa et al. (2012) tested a microsatellite set for parentage analyses in three different populations of European wild boar. Even though such a microsatellite set showed a comparable informative ability to that used in the current analysis (see Table 1 of that paper), Costa et al. (2012) found some failures in detecting any putative father within their samples due to insufficient male sampling. This concern is not relevant to our study.

Table 2 gives the results obtained in paternity assignments. No pair–loci mismatching was identified for any sow–offspring couple. Offspring were always assigned to a candidate boar with high statistical confidence. All litters had two different parents; the boar A₇₄ had six offspring, A₇₅ had seven offspring, B₆₆ had four offspring and B₇₆ had two offspring. A chi-square test showed that no statistical differences in paternity success were assessed in group A. The higher paternity success observed for the adult boar B₆₆ can be explained by its higher probabilities of success in male–male competition for accessing reproduction. Mate guarding has been reported to play a significant role in sexual selection in wild boar (Delgado et al., 2008). By contrast with previous reports (Aguilera-Reyes et al., 2006), our data were obtained without copulatory restrictions and, particularly in the case of the full sibs forming the analysed group A, no differences in hybrid vigour.

Table 2. Results of paternity assessment obtained using the program CERVUS. The assigned fathers are those with higher LOD score.

Offspring code	Mother code	Pair LOD score ^a	Assigned father	Pair LOD score ^b	Pair Delta ^{b,c}	Pair confidence ^d
A93	A73	1.35×10^{15}	A74	9.72×10^{14}	9.72×10^{14}	*
A94	A73	1.02×10^{15}	A75	3.82×10^{14}	3.82×10^{14}	*
A95	A73	1.03×10^{15}	A75	5.58×10^{14}	2.92×10^{14}	*
A96	A73	1.12×10^{15}	A74	1.04×10^{15}	6.31×10^{14}	*
A97	A73	1.04×10^{15}	A74	9.88×10^{14}	8.67×10^{14}	*
A98	A73	8.60×10^{14}	A75	4.30×10^{14}	2.25×10^{14}	*
A99	A72	1.23×10^{15}	A75	5.69×10^{14}	2.44×10^{14}	*
A100	A72	1.15×10^{15}	A75	1.95×10^{14}	1.95×10^{14}	*
A101	A72	1.11×10^{15}	A74	8.16×10^{14}	7.88×10^{14}	*
A102	A72	1.13×10^{15}	A75	2.42×10^{14}	2.42×10^{14}	*
A103	A72	9.17×10^{14}	A75	5.26×10^{14}	5.26×10^{14}	*
A104	A72	9.25×10^{14}	A74	7.15×10^{14}	3.08×10^{14}	*
A105	A72	1.08×10^{15}	A74	8.93×10^{14}	3.25×10^{14}	*
B50	B69	1.42×10^{15}	B76	1.19×10^{15}	1.19×10^{15}	*
B51	B69	9.23×10^{14}	B66	4.74×10^{14}	9.59×10^{12}	*
B52	B69	6.91×10^{14}	B66	7.09×10^{14}	4.77×10^{14}	*
B53	B69	1.41×10^{15}	B76	1.15×10^{15}	9.86×10^{14}	*
B54	B69	7.16×10^{14}	B66	5.41×10^{14}	1.03×10^{14}	*
B55	B69	9.46×10^{14}	B66	6.16×10^{14}	2.79×10^{14}	*

^a LOD: scores of the logarithm of the likelihood ratio; ^b figures must be multiplied by 10^{14} ; ^c Delta is defined as the difference in LOD scores between most likely and the second most likely candidate; ^d confidence level of CERVUS paternity assignments. An asterisk indicates a statistical confidence on paternity assignment higher than 95 % using the "strict" criterion implemented in CERVUS. Note that the alternative relaxed criterion would mean a statistical confidence higher than 80 %.

Our results clearly show that (a) multiple paternities are possible in domestic pigs under natural mating and (b) when no differences in animal size, development, hybrid vigour or probabilities of mating exist, no differences in paternity success are to be expected. Our results can also be useful to further understand the mating system of the wild boar (Costa et al., 2012). There is extensive evidence of multiply sired litters in wild boar that are likely to be due to ethological rather than to biological factors (Aguilera-Reyes et al., 2006; Delgado et al., 2008; Poteaux et al., 2009).

Acknowledgements. This work was partially funded by a specific contract between the government of the *Principado de Asturias* and the *Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta* (ACGA; <http://www.gochuasturcelta.org/>). I. Álvarez, I. Fernández and F. Goyache are supported by grant FICYT GRUPIN14-113.

Declaration. None of the authors have any conflict of interest to declare. The authors declare that this manuscript contains original data which have not been published before.

Edited by: S. Maak

Reviewed by: two anonymous referees

References

- Aguilera-Reyes, U., Zavala-Páramo, G., Valdez-Alarcón, J. J., Cano-Camacho, H., García-López, G. I., and Pescador-Salas, N.: Multiple mating and paternity determinations in domestic swine (*Sus scrofa*). *Anim. Res.*, 55, 409–417, 2006.
- Berger, T., Anderson, D. L., and Penedo, M. C. T.: Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.*, 44, 231–239, 1996.
- Costa, C., Pérez-González, J., Santos, P., Fernández-Llario, P., Caranza, J., Zsolnai, A., Anton, I., Buzgó, J., Varga, G., Monteiro, N., and Beja-Pereira, A.: Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*) *BMC Res. Notes*, 5, 479, 6 pp., doi:10.1186/1756-0500-5-479, 2012.
- Delgado, R., Fernández-Llario, P., Azevedo, M., Beja-Pereira, A., and Santos, P.: Paternity assessment in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) – Are littermates full-sibs?, *Mamm. Biol.*, 73, 169–173, 2008.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., and Marshall, T. C.: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, *Mol. Ecol.*, 16, 1099–1006, 2007.
- Laval, G., Iannuccelli, N., Legaut, D., Milan, D., Groenen, M. A. M., Giuffra, E., Anderson, L., Nissen, P. H., Jørgensen, C. B., Beeckmann, P., Geldwermann, H., Foulley, J. L., Chevalet, C., and Ollivier, L.: Genetic diversity of eleven European pig breeds, *Genet. Sel. Evol.*, 32, 187–204, 2000.

- Poteaux, C., Baubet, E., Kaminski, G., Brandt, S., Dobson, F. S., and Baudoin, C.: Socio-genetic structure and mating system of a wild boar population, *J. Zool.*, 278, 116–125, 2009.
- Royo, L. J., Álvarez, I., Fernández, I., Pérez-Pardal, L., Álvarez-Sevilla, A., Godinho, R., Ferrand, N., and Goyache F.: Genetic Characterisation of Celtic-Iberian Pig Breeds Using Microsatellites, in: Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig, edited by: Nanni Costa, L., Zambonelli, P., and Russo, V., Italian National Library in Florence, Italy, 32–35, 2008.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (Eds.): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.
- Santos e Silva, J., Vicente, A., Alves, C., Fernandes, P., Carril, J. A., Álvarez-Sevilla, A., Fernández, L., Álvarez, I., and Goyache F.: Dynamic and Socio-Economical Valorisation of the Local Celtic Pig Breeds, in: Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig, edited by: Nanni Costa, L., Zambonelli, P., and Russo, V., Italian National Library in Florence, Italy, 390–398, 2008.
- Stahlberg, R., Harlizius, B., Weitze, K. F., and Waberski, D.: Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars, *Theriogenology*, 53, 1365–1373, 2000.

*4. Genealogical analysis of the Gochu
Asturcelta pig breed: insights for conservation*

Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation

J. MENENDEZ¹, I. ALVAREZ², I. FERNANDEZ², F. GOYACHE²

¹Breeders Association of Gochu Asturcelta (ACGA), Avilés, Spain

²SERIDA-Deva, Gijón (Asturias), Spain

ABSTRACT: The Breeders Association of Gochu Asturcelta (ACGA) initiated a recovery programme with six founders (three boars and three sows) in 2002. Information provided by a total of 3156 records (515 litters, 109 boars, and 309 sows) with father and mother known included in the Gochu Asturcelta herdbook was analyzed. The aim of the analyses was to assess if the mating policy implemented by the breeders association ACGA has been successful in preserving the genetic background of the founders in the present population. Two reference populations were defined: 232 individuals born in 2013 and 2014 (PopO), and 18 individuals born in 2012 and 2013 and kept for reproduction (PopR). Mean inbreeding was very high (0.230 ± 0.078 for the whole pedigree) with mean individual increase in inbreeding (ΔF_i) of 0.067 ± 0.021 for PopO and PopR. However, mean ΔF_i tended to keep steady values (around 0.07) after 2009. The number of founders identified for PopO and PopR was 4 and 5, respectively. The ratio between the effective number of ancestors (f_a) and effective number of founders (f_e) was roughly 1 for both PopO and PopR. This suggests that the ACGA's mating policy has avoided an extreme bottleneck in the population. However, drift caused noticeable losses of genetic diversity: ratio between the founder genome equivalents (f_g) and f_e was around 0.6 for the two reference populations. The current results highlight the need of unbalancing further genetic contributions to the population towards descendants of a very poorly represented founder (Fema 1).

Keywords: genetic variability; pedigree analysis; founder contribution; conservation of genetic stock

INTRODUCTION

Gochu Asturcelta is an extremely endangered pig breed native of Asturias (northern Spain). The breed derives from the ancient Asturiana pig breed (Aparicio 1944), related to the Galician Celta or the Portuguese Bísara breeds (Alvarez Sevilla 2005), which was one of the most developed domestic pig populations in Spain till the second half of the 20th century. The intensification of pig production and the introduction of cosmopolitan pig breeds led to a dramatic decline of population size and the Asturiana pig populations nearly became extinct at the end of the 20th century. In 2002, a group of enthusiastic farmers founded the breeders associa-

tion ACGA and initiated a recovery programme with six founders (three boars: 9000 L'Utiru, 9002 Machu, and 9005 Tixu, and three sows: 9001 La Preñá, 9003 Fema 1, and 9006 Fema 2) showing accordance with the ancient type of the breed. In 2005, a government-run herd owned by the regional administration of Asturias was founded at the facilities of SERIDA-Villaviciosa to contribute to the recovery of the breed. Descendants of the ACGA's founders were bred at the herd of SERIDA to supply the Gochu Asturcelta reproductive individuals to interested farmers. At present, the breed is officially included in the Spanish Catalogue of Livestock Breeds (Regulation APA/53/2007) and the Gochu Asturcelta herdbook includes (May

Partially supported by a contract between the Government of Asturias and the Breeders Association of Gochu Asturcelta. I. Álvarez, I. Fernández, and F. Goyache were supported by grant FICYT GRUPIN14-113.

The authors declare no competing interests.

doi: 10.17221/8787-CJAS

2014) 4884 individuals registered and 46 herds. Since the beginning of the breeding programme a total of 68 herds became part of the ACGA till August 2014 giving, on average, 72 records each to the herdbook of the breed.

The most usual scenario for livestock populations undergoing conservation programmes is the formation of a founder population, as large as possible, which quickly undergoes a strong population bottleneck due to selection for desirable type characteristics or unexpected reproduction failure for some of the founders (Royo et al. 2007; Alvarez et al. 2008). The Gochu Asturcelta situation departs from this general scenario: the founder population size was extremely small and mating policy aimed at keeping founder contributions balanced across generations. The reproductive career of the direct descendant of the founders was prolonged as much as possible and later the SERIDA's multiplier herd was opened to new reproductive individuals selected from the population according to their type characteristics and low genetic representation. The dependence on the SERIDA's multiplier herd has been further used by the ACGA to give guidelines to the farmers to avoid matings between very close relatives. A decade after triggering the conservation programme of the Gochu Asturcelta pig breed the information included in the herdbook reaches depth enough to assess if the ACGA's mating policy has been successful in preserving the genetic background of the founders in the present population.

Genealogical analyses have proved to be useful to characterize genetic variability and to implement strategies for the preservation of the genetic background (Alvarez et al. 2010; Pjontek et al. 2012). Reports analyzing pedigree data in pig are scant (Toro et al. 2000; Melka and Schenkel 2010; Welsh et al. 2010; Tang et al. 2013). Despite the local origin and development of the breed, the analysis of the very particular genetic scenario of the Gochu Asturcelta pig breed will give insights of general interest for breeders and conservationists.

MATERIAL AND METHODS

Data and reference populations. Data provided by the breeders association (ACGA) included 4883 records belonging to individuals registered in the herdbook from its foundation to August 2014. Non-founder individuals with no genealogies and

no offspring in data (mainly used for slaughtering) were removed from the dataset. A total of 38 records belonging to non-founder individuals with offspring in data did not have identification on father (26) or mother (12). To avoid any noise in the assessment of the breeding patterns, these individuals and their offspring were removed from the analyzed dataset. Therefore, the final dataset included 3156 records from 515 litters. A total of 109 boars and 309 sows had offspring in data.

Two different reference populations were defined for genetic analyses: (1) PopO, including the offspring (232 individuals) born in 2013 and 2014, and (2) PopR, including 18 individuals born in 2012 and 2013 and kept for reproduction. For descriptive purposes, most parameters will be given for the whole pedigree as well.

Parameters computed. The following parameters were computed using the program ENDOG v. 4.8 (Gutierrez and Goyache 2005):

Generation intervals were computed, using birth dates of registered animals together with those of their fathers and mothers, as the average age of parents at the birth of their useful offspring. Four pathways (father–son, father–daughter, mother–son and mother–daughter) were considered.

The number of equivalent complete generations traced (t) computed as the sum of $(1/2)^n$, where n is the number of generations separating the individual from each known ancestor (Maignel et al. 1996).

The inbreeding coefficient (F), defined as the probability that two alleles at a randomly chosen locus are identical by descent (Malecot 1948), and the average relatedness coefficient (AR), defined as the probability that an allele randomly chosen from the whole pedigree belongs to a given animal (Goyache et al. 2003; Gutierrez et al. 2003), were computed for each individual included in the dataset. Note that the AR coefficient of a founder means its genetic contribution to the population. For each reference population, these coefficients can be summed up for the founders to ascertain their relative contributions to the studied population.

The probability of gene origin was characterized by computing the following parameters: (a) effective number of founders (f_e), which is the reciprocal of the probability that two alleles drawn at random in the studied population originate from the same founder (James 1972), computed

from the genetic contribution of founders to the descendant gene pool of the population (Lacy 1989); (b) effective number of ancestors (f_a), defined as the minimum number of ancestors, not necessarily founders, explaining the complete genetic diversity of a population (Boichard et al. 1997). Parameter f_a does not fully account for gene loss by drift from the ancestors to a reference population but complements the information offered by f_e accounting for the losses of genetic variability produced by the unbalanced use of reproductive individuals producing bottlenecks (Boichard et al. 1997; Gutierrez et al. 2005); and (c) the founder genome equivalents (f_g) (Ballou and Lacy 1995), defined as the theoretically expected number of founders that would be required to provide the genetic diversity in the present population if the founders were equally represented and had lost no alleles, was obtained by the inverse of twice the average coancestry of the individuals within each reference population (Caballero and Toro 2000). Finally, the effective number of non-founders (nf_e) was computed following Caballero and Toro (2000) as

$$nf_e = \left(\frac{1}{f_g} - \frac{1}{f_e} \right)^{-1}$$

where:

$1/f_g$ = estimator of the gene diversity accounting for unequal contributions of founders (GD)

$1/f_e$ = estimator of the gene diversity or expected heterozygosity in the founder population (GD^{*})

Therefore, $1/nf_e$ estimates the genetic diversity lost due to random drift (RD), where

$$RD = GD^* - GD$$

From the coancestry information, Wright's (1969) F_{IS} statistics was obtained as

$$F_{IS} = \frac{\bar{F} - \bar{f}}{1 - \bar{f}}$$

where:

\bar{F} = mean inbreeding coefficient for the entire metapopulation

\bar{f} = average coancestry for the subpopulation (Caballero and Toro 2000, 2002)

Effective population sizes (N_e) were estimated on the basis of the individual increase in inbreeding ΔF_i (Gutierrez et al. 2009) and coancestry ΔC_{ij} (Cervantes et al. 2011a) considering

$$\Delta F_i = 1 - t_{i-1} \sqrt{1 - F_i}$$

$$\Delta C_{ij} = 1 - (t_i + t_j)^{1/2} \sqrt{1 - C_{ij}}$$

where:

F_i = inbreeding coefficient of individual i

C_{ij} = coancestry coefficient between individuals i and j

t_i, t_j = respective equivalent complete generations

Finally, effective sizes were computed using the following formulae:

$$N_e F_i = 1/(2 \Delta F)$$

$$N_e C_{ij} = 1/(2 \Delta C)$$

RESULTS

The edition of the available dataset ensured the quality of the information analyzed: up to 97.2% of the individuals had all grand-fathers known and 80.2% had all great grand-fathers known.

Demographic parameters. Figure 1 illustrates the development of the Gochu Asturcelta pig breed herdbook. The maximum number of active herds in data was 35 in 2009 and 2010. However, the number of herds contributing to the herdbook with useful offspring during the same period was 20. After 2010 the number of herds contributing to the herdbook quickly decreased with only 3 herds giving offspring with father and mother known in 2013. The number of individuals, with father and mother known, registered in the herdbook by year increased from its foundation to 2009 (with a maximum of 724 records). The highest number of sows giving offspring with complete genealogies to the herdbook was 98 in 2008. Consistently with the decrease in the number of active herds, only 240 individuals were registered in the herdbook in 2012 with only 18 individu-

Table 1. Mean generation intervals (\pm standard error), in years, for the four pathways parent–offspring computed using the whole pedigree of the Gochu Asturcelta pig breed

Pathway	<i>n</i>	Years
Boar–son	100	2.0 (\pm 0.09)
Boar–daughter	264	1.7 (\pm 0.05)
Sow–son	100	1.8 (\pm 0.09)
Sow–daughter	264	1.7 (\pm 0.06)
Average	728	1.8 (\pm 0.03)

doi: 10.17221/8787-CJAS

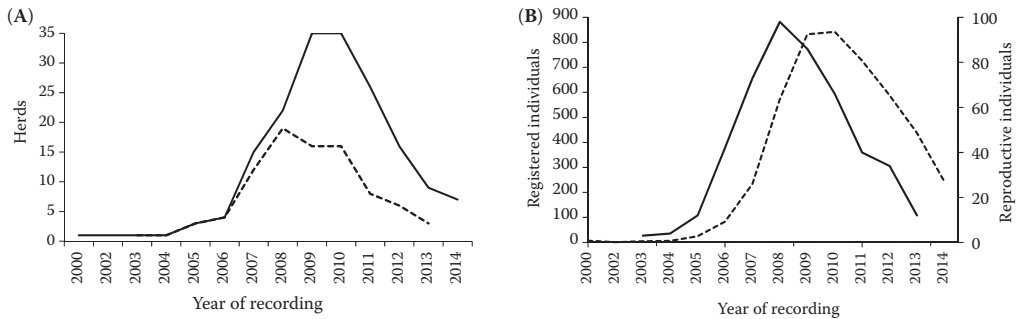


Figure 1. Number of registrations in the Gochu Asturcelta herdbook by years in the analyzed dataset total (dashed line) and active (herds giving offspring; solid line) number of herds in the herdbook (A), total (dashed line) and the number of individuals giving offspring (solid line) registered in the herdbook (B)

als giving offspring to the herdbook during that year of recording.

The average generation interval computed was 1.8 (± 0.03) years. The period for selection of females for reproduction was always shorter (1.7 years) than the period for selection of new boars (2.0 ± 0.09 years for the boar–son pathway) (Table 1).

Parameters characterizing genetic diversity. Table 2 gives parameters characterizing genetic diversity in the two reference populations defined and in the whole pedigree of the Gochu Asturcelta pig breed. The average number of equivalents to

complete generations was higher than 5 for the two reference populations fitted and 4.3 ± 0.9 for the whole pedigree.

The total number of founders identified was 4 and 5 for the two reference populations defined, PopO and PopR, respectively, and 6 for the whole pedigree. Despite this extremely low number of founders, variability was significantly preserved. The values of f_e and f_a were basically the same for the two reference populations and for the whole pedigree. Surprisingly, the ratio of f_a to f_e is higher than 1 for the whole pedigree. This unexpected

Table 2. Parameters characterizing the probability of gene origin of the animals included in the two reference populations defined: animals born and registered in 2013 and 2014 (PopO) and animals born in 2012 and 2013 and kept for reproduction (PopR). The same parameters are given for the whole pedigree defined as all the individuals with both parents known (default definition of a reference population implemented in the program ENDOG)

	PopO	PopR	Whole pedigree
Total number of animals in the population	232	18	3149
Total number of founders	4	5	6
Effective number of founders (f_e)	3.50	3.48	3.47
Effective number of ancestors (f_a)	3.48	3.47	4.19
Founder genomes equivalents (f_g)	1.95	1.97	2.23
Effective number of non-founders (nf_e)	4.40	4.54	6.24
Ancestors explaining 100% of genetic variability	4	5	10
Ancestors explaining 50% of genetic variability	2	2	2
Inbreeding (F)	0.289 ± 0.085	0.249 ± 0.070	0.230 ± 0.078
Average relatedness (AR)	0.448 ± 0.018	0.450 ± 0.022	0.447 ± 0.038
Individual increase in inbreeding (ΔF)	0.067 ± 0.021	0.067 ± 0.021	0.079 ± 0.034
Equivalent to complete generations (t)	5.4 ± 0.5	5.2 ± 0.4	4.3 ± 0.9
$N_e F_i$	6.45 ± 0.91	7.44 ± 0.87	6.29 ± 1.08
$N_e C_{ij}$	9.15 ± 0.54	9.91 ± 0.41	7.09 ± 0.52
F_{IS}	0.044	-0.007	0.008

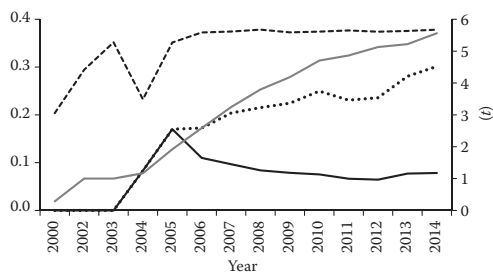


Figure 2. Average inbreeding values (dotted line), mean individual increase in inbreeding (solid black line), mean average relatedness (AR; dashed line), and average equivalent to complete generations (t ; solid grey line) in the Gochu Asturcelta pig breed herdbook by year of birth of the individuals

result illustrated that the method of Boichard et al. (1997) was not able to identify an abusive use of some individuals for reproduction that would have led to a bottleneck in the population. Alternatively, losses of diversity caused by drift were assessed using the effective number of non-founders, which could be interpreted in a similar manner as f_a (Caballero and Toro 2000). Parameter

nf_e was higher than f_a , and even higher than the actual number of founders, except for PopR, for each analyzed population (Table 2). In any case, drift caused noticeable losses of genetic diversity: f_g/f_e ratio was around 0.6 for the two reference populations (0.64 for the whole pedigree).

Figure 2 shows the variation of inbreeding, individual increase in inbreeding, average relatedness, and number of equivalents to discrete generations by year of birth of the individuals. As expected, both t and F steadily increased with years to reach values of 0.30 ± 0.09 and 5.5 ± 0.59 , respectively, in 2014. However, after an initial sudden increase (0.17 in 2005) ΔF_i kept values around 0.07 after 2009. This is consistent with the variation assessed for AR which has kept steady on 0.37–0.38 since 2006. Note that AR is roughly two-fold coancestry. Table 2 gives the mean F , AR, and ΔF_i values for the assessed populations. PopO had the highest mean F (0.289 ± 0.085) while this parameter took a value of 0.230 ± 0.078 for the whole pedigree. Mean AR values computed were quite similar whatever the reference population considered (0.447 ± 0.038 for the whole pedigree). Mean ΔF_i

Table 3. Description of the founders¹ and ancestors² identified for each reference population defined in the Gochu Asturcelta pig breed herdbook

Founders/ancestors	Father	Mother	Sex	Year	Average relatedness (%)			Explained variability ³ (%)		
					whole pedigree	PopO	PopR	whole pedigree	PopO	PopR
0004 Sieru	9000 L'Utiru	9001 La Preñá	male	2003				36.28		
0001 L. láscaras	9000 L'Utiru	9001 La Preñá	female	2003				24.10		
0008 Kéndanu	9002 Machu	9006 Fema 2	male	2004				14.48	19.05	16.49
0009 Manteiga	9002 Machu	9006 Fema 2	female	2004				14.05	12.15	11.72
0005 Pola	9000 L'Utiru	9001 La Preñá	female	2003				8.83		
0010 Leonor	0006 Salva	9003 Fema 1	female	2005				1.97		
9000 L'Utiru			male	2000	35.19	34.40	35.16	0.12	34.40	35.16
9001 La Preñá			female	2000	35.19	34.40	35.16	0.12	34.40	35.16
9005 Tixu			male	2004	0.06			0.03		
9003 Fema 1			female	2000	1.03		1.48	0.02		1.48
9002 Machu ⁴			male	2000	14.27	15.60	14.11			
9006 Fema 2 ⁴			female	2000	14.27	15.60	14.11			

PopO = reference population including the offspring born in 2013 and 2014, PopR = reference population including the individuals born in 2012 and 2013 and kept for reproduction

¹founders are those with non-zero average relatedness coefficients

²ancestors are those with non-zero explained variability coefficients

³computed using the method of Boichard et al. (1997) (see Material and Methods section)

⁴non-ancestor founder

doi: 10.17221/8787-CJAS

was the same for PopO and PopR (0.067 ± 0.021) but higher for the whole pedigree (0.079 ± 0.034).

The estimates of N_e given in Table 2 varied with both the methodology used and the dataset assessed. Estimates were always higher when the coancestry-based method was used. Estimates of $N_e F_i$ varied from 6.29 ± 1.08 (whole pedigree) to 7.44 ± 0.87 (PopR). In turn, estimates of $N_e C_{ij}$ varied from 7.09 ± 0.52 (whole pedigree) to 9.91 ± 0.41 (PopR).

Even though F_{IS} took a negative value for PopR, this parameter was roughly 0 for PopR and for the whole pedigree. However, F_{IS} was positive and high (0.044) for PopO.

Table 3 gives a description of the genetic variability explained by the founders and ancestors identified for each reference population. One of the actual founders of the breed (Tixu) had no viable grandsons and, therefore, its contribution to the breed was negligible ($AR = 0.06\%$) and nonexistent in the present reference populations (PopO and PopR). One female founder (Fema 1) had a very poor contribution to the breed but it still remained present in PopR (contribution of 1.48%). The other four founders formed two families (L'Utiru \times La Preñá and Machu \times Fema 2) which explained most of the genetic variability of the breed. In the whole pedigree, analyses could not find a clear bottleneck after the foundation of the breeding programme and both the founders L'Utiru and La Preñá and their descendants were identified as ancestors. Moreover, L'Utiru and La Preñá were identified as the main ancestors of the breed for PopO and PopR together with the offspring of Machu \times Fema 2.

DISCUSSION

Demographic analyses. Average generation interval computed for Gochu Asturcelta (1.8 years) is consistently the same as the others previously reported in the literature for non-endangered pig breeds. Melka and Schenkel (2010) reported generation intervals of 1.6 and 1.7 years for Canadian Duroc and Landrace, respectively; Welsh et al. (2010), analyzing the pedigree of five United States pig breeds, reported generations intervals ranging from 1.7 (Berkshire) to 2.2 (Yorkshire) years; Tang et al. (2013), in three cosmopolitan pig breeds imported into China, reported generation intervals ranging between 1.8 and 1.9 years.

In contrast, the computed generation interval is lower than that of 2.45 years (ranging from 1.92 to 3.17 years for different cohorts) reported for the 'El Dehesón del Encinar' herd of Iberian pig (Toro et al. 2000) kept closed since its foundation in 1944. The very particular genetic scenario of the Gochu Asturcelta pig breed, characterized by a very low founder population size, could have led to an enlargement of the generation interval to avoid inbreeding accumulation. However, the interest in supplying with reproductive individuals to an increasing number of farmers has caused that the population dynamics of the breed is closer to that of a commercial pig breed than to that of a pig population under a preservation programme. In any case, this commercial-like breeding pattern topped out after 2010 when the possibilities of recruitment of new farmers decreased (Figure 1).

Genetic scenario. In any case, the general scenario of the Gochu Asturcelta pig breed can hardly be compared with others in the literature. Indeed, pedigree depth is substantially lower than the depths reported for the well-established commercial pig breeds of Canada and the United States (Melka and Schenkel 2010; Welsh et al. 2010) which included, in general, more than 11 complete generation equivalents. Nevertheless, the mean inbreeding in the breed is up to seven-fold higher than that reported for these American pig populations, ranging from 0.032 to 0.078. Furthermore, most estimates of effective population sizes available in the literature (usually ranging from $N_e = 72$ to $N_e = 125$) have been obtained in pig breeds with founder populations including hundreds or thousands individuals and rates of inbreeding per generation lower than 1% (Melka and Schenkel 2010; Welsh et al. 2010; Tang et al. 2013). Melka and Schenkel (2010) reported $N_e = 14$ for the Canadian Hampshire pig which had a founder population size of 257 individuals and a rate of inbreeding of 0.036. Toro et al. (2000) reported an average population size of 13.8 for the Iberian pig herd of 'El Dehesón del Encinar' corresponding to a rate of inbreeding of 0.022. The N_e reported by Toro et al. (2000), for a population derived from 20 males and 82 females which initiated a closed breeding programme in 1944 (Silio and Rodriganez 2013), is probably overestimated due to the fact that it was computed using family variances. In a scenario of overlapping generations, computation of N_e based on family variances ignores several causes of vari-

ation of the parameter, namely mating between relatives or different representation of founders (Gutierrez et al. 2008). To illustrate this point we have computed N_e based on family variances for each biannual period (mimicking the average generation interval) from 2007 to 2010 using the program ENDOG. The values obtained varied from $N_e = 21.3$ (period 2009–2010) to $N_e = 34.5$ (period 2007–2008) which are clear overestimates of the effective sizes computed for the reference populations PopR and PopO (Table 2).

The main estimates of N_e given in the current analysis for the Gochu Asturcelta pig ($N_e F_i$), whatever the reference population considered, roughly resembled the actual number of founders of the breed. Considering the high mean F of the pedigree analyzed, lower N_e values would be likely. However, after a sudden increase of F during the first stages of the breeding programme due to wrong breeding practices including full-sib matings (Menendez et al. 2015), the breeding policy avoided matings between close relatives as much as possible (Figure 2). This led to minimizing the increase in AR and even to a decrease in mean ΔF_i in the last few years of pedigree recording. In such scenario, computation of N_e via regression of F on t (Gutierrez et al. 2003) gave unrealistic estimates including negative N_e values for PopO (data not shown). The current estimates of $N_e F_i$ are not affected by mating policy or bottlenecks caused by poor use of reproducing individuals (Cervantes et al. 2008). Note that the genealogical differentiation of the two reference populations fitted (PopR and PopO) is negligible ($F_{ST} = 0.0033$) and, therefore, it is not likely that the scenario described for PopO is affected by a very recent change in mating policy.

Insights for conservation. Whatever the N_e threshold chosen to consider a livestock breed to be at risk (Leroy et al. 2013), the Gochu Asturcelta pig breed is extremely endangered. Since one of the founders of the breed is not represented in the present population, the maximum number of founders available for the reference populations would be 5. These five founders are still genetically represented in PopR. This fact enables us to consider that the breeding policy of the ACGA has been successful. Despite the value of F_{IS} was high and positive for PopO, this parameter was basically zero in the whole pedigree and even negative for PopR. Parameter F_{IS} is equivalent to the parameter alpha proposed by Caballero and

Toro (2000) and informs on the avoidance (or not) of matings between relatives, thus characterizing the breeding policy. In the whole pedigree and, particularly, for the selection of the parents for the next generation (PopR), breeders follow strict avoidance of matings between close relatives. Most of the individuals forming PopO will supply local market demands for quality pork meat.

Related to that, one of the most striking features of the current analysis is that $f_a > f_e$ for the whole pedigree. Even though that did not happen for the smaller reference populations (PopO and PopR), the method of Boichard et al. (1997) failed to identify bottlenecks due to an abusive use of reproductive individuals in the whole pedigree. This was confirmed by the parameter nf_e which would have a similar interpretation than f_a (Caballero and Toro 2000). While f_a is calculated using an approximate method that “creates” new ancestors via identifying bottlenecks in which genealogical paths converge, to further compute the marginal contribution of an ancestor (Boichard et al. 1997), parameter nf_e is computed directly on data in an exact way (Caballero and Toro 2000). The direct descendants of the founders of the pedigree were quickly included in the multiplier herd of SERIDA and its reproductive lifespan was prolonged as much as possible including crosses with their descendants of the first and second generations. For the whole pedigree, genealogical paths traced back to the base populations do not stop in the F1 individuals but still can be traced back to the founders to some extent (Table 3). Furthermore, parameter nf_e shows that the random losses of genes during the segregations, after the breeding programme was initiated, were minimized as much as possible.

Furthermore, comparison of estimates of $N_e F_i$ and $N_e C_{ij}$ can give insights for the conservation programme of the Gochu Asturcelta pig breed. Since $N_e F_i$ and $N_e C_{ij}$ should coincide under random mating, a ratio $(N_e - C_{ij}) / (N_e F_i)$ higher than 1 would inform of some degree of population subdivision (Cervantes et al. 2011a, b). Consistently with the negative value of F_{IS} , this ratio is particularly high for PopR (1.23). Probably, this is due to a relatively high genetic representation of the founder 9003 Fema 1 in PopR (Figure 3). The genetic background of the breed is basically formed by two families (L’Utiru \times La Preña and Machu \times Fema 2). However, the genetic variability explained by the founder 9003 Fema 1 as an

doi: 10.17221/8787-CJAS

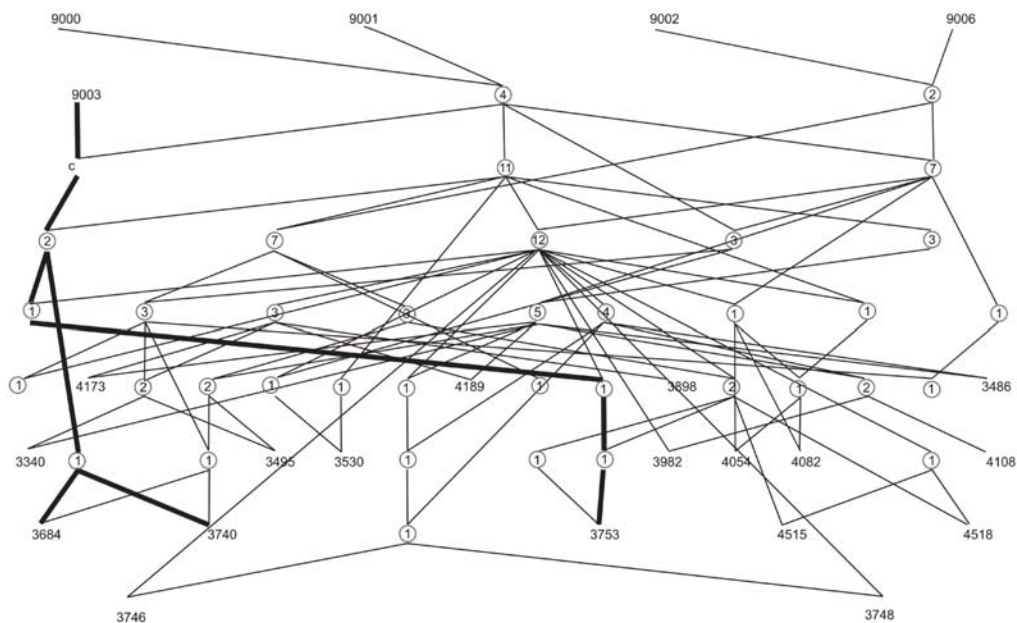


Figure 3. Summary of the pedigree of 18 individuals born in 2012 and 2013 and kept for reproduction used to form the reference population PopR (see Material and Methods section). ID of founders: 9000–9006, ID of PopR individuals: 3340–4518. Paths have been simplified as much as possible: circles in the nodes include the number of reproductive individuals in the pedigree which are descendants of the same cross. Paths involving founder 9003 are in thick lines

ancestor in the most recent reproductive population (PopR) is considerably higher than in the whole pedigree (1.48% vs 0.02%). When the genetic representation of some lines of founders vastly outweighs others in the present population of an endangered breed it has been suggested to unbalance the genetic contributions of specific individuals to equalize the genetic representation of the founders and lines in the population (Ballou and Lacy 1995). In the endangered Asturian livestock breeds parameter AR is routinely used to monitor pedigrees (Goyache et al. 2003; Royo et al. 2007; Alvarez et al. 2008). Descendants of under-represented founders are identified and offspring in the further few breeding seasons is unbalanced as much as possible towards those animals to maintain the initial genetic variability and to control average AR values in the new stock. In the Gochu Asturcelta pig breed, new individuals kept for reproduction, males if possible, must be intentionally selected from descendants of the founder 9003 Fema 1 to delay, to some extent, losses of genetic diversity.

CONCLUSION

The current analysis illustrates that strict mating policies can be useful to maintain genetic variability in extremely small livestock outbred populations. Even if some founder lines contribute only slightly to the population, the avoidance of population bottlenecks after the implementation of a recovery programme for a breed is possible. Furthermore, continuous monitoring of pedigrees has proved to be useful to evaluate the effects of the mating policy and to identify individuals with low genetic representation in the population to allow further balance of genetic representation of founders in the next generation.

REFERENCES

- Alvarez Sevilla A. (ed.) (2005): The Asturcelta Pig "Gochu'l País". Astur Paredes, Oviedo, Spain. (in Spanish)
- Alvarez I., Royo L.J., Gutierrez J.P., Fernandez I., Arranz J.J., Goyache F. (2008): Relationship between genealogical and microsatellite information characterising losses of genetic

- variability: empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. *Livestock Science*, 115, 80–88.
- Alvarez I., Royo L.J., Perez-Pardal L., Fernandez I., Payeras L., Goyache F. (2010): Assessing losses of genetic variability in the endangered Mallorquí horse. *Czech Journal of Animal Science*, 55, 456–462.
- Apario G. (ed.) (1944): *Zootechnics. Condensed Ethnology*. Imprenta Moderna, Córdoba, Spain. (in Spanish)
- Ballou J.D., Lacy R.C. (1995): Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In: Ballou J.D., Gilpin M., Foose T.J. (eds): *Population Management for Survival and Recovery: Analytical Methods and Strategies in Small Population Management*. Columbia University Press, New York, USA, 76–111.
- Boichard D., Maignel L., Verrier E. (1997): The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genetics Selection Evolution*, 29, 5–23.
- Caballero A., Toro M.A. (2000): Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetics Research*, 75, 331–343.
- Caballero A., Toro M.A. (2002): Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 3, 289–299.
- Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutierrez J.P. (2008): Application of individual increase in inbreeding to estimate realised effective sizes from real pedigrees. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125, 301–310.
- Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutierrez J.P. (2011a): Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128, 56–63.
- Cervantes I., Pastor J.M., Gutierrez J.P., Goyache F., Molina A. (2011b): Computing effective population size from molecular data: the case of three rare Spanish ruminant populations. *Livestock Science*, 138, 202–206.
- Goyache F., Gutierrez J.P., Fernandez I., Gomez J., Alvarez I., Diez J., Royo L.J. (2003): Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered population: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 95–103.
- Gutierrez J.P., Goyache F. (2005): A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122, 172–176.
- Gutierrez J.P., Altarriba J., Diaz C., Quintanilla R., Canon J., Piedrafita J. (2003): Genetic analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35, 43–64.
- Gutierrez J.P., Marmi J., Goyache F., Jordana J. (2005): Pedigree information reveals moderate to high levels of inbreeding and a population genetic structure in the Catalanian donkey breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122, 378–386.
- Gutierrez J.P., Cervantes I., Molina A., Valera M., Goyache F. (2008): Individual increase in inbreeding allows estimating realised effective sizes from pedigrees. *Genetics Selection Evolution*, 40, 359–378.
- Gutierrez J.P., Cervantes I., Goyache F. (2009): Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126, 327–332.
- James J. (1972): Computation of genetic contributions from pedigrees. *Theoretical and Applied Genetics*, 42, 272–273.
- Lacy R.C. (1989): Analysis of founder representation in pedigrees: founder equivalent and founder genome equivalents. *Zoo Biology*, 8, 111–123.
- Leroy G., Mary-Huard T., Verrier E., Danvy S., Charvolin E., Danchin-Burge C. (2013): Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse. *Genetics Selection Evolution*, 45: 1.
- Maignel L., Boichard D., Verrier E. (1996): Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bulletin*, 14, 49–54.
- Malecot G. (ed) (1948): *The Mathematics of Heredity*. Masson et Cie, Paris, France. (in French)
- Melka M.G., Schenkel F. (2010): Analysis of genetic diversity in four Canadian swine breeds using pedigree data. *Canadian Journal of Animal Science*, 90, 331–340.
- Menendez J., Alvarez I., Fernandez I., de la Roza B., Goyache F. (2015): Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed. *Archives of Animal Breeding*, 58, 217–220.
- Pjontek J., Kadlecik O., Kasarda R., Horny M. (2012): Pedigree analysis in four Slovak endangered horse breeds. *Czech Journal of Animal Science*, 57, 54–64.
- Royo L.J., Alvarez I., Gutierrez J.P., Fernandez I., Goyache F. (2007): Genetic variability in the endangered Asturcón pony assessed using genealogical and molecular information. *Livestock Science*, 107, 162–169.
- Silio L., Rodriguez J. (2013): A unique experience: the Iberian pig herd 'El Encinar Dehesón' (1944–2012). In: Proc. AIDA's XV Conference on Animal Production, Zaragoza, Spain, 3–16. (in Spanish)
- Tang G.Q., Xue J., Lian M.J., Yang R.F., Liu T.F., Zeng Z.Y., Jiang A.A., Jiang Y.Z., Zhu L., Bai L., Wang Z., Li X.W. (2013): Inbreeding and genetic diversity in three imported swine breeds in China using pedigree data. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 26, 755–765.

doi: 10.17221/8787-CJAS

Toro M.A., Rodriganez J., Silio L., Rodriguez C. (2000): Genealogical analysis of a closed herd of black hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, 14, 1843–1851.

Welsh C.S., Stewart T.S., Schwab C., Blackburn H.D. (2010): Pedigree analysis of 5 swine breeds in the United States and the implications for genetic conservation. *Journal of Animal Science*, 88, 1610–1618.

Wright S. (1969): *Evolution and the Genetics of Populations: The Theory of Gene Frequencies*. Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, USA.

Received: 2015–08–04

Accepted after corrections: 2015–10–16

Corresponding Author

Félix Goyache, DVM, Ph.D., SERIDA-Deva, Camino de Rioseco 1225, 33394 Gijón (Asturias), Spain
Phone: +34 984 502 010, e-mail: fgoyache@serida.org

5. Genetic characterization of the endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: insights for the composition of the Iberian native pig stock



Short communication

Genetic characterisation of the endangered *Gochu Asturcelta* pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: Insights for the composition of the Iberian native pig stock



Juan Menéndez^a, Félix Goyache^b, Albano Beja-Pereira^c, Iván Fernández^b,
Nuria A. Menéndez-Arias^b, Raquel Godinho^c, Isabel Álvarez^{b,*}

^a ACGA, C/Párroco José Fernández Teral n° 5 A, 33403 Avilés, Spain

^b Área de Genética y Reproducción Animal, SERIDA-Deva, Camino de Rioseco 12225, 33394 Gijón, Asturias, Spain

^c CIBIO, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão (VCD), Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2015

Received in revised form

27 January 2016

Accepted 20 March 2016

Keywords:

Gochu Asturcelta

Iberian peninsula

Microsatellites

mtDNA control region

Genetic variability

Conservation

ABSTRACT

The extremely endangered Gochu Asturcelta pig breed was analysed to document its genetic background and to ascertain if the traditional classification of native pig of the Iberian Peninsula into the Celtic-Iberian and the Iberian groups has genetic support. Two populations of Gochu Asturcelta pig (initial and present, including 31 and 124 individuals, respectively) were typed for 17 microsatellites together with 137 individuals of four domestic pig populations (eight breeds) and Wild Boar. Gochu Asturcelta populations showed a noticeable genetic distance with the other populations analysed due to the extreme bottleneck suffered by the breed. In any case, differentiation between the two Gochu Asturcelta populations analysed was very low ($F_{ST}=0.021 \pm 0.005$). Moreover, the two Gochu Asturcelta populations took basically the same values (1.14 and 1.13, respectively) for parameter N_g (founder genome equivalents) suggesting that the Gochu Asturcelta breed has not suffered additional genetic losses of genetic variability due to drift after the implementation of the breeding scheme. A total of 174 mtDNA control region fragments (647 bp) were analysed allowing the identification of 30 different haplotypes. Gochu Asturcelta had only three different haplotypes. The most frequent haplotypes H3 (18% of the samples; assigned to Larson et al.'s haplogroup A) and H5 (25% of the samples; assigned to Larson et al.'s haplogroup C) could be identified in all the Celtic-Iberian, Iberian and Cosmopolitan pig breeds analysed. This makes difficult to ensure that the classical hypothesis explaining different origins for the native pig strains of the Iberian Peninsula has genetic support. Projection of the mitochondrial DNA genetic variability (summarised via Principal Component Analysis) on geographical maps informed that the mtDNA composition of domestic pig native of the Iberian Peninsula depicts the recent rather than the ancient history of the analysed populations.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Gochu Asturcelta is an extremely endangered pig breed native of Asturias (Northern Spain) included in the Spanish Catalogue of livestock breeds (Regulation APA/53/2007). After the 1950s, the breed suffered a dramatic decline of population size and became nearly extinct at the end of the 20th century. In 2002, a recovery program started using with six founders (Menéndez et al., 2015, 2016) showing accordance with the "Celtic" ancient type of the breed (Aparicio, 1944). The breeders association, ACGA, gave strict guidelines to farmers to avoid matings between close relatives as

much as possible (Menéndez et al., 2016).

The breed is morphologically related to other "Celtic" North-western Iberian Peninsula pig populations, such as the Galician-Celtic (*Porco Celta*) or the Portuguese Bísara breeds. Celtic pigs of the Iberian Peninsula show large differences with the "Iberian" pig strains (namely the Spanish Iberian and the Portuguese Alentejano pig breeds). These two pig groups are assumed to have different genetic origins (Aparicio, 1944; Sotillo and Serrano, 1985): the Celtic pigs of the Iberian Peninsula (referred as Celtic-Iberian throughout the manuscript) would have a common origin with Northern-Central European pig breeds while the Iberian pig breeds are assumed to be the pre-extant pigs in the Iberian Peninsula.

Characterisation of the genetic features of unique livestock breeds is a major issue in conservation genetics (Jordana et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: ialvarez@serida.org (I. Álvarez).

2010). The aim of this study is to document the main genetic characteristics of the extremely endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial (mt)DNA information. To deal with this task we will compare the genetic variability of: a) the initial population used for reproduction in the recovery programme of the breed; b) that of the present population of the Gochu Asturcelta breed; and c) that of a representative sample of Iberian pig strains, cosmopolitan European pig and Spanish Wild Boar. An additional aim of the current research is to document the genetic background of the Celtic-Iberian pig. Although pig studies worldwide have been carried out using mtDNA, Celtic-Iberian pig have not been analysed so far (Larson et al., 2005; Ramírez et al., 2009; Herrero-Medrano et al., 2014).

2. Material and methods

Tissue samples of Gochu Asturcelta individuals were provided by the breeders association (ACGA). Samples included: a) 31 individuals born before 2005 (including 3 founders) with wide reproduction career in the multiplier herd of the breed founded in 2005 (Menéndez et al., 2016); and b) 124 individuals born in 2009 belonging to 43 different litters and registered in the herdbook. The former individuals were considered the “initial” Gochu Asturcelta (GA) population while the latter individuals were considered the “present” Gochu Asturcelta population (GA₂₀₀₉). Genealogical analyses performed by Menéndez et al. (2016) informed that average inbreeding in the GA₂₀₀₉ population was very high (0.222) with genetic representation of only four founders. In this unusual scenario all available individuals were typed to gather the “real” allelic frequencies in the present GA population.

Additionally, blood or tissue samples were obtained from 9 Galician-Celtic, 14 Bísara, 20 Alentejano, 12 Iberian, 25 Hampshire, 13 Landrace, 23 Large White and 21 Wild Boar individuals. Wild Boar samples were obtained in different provinces of North-western Spain. Total DNA was isolated from samples following standard procedures (Sambrook et al., 1989). Samples were grouped as follows: Spanish Galician-Celtic and Portuguese Bísara samples were grouped into a Celtic-Iberian population (23); Spanish Iberian and Portuguese Alentejano samples were grouped into the Iberian population (32); and Hampshire, Landrace and Large White samples were grouped into the Cosmopolitan (61) pig population.

A set of 17 microsatellites were typed in all individuals (see Table S1 for description of primer sequences and laboratory procedures). Using the program MolKin 3.1 (Gutiérrez et al., 2005; http://www.ucm.es/info/prodanim/html/JP_Web.htm) the following parameters were computed: observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), Wright's F-statistics, and raw (A) and rarefacted ($A_{(n)}$) average number of alleles per locus. Further, between-populations F_{ST} and Shared-Allele distance (D_{AS}) matrices were computed. To avoid bias due to low and unequal sample sizes, molecular coancestry and related parameters were adjusted for sampling size following Cervantes et al. (2011) fitting sample size to 30 individuals per population. Statistical significance of the computed parameters was assessed by bootstrapping using 1000 samples.

D_{AS} matrix was also computed at the between-individuals level and its information summarised by conducting principal component analyses (PCA) on this matrix using Proc FACTOR of SAS/STAT (SAS Institute, Cary, NC, USA). The eigenvectors computed for each individual and the two first factors retained were used to illustrate the among-individuals relationships via constructing contour plots with 75% confidence region of dispersion per population using the library ggplot2 of R (<http://CRAN.R-project.org/>).

The program STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) was run,

under the admixture model, considering correlated allele frequencies, to ascertain cryptic genetic structure in the analysed dataset. The most likely K-value in the data set was identified according to Evanno et al. (2005) using the STRUCTURE HARVESTER v.0.6.8 website (Earl and vonHoldt, 2012). K was set to vary between 1 and 10, and 10 simulations with different starting points for each K-value. All runs used burn-in periods of 100,000 iterations and data collection periods of 1,000,000 iterations.

The mtDNA control region of the initial Gochu Asturcelta, Galician-Celtic, Bísara, Alentejano, Iberian and Wild Boar samples described above, together with 12 Landrace and 3 Large White samples was sequenced (see Table S2 for description of primer sequences and laboratory procedures). Sequences (647 bp) were aligned using the program MEGA 6 (Tamura et al., 2013) using a reference sequence (GenBank accession no. AJ002189). Up to 44 sequences (7 Duroc, 26 Iberian, 2 Landrace, 2 Large White and 7 Wild Boar) previously reported by Alves et al. (2003) were also used. Altogether, 174 samples were analysed. The sequences were assigned to the pig mtDNA clusters identified by Larson et al. (2005). Haplotypes identified in the current study were archived at ENA (European Nucleotide Archive) with accession nos. LN885335-LN885364.

Parameters describing mtDNA diversity we calculated at the breed level and for whole population using the program DnaSP v5.1 (Librado and Rozas, 2009). Median-joining networks were constructed using the program Network 4.1.1.2 (Bandelt et al., 1999). Principal Component Analysis was performed, using the Proc FACTOR of SAS/STAT (SAS Institute, Cary, NC, USA) on the haplotypic frequencies of the Iberian pig breeds analysed (Alentejano, Bísara, Gochu Asturcelta, Galician and Iberian) according to the recommendations by Cavalli-Sforza et al. (1994). Eigenvalues obtained for each breed were used to construct interpolation maps drawn using the Inverse Distance Weighted (IDW) option of the Spatial Analyst Extension of the program ArcView. Interpolation surfaces were divided into six equal classes.

3. Results

Parameters characterizing the microsatellite diversity in the available dataset are given in Table 1. F-statistics for the whole population were the following: $F_{IS}=0.082 \pm 0.016$; $F_{ST}=0.162 \pm 0.007$; and $F_{IT}=0.230 \pm 0.014$. The Wild Boar population was the more diverse for both expected heterozygosity (0.717 ± 0.031) and rarefacted number of allele per locus (4.2) while the lowest values for these parameters were found in the two Gochu Asturcelta populations analysed. Differentiation between the two Gochu Asturcelta populations is very low ($F_{ST}=0.021 \pm 0.005$). The higher differentiation values for either F_{ST} or D_{AS} were found for the pairs including the Iberian pig population and, to a lower extent, the Wild Boar.

The between-individuals D_{AS} matrix was summarised via PCA (Fig. 1). Two factors explaining 45.05% of the variability allowed to separate the two (intermingled) populations of Gochu Asturcelta from the Iberian and Celtic-Iberian pig individuals. The wide dispersion area of the Wild Boar individuals reflected high within-population variability; the Cosmopolitan pig individuals were spread in a central location within Fig. 1.

The STRUCTURE analysis allowed to identify the existence of eight genetic Clusters (Table 1; Fig S1) reflecting a cryptic genetic structure in the analysed populations. This was particularly true for the Cosmopolitan pig and Wild Boar individuals that formed two different Clusters per population. Furthermore, although most GA individuals were included into Cluster C7 a significant proportion of GA₂₀₀₉ individuals grouped into Cluster C2. In turn, Iberian (C8) and Celtic-Iberian (C6) individuals were grouped into

Table 1 Within-strain observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), F_{IS} and raw (A) and rarefacted (to 10 copies) computed within-population and for the whole analysed dataset. Additionally, the between-populations F_{ST} (below diagonal) and Shared-Allele distance (above diagonal) distance matrices are given. Standard errors of the estimates are in brackets. Furthermore, proportion of membership of each of the eight clusters inferred in the most likely run using the STRUCTURE program. Proportions of membership higher than 0.1 are in bold (see Supplementary Fig S1).

Population	N	Parameter		Population								Inferred clusters								
		H_o	H_e	F_{IS}	A	$A_{(10)}$	1	2	3	4	5	6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1. Iberian	32	0.565	0.586 (0.016)	0.077 (0.042)	5.1	3.5	0.466 (0.025)	0.477 (0.021)	0.297 (0.025)	0.407 (0.022)	0.320 (0.041)	0.005	0.006	0.072	0.010	0.002	0.020	0.005	0.881	
2. CA ^a	31	0.541	0.560 (0.025)	-0.024 (0.047)	4.5	3.1	0.153 (0.014)	0.066 (0.015)	0.387 (0.025)	0.325 (0.023)	0.484 (0.038)	0.012	0.076	0.035	0.004	0.002	0.027	0.836	0.008	
3. CA ₂₀₀₉ ^b	124	0.515	0.556 (0.014)	0.011 (0.037)	3.6	2.9	0.152 (0.009)	0.021 (0.005)	0.392 (0.022)	0.333 (0.021)	0.518 (0.031)	0.003	0.256	0.003	0.005	0.001	0.002	0.727	0.003	
4. Celtic-Iberian	23	0.586	0.639 (0.013)	0.031 (0.034)	4.8	3.4	0.080 (0.009)	0.120 (0.012)	0.118 (0.008)	0.296 (0.028)	0.372 (0.047)	0.034	0.006	0.020	0.005	0.002	0.902	0.004	0.027	
5. Cosmopolitan	61	0.615	0.651 (0.014)	0.092 (0.031)	6.4	3.9	0.114 (0.009)	0.096 (0.011)	0.095 (0.008)	0.079 (0.009)	0.432 (0.032)	0.607	0.012	0.004	0.345	0.001	0.013	0.008	0.010	
6. Wild Boar	21	0.533	0.717 (0.031)	0.262 (0.038)	6.5	4.2	0.081 (0.011)	0.127 (0.013)	0.132 (0.009)	0.082 (0.011)	0.095 (0.007)	0.005	0.003	0.656	0.004	0.237	0.022	0.003	0.070	
Total	292	0.551	0.609 (0.008)	0.082 (0.016)	10.5	4.1														

^a Main breeding individuals on the initial period of the recovery programme of the Gochu Asturcelta pig breed.

^b Gochu Asturcelta individuals born in 2009 and registered in the herdbook.

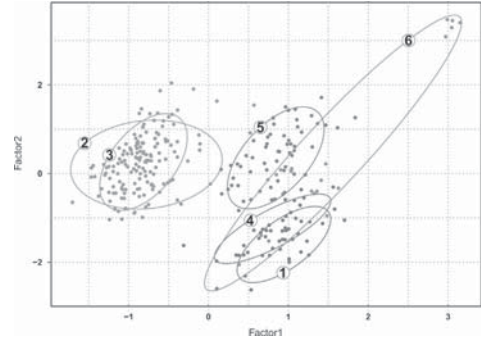


Fig. 1. Contour plots showing the 75% confidence region, per population, of the genetic relationships among the analysed individuals summarised computing Principal Component Analysis on the between-individuals Shared Allele distance matrix: Factor 1, on the X-axis explained 26.25% of the total variance while Factor 2, on the Y-axis explained 18.80% of the total variance. Numbers on contours mean the following: 1: individuals belonging to the Iberian population (Alentejano and Iberian breeds); 2: initial breeding individuals of the Gochu Asturcelta pig breed; 3: Gochu Asturcelta individuals born in 2009; 4: individuals belonging to other Celtic-Iberian populations (Bisara and Galician-Celtic breeds); 5: Cosmopolitan pig individuals (Hampshire, Landrace and Large White individuals); 6: Wild Boar.

their own Clusters.

A description of the identified mtDNA haplotypes, their distribution across breeds and parameters characterizing within-breed genetic diversity at the mtDNA level are given in Supplementary Table S2. The 174 mtDNA sequences gave 30 haplotypes. Four haplotypes of Asian origin (H19, H21, H22 and H24) were identified in 7 Cosmopolitan pig sequences (Table 2; Fig. 2A) previously deposited in GenBank by Alves et al. (2003). Considering only native Iberian Peninsula samples, Wild Boar had the higher haplotype and nucleotide diversity values (0.854 and 0.00329, respectively) and Gochu Asturcelta the lowest (0.443 and 0.00071, respectively). Only three mtDNA haplotypes were identified in Gochu Asturcelta; one of them (H12) was only present in a male founder while two out of three founder matriline shared the same mtDNA haplotype (Hap3). Taking this into account, a total concordance between mtDNA haplotype and genealogical matriline was found in the sequenced sample. The Bisara breed had significant nucleotide diversity.

Median-joining network was constructed using European pig haplotypes only (Fig. 2B), illustrating the high genetic homogeneity of the sequence set analysed. The most frequent haplotype (H5; 25% of the samples) was identified in all the analysed populations except for Wild Boar while the other two more frequent haplotypes, H3 (18%) and H4 (14%), could be identified in breeds belonging to all the pig strains analysed (Iberian, Celtic-Iberian and Cosmopolitan) and Wild Boar.

Haplotype diversity identified in the five native pig breeds of the Iberian Peninsula analysed was summarised via PCA (Supplementary Table S1) and projected on a geographic map. Factor 1 (explaining 40.02% of the variability; Plot 2C) allowed to identify a “Portuguese” diversity while Factor 2 (27.05% of the variability; Plot 2D) separated the variability identified in Gochu Asturcelta and Galician-Celtic pig breeds and that of the other three breeds.

4. Discussion

Even though native pig belonging to the “Celtic-Iberian” group of the Iberian Peninsula were majority in Spain and Portugal until the 1950s (Aparicio, 1944; Santos e Silva et al., 2007) the Celtic-Iberian pig breeds became nearly extinct at the end of the 20th

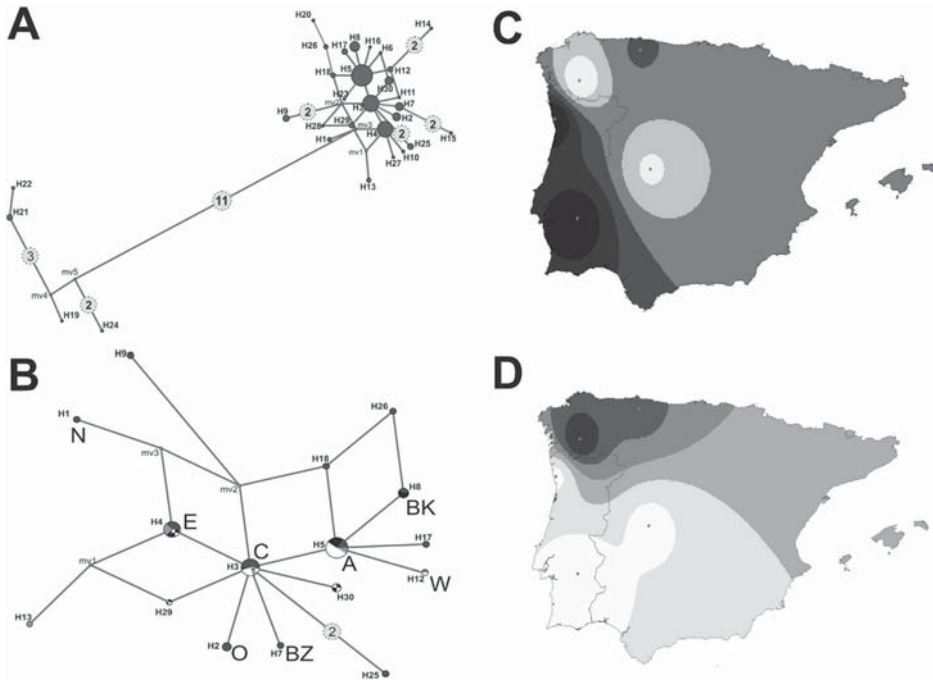


Fig. 2. Median-joining trees constructed with the mtDNA haplotypes described in Table S2. Haplotype H1 corresponds to the reference sequence AJ002189. The higher the frequency of each haplotype the higher the area of the circle. Numbers within circles inform on the number of mutations (higher than 1) separating haplotypes. Plot A illustrates the whole sequence set used. Plot B was constructed via removing Asian haplotypes (H19, H21, H22 and H24) and setting the criterion “> 1” (except for H1) in the program NETWORK to avoid excessive reticulations. Capital letters near circles in Plot B identify the haploclusters reported by Larson et al. (2005) for European pigs. Colours within the circles in Plot B represent the proportion of Gochu Asturcelta (white), Cosmopolitan (black), Iberian (dark grey), Celtic-Iberian (light grey) and Wild Boar (dotted) samples. Abbreviations “mv” indicate missing haplotypes. Additionally, synthetic maps illustrating geographical variation of the first (Plot C) and second principal component (Plot D) identified using principal component analysis on the mtDNA haplotypic frequencies identified in five Iberian Peninsula native pig breeds (see Supplementary Tables S2 and S3). Colours should be interpreted as differences between eigenvalues; the darker the higher eigenvalues. Points illustrate the geographical coordinates in which the breeds are considered to have been sampled. The IDW option of the Spatial Analyst Extension of the program ArcView was fitted to a power of two assuming that each input point has a local influence that diminishes with distance.

century. A recovery program for the Portuguese Bísara breed started in 1997, using roughly 200 breeding individuals, and conservation of the Galician-Celtic pig breed started since 1999 using a few remnant Galician and Bísara individuals (Santos e Silva et al., 2007). In 2002, a conservation programme for the Gochu Asturcelta was initiated using six founders (Menéndez et al., 2015, 2016). Due to the extreme risk of the Gochu Asturcelta and the other Celtic-Iberian pig breeds, data is urgently needed to document their main genetic characteristics.

Results obtained using neutral nuclear loci clearly reflect the population bottleneck suffered by the Gochu Asturcelta pig breed. Major diversity parameters (H_e and $A_{(10)}$; Table 1) took the lowest values for the two Gochu Asturcelta populations analysed. The recent populations bottlenecks suffered by the other Celtic-Iberian pig breeds (Santos e Silva et al., 2007), are not reflected in our results due to the fact that individuals coming from different breeds have merged into a given strain therefore balancing their allelic frequencies and increasing the differences with Gochu Asturcelta (Fig. 1).

The population including the breeding individuals used on the initial period of the recovery program of the Gochu Asturcelta pig breed (GA) had negative F_{IS} values (-0.024). This is likely due to the mating of founder individuals that probably suffered particular bottlenecks and fixed different alleles at a given loci. In such scenario, heterozygous excess is likely to occur in the first few generations after the start of the breeding program (Álvarez et al.,

2008). This scenario disappeared when the genealogical structure of the population became steady (GA_{2009}). In any case, average molecular coancestry ($f=1-H_e$) of both the GA and the GA_{2009} populations (after correction for sample; Cervantes et al., 2011) was basically the same (Table 1), therefore suggesting that the allelic frequencies of the breed kept balanced across years. Founder genome equivalents ($N_g=1/2f$; Caballero and Toro, 2002) computed to characterise genetic losses due to drift took very similar values (1.14 and 1.13 for the GA and GA_{2009} populations, respectively) suggesting that the Gochu Asturcelta population, respectively) suggesting that the Gochu Asturcelta breed has not suffered additional genetic losses due to drift after the implementation of the mating program. In this respect, Menéndez et al. (2016) reported that the mating policy avoiding crosses between close relatives implemented by the breeders association (ACGA) has been successful, as much as possible, in preserving the genetic background of the founders across years and generations. In contrast with other small livestock populations subjected to unexpected selection processes (Álvarez et al., 2008), it has been previously shown that such mating policies contribute to keep allelic frequencies steady across years and generations whilst genealogical kinship increases (Royo et al., 2007).

Furthermore, the high genetic identity of the Gochu Asturcelta individuals biased the scenario depicted by genetic distances: while the Gochu Asturcelta populations are clearly differentiated from the other pig populations, Fig. 1 suggests a virtually non-existent differentiation among Celtic-Iberian, Iberian and

Cosmopolitan pig and Wild Boar. Removal of the Gochu Asturcelta individuals allowed to identify a genetic scenario, closer to expectations, including two groups of populations (Supplementary Fig S1): a) the one including the Bísara and Galician-Celtic breeds and the Cosmopolitan pig individuals; and b) that including the Alentejano and the Iberian breeds together with most Wild Boar individuals.

This overall scenario was confirmed via STRUCTURE analysis. It is well known that the program may experience difficulties to cluster individuals into "original" populations when the present populations are not well differentiated (as in the case of GA populations) or are formed by different proportions of individuals of various origins as clearly happened in the case of Cosmopolitan and Wild Boar individuals (Pritchard et al., 2000). The GA and the Celtic-Iberian individuals grouped into different clusters and, furthermore, the GA₂₀₀₉ population tended to split into two different clusters probably due to the family structure of the present Gochu Asturcelta population (Menéndez et al., 2016).

The ascertainment of the mtDNA composition of the Spanish and Portuguese pig breeds can be used to check whether the traditional classification of the native pigs of the Iberian Peninsula into Celtic-Iberian or Iberian strains (Aparicio 1944; Sotillo and Serrano, 1985) has a genetic support. This can only be done via comparing the mtDNA composition of the domestic pig with that of the local Wild Boar which expected to influence modern domestic pigs in Europe as a consequence of multiple local domestication processes (Larson et al., 2005). Larson et al. (2005) identified two, closely related, core mtDNA lineages in European pig: haplogroups A (coinciding with haplotype H5) and C (including haplotype H3). While all the Wild Boar samples were included in cluster C or C-related clusters (namely haplotype H4 included in the Larson et al.'s haplogroup E; see Fig. 2B), most mtDNA sequences identified in Cosmopolitan and Celtic-Iberian pig in the current study are linked to the A superfamily of haplotypes. In turn, haplotypes identified in the Iberian strain pig breeds and Wild Boar were mainly distributed in the C superfamily (Larson et al., 2005). Assuming that the mtDNA composition of the Wild Boar population analysed mirrors the ancestral mtDNA composition of the domestic pig in the Iberian Peninsula, two classical hypothesis could be considered (Aparicio 1944; Sotillo and Serrano, 1985): a) Iberian pig breeds are the "true" native pigs of the Iberian Peninsula resulting from a particular domestication event; and b) Celtic-Iberian pigs have a common origin to the Cosmopolitan Northern-Central European pigs, being their presence in Northwestern Iberia due to a process of migration with population replacement.

The presence of A-related haplotypes (namely H3) in the Alentejano, Iberian and Wild Boar samples and C-related haplotypes (namely H5) in all the Celtic-Iberian and Cosmopolitan pig breeds makes difficult to ensure that the hypotheses listed above have genetic support. The presence of A-related mtDNA haplotypes in Iberian pig can be partially explained by unsupervised crosses with European pig, namely Duroc, during the second half of the 20th century leading to improve the productive performance of the Iberian pig breeds (Alves et al., 2003). Furthermore, inappropriate management practices may have facilitated the introgression of European pig, probably carrying A-related haplotypes, into Wild Boar populations in areas of Southern Spain (van Asch et al., 2012) and in the Pyrenees.

Furthermore, geographic projection of the mtDNA variability identified (Fig. 2C,D) suggests that the present mtDNA composition of native domestic pig of the Iberian Peninsula depicts the recent rather than the ancient history of the analysed populations. No matter their common origin, Fig. 2C differentiates Portuguese and Spanish pig breeds suggesting overall management differences. Furthermore, Fig. 2D allows to differentiate those pig breeds

(Gochu Asturcelta and Galician-Celtic) that have recently suffered the most dramatic and recent bottleneck.

5. Conclusion

The overall information provided will contribute to document the main genetic features of the Celtic-Iberian pig and to support conservation strategies for their breeds. Since they represent significant historical, ecological and reproductive adaptive variation with respect the other Iberian strain of pigs or cosmopolitan pigs, the joint implementation of conservation strategies for the remnant Celtic-Iberian pig breeds native of the Iberian Peninsula has been proposed (Santos e Silva et al., 2007). However, both mtDNA and microsatellite markers suggest that original genetic stocks may have changed in recent historical terms due to a significant gene flow among neighbour pig populations and very recent population bottlenecks. Therefore, a deeper understanding of the Celtic-Iberian pig breeds is necessary before the implementation transboundary conservation strategies in such populations. Furthermore, the current study clearly illustrates how genetic distances should be carefully interpreted when no available information on the history of the populations exist (Toro, 2002).

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

This work was partially funded by a specific contract between Government of Principado de Asturias and Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA; <http://www.gochuasturcelta.org/>). IA, IF and FG are supported by grant FICYT GRUPIN14-113.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.03.013>.

References

- Álvarez, I., Royo, L.J., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Arranz, J.J., Goyache, F., 2008. Relationship between genealogical and microsatellite information characterising losses of genetic variability: empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. *Livest. Sci.* 115, 80–88.
- Alves, E., Óvilo, C., Rodríguez, M.C., Silió, L., 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Anim. Genet.* 34, 319–324.
- Aparicio, G., 1944. *Zootecnia Especial. Etnología compendiada*, 3ª edición. Imprenta Moderna, Córdoba, Spain.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for ferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Caballero, A., Toro, M.A., 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3, 289–299.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A., 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Cervantes, I., Pastor, J.M., Gutiérrez, J.P., Goyache, F., Molina, A., 2011. Effective population size as a measure of risk status in rare breeds: The case of three Spanish ruminant breeds. *Livest. Sci.* 138, 202–206.
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Res.* 4, 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Gutiérrez, J.P., Royo, L.J., Álvarez, I., Goyache, F., 2005. MolKin v2.0, a computer

- program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *J. Hered.* 96, 718–721.
- Herrero-Medrano, J.M., Megens, H.-J., Groenen, M.A.M., Bosse, M., Pérez-Enciso, M., Crooijmans, R.P.M.A., 2014. Whole-genome sequence analysis reveals differences in population management and selection of European low-input pig breeds. *BMC Genom.* 15 (1), 601. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-601>.
- Jordana, J., Marmi, J., Avellanet, R., Aranguren-Méndez, J.A., Ferrando, A., Goyache, F., 2010. Molecular, genealogical and morphometric characterisation of the Pallaresa, a Pyrenean relic cattle breed: insights for conservation. *Livest. Sci.* 132, 65–72.
- 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* 11, 1618–1621.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., de la Roza, B., Goyache, F., 2015. Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings: a case study in the endangered gochu asturcelta pig breed. *Arch. Anim. Breed.* 58, 217–220.
- Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., Goyache, F., 2016. Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation. *Czech J. Anim. Sci.*, 3 (in press).
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Ramírez, O., Ojeda, A., Tomás, A., Gallardo, D., Huang, L.S., Folch, J.M., Clop, A., Sánchez, A., Badaoui, B., Hanotte, O., Galman-Omitogun, O., Makuza, S.M., Soto, H., Cadillo, J., Kelly, L., Cho, I.C., Yeghoyan, S., Pérez-Enciso, M., Amills, M., 2009. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Mol. Biol. Evol.* 26, 2061–2072.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Goyache, F., 2007. Genetic variability in the endangered Asturcón pony assessed using genealogical and molecular information. *Livest. Sci.* 107, 162–169.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Santos e Silva, J., Vicente, A., Alves, C., Fernandes, P., Carril, J.A., Álvarez-Sevilla, A., Fernández, I., Álvarez, I., Goyache, F., 2007. Dynamic and socio-economical valorisation of the local celtic pig breeds. In: Costa LN, editor, *Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig*. October 11–13, (Capo d'Orlando – Messina (Italy)). Alma Mater Digital Library of the University of Bologna). pp. 100–112.
- Sotillo, J.L., Serrano, V., 1985. *Producción Animal I. Etnología Zootécnica*. Ediciones Tebar-Flores, Madrid, Spain.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Toro, M.A., 2002. Genetic distances: a useful tool to be applied with caution. *J. Anim. Breed. Genet.* 125, 3–4.
- van Asch, B., Pereira, F., Santos, L.S., Carneiro, J., Santos, N., Amorim, A., 2012. Mitochondrial lineages reveal intense gene flow between Iberian wild boars and South Iberian pig breeds. *Anim. Genet.* 43, 35–41.

Supplementary Table S1.

Description of the 17 microsatellites used. Most microsatellites used were included in the ISAG-FAO panel (<http://www-igc.toulouse.inra.fr/pig/panel/panel2004.htm>). PCR was carried out in a GenAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) and genotyping was performed on an ABI 3130 DNA automated sequencer (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). PCR protocol consisted of a 10 µl reaction mix containing approximately 50 ng total (DNA QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, Hilden, Germany). PCR was carried out in a GenAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The PCR consisted by an initial denaturation (94°C, 5 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (55 °C, 60 s), and extension (72°C, 60 s) and a final extension at 72°C for 60 min. Primers were labelled using either FAM^a, NED^b, PET^c or VIC^d (Applied Biosystems).

Locus	Allele size range (bp)	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
SW936 ^a	80-117	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC	GTGCAAGTACACATGCAGGG
S0155 ^a	146-164	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG	AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT
S0225 ^a	168-194	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA
S0101 ^a	197-216	GAAGCCCAAAGAGACAACCTGC	GTCTCCCTCACACTTACCGCAG
S0090 ^a	240-254	CCAAGACTGCCTTGTTAGGTGAATA	GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG
SW240 ^b	92-114	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA
SW857 ^b	128-150	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	GATCCTCCTCAAATCCCAT
S0071 ^b	170-210	GACATGGAATCAGTTGCTCAA	CCAGAAGCAGGTTTTGAGATGA
IGF1 ^b	289-311	GCTTGGATGGACCATGTTG	CATATTTTTCTGCATAACTGAACCT
S0026 ^c	92-106	AACCTTCCCTTCCAATCAC	CACAGACTGCTTTTTACTCC
SW911 ^c	151-175	CTCAGTTCCTTGGGACTGAACC	CATCTGTGGAAAAAAAAAAGCC
S0226 ^c	181-205	GCACTTTTAACTTTCATGATACTCC	GGTTAAACTTTTNCCCAATACA
S0227 ^c	231-256	GATCCATTTATAATTTTAGCACAAAGT	GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC
SW951 ^d	121-129	TTTCAACTCTGGCACCAG	GATCGTGCCCAAATGGAC
SW632 ^d	158-178	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA	GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA
S0002 ^d	190-216	GAAGCCCAAAGAGACAACCTGC	GTTCTTTACCCACTGAGCCA
S0005 ^d	205-257	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	GCACCTCCTGATTCTGGGTA

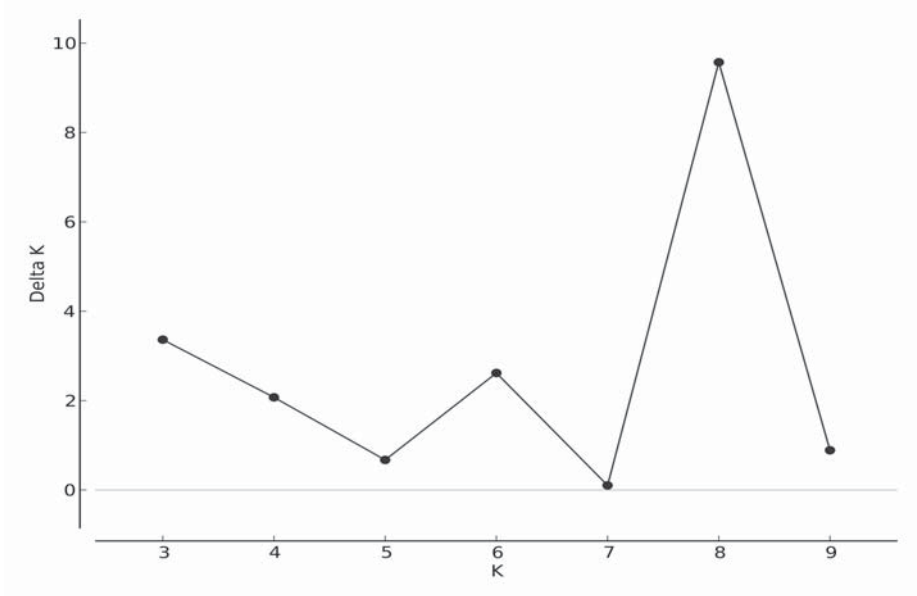
Supplementary Table S3.

Summary of the results obtained via computing Principal Component Analysis on the mtDNA haplotypic frequencies identified in five Iberian Peninsula native pig breeds. Two factors of eigenvalue > 1 were retained. The percentage of the variance explained by each factor is given together with the eigenvectors computed for each pig breed analysed. Longitude and Latitude of the nodes considered the centres of the analysed pig breeds are also given in decimal format.

	Factor 1	Factor 2	Longitude	Latitude
Eigenvalue	2.001	1.352		
Percentage	40.02	27.05		
breed				
Alentejano	0.86043	-0.00093	-7.906	38.563
Gochu Asturcelta	0.43613	0.68564	-5.778	43.249
Bísara	0.90970	0.11553	-8.667	41.330
Galician-Celtic	-0.07935	0.92876	-7.835	42.401
Iberian	0.05491	0.09576	-5.424	39.938

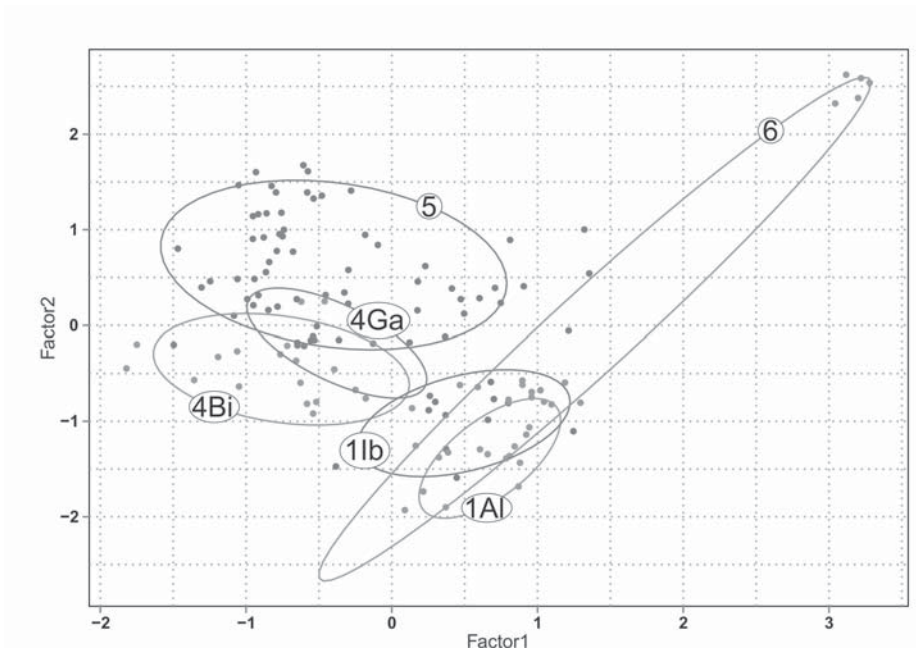
Supplementary Figure S1

Ascertainment of the most likely number of K using the method of Evanno et al. (2005) as implemented in the website STRUCTURE HARVESTER. ΔK was calculated, for the pig populations analysed, between $K = 1$ and $K = 10$ across 10 different runs per K as $\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$.



Supplementary Figure S2

Contour plots showing the 75% confidence region of the genetic relationships among the analysed individuals per population obtained computing Principal Component Analysis on the between-individuals Shared Allele distance matrix computed excluding the Gochu Asturcelta individuals: Factor 1, on the X-axis explained 29.45% of the total variance while Factor 2, on the Y-axis explained 19.90% of the total variance. Numbers on contours, which are consistent with those presented in Figure 1, mean the following: 1Ib: individuals belonging to the Iberian pig breed; 1AI: individuals belonging to the Alentejano pig breed; 4Bi: individuals belonging to the Bísara pig breed; 4Bi: individuals belonging to the Galician-Celtic pig breeds; 5: Cosmopolitan pig individuals (Hampshire, Landrace and Large White individuals); 6: Wild Boar.



6. Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered Gochu Asturcelta pig breed

Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered *Gochu Asturcelta* pig breed

Juan Menéndez¹, Isabel Álvarez², Iván Fernández², Nuria A. Menéndez-Arias² & Félix Goyache²

¹ACGA, C/Párroco José Fernández Teral nº 5 A, Avilés, Asturias 33403, Spain

²SERIDA-Deva, Camino de Rioseco 1225, Gijón, Asturias 33394, Spain

Keywords

Coancestry, effective population size, linkage disequilibrium, pedigree, single sample, temporal sampling.

Correspondence

Félix Goyache, Área de Genética y Reproducción Animal, SERIDA-Deva, Camino de Rioseco, 1225, E-33394-Gijón, Asturias, Spain.
Tel: +34 984502010;
Fax: +34 984502012;
E-mail: fgoyache@serida.org

Funding Information

This work was partially funded by a specific contract between Government of Principado de Asturias and Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA; <http://www.gochuasturcelta.org/>). IA, IF, and FG are supported by grant FICYT GRUPIN14-113.

Received: 30 March 2016; Revised: 11 May 2016; Accepted: 16 May 2016

Ecology and Evolution 2016; 6(14): 4971–4980

doi: 10.1002/ece3.2240

Introduction

There is an increasing interest in estimating effective population size (N_e) using linkage disequilibrium (LD) information. Although these methodologies have been used basically in natural populations (Waples 1991; Barker 2011), they are of interest in livestock populations with shallow pedigrees in which no sound estimates of effective population size can be obtained using genealogies (Cervantes et al. 2011b).

The advantages of using LD information are clear in terms of time and operational costs: a single sample can

Abstract

Estimating effective population size (N_e) using linkage disequilibrium (LD) information ($N_{e(LD)}$) has the operational advantage of using a single sample. However, $N_{e(LD)}$ estimates assume discrete generations and its performance are constrained by demographic issues. However, such concerns have received little empirical attention so far. The pedigree of the endangered Gochu Asturcelta pig breed includes individuals classified into discrete filial generations and individuals with generations overlap. Up to 780 individuals were typed with a set of 17 microsatellites. Performance of $N_{e(LD)}$ was compared with N_e estimates obtained using genealogical information, molecular coancestry ($N_{e(M)}$) and a temporal (two-sample) method ($N_{e(JR)}$). Molecular-based estimates of N_e exceeded those obtained using pedigree data. Estimates of $N_{e(LD)}$ for filial generations F3 and F4 (17.0 and 17.3, respectively) were lower and steadier than those obtained using yearly or biannual samplings. $N_{e(LD)}$ estimated for samples including generations overlap could only be compared with those obtained for the discrete filial generations when sampling span approached a generation interval and demographic correction for bias was applied. Single-sample $N_{e(M)}$ estimates were lower than their $N_{e(LD)}$ counterparts. $N_{e(M)}$ estimates are likely to partially reflect the number of founders rather than population size. In any case, estimates of LD and molecular coancestry tend to covary and, therefore, $N_{e(M)}$ and $N_{e(LD)}$ can hardly be considered independent. Demographically adjusted estimates of $N_{e(JR)}$ and $N_{e(LD)}$ took comparable values when: (1) the two samples used for the former were separated by one equivalent to discrete generations in the pedigree and (2) sampling span used for the latter approached a generation interval. Overall, the empirical evidence given in this study suggested that the advantage of using single-sample methods to obtain molecular-based estimates of N_e is not clear in operational terms. Estimates of N_e obtained using methods based in molecular information should be interpreted with caution.

provide estimates of, probably, the most important evolutionary parameter for a given population. However, computation of effective population size using linkage disequilibrium ($N_{e(LD)}$) has well-known causes of severe bias, namely sample size, markers set size, and minor allele frequency (England et al. 2006; Luikart et al. 2010; Waples and Do 2010).

In any case, the major operational constraint for the estimation of $N_{e(LD)}$ is that this approach assumes discrete generations and only fit well to semelparous age-structured species. In iteroparous species, such as livestock, in

which generations overlapping is the rule, $N_{e(LD)}$ values are more likely estimates of the effective number of breeders (N_b ; effective number of adult individuals that give rise to a cohort) rather than the effective size for a generation (Waples 2006; Barker 2011; Goyache et al. 2011). Although N_e and N_b are closely related, there are large differences between them among species and within populations (Waples et al. 2013, 2014). In such scenario, the analysis of livestock populations with known mating policy, demographic structure, and pedigrees can shed light on the performance of $N_{e(LD)}$ in natural iteroparous populations.

The demography of a population evolving under generations overlap is likely to affect molecular-based estimates of N_e . When temporal (two-sample) methods for computing N_e are applied, it is necessary to assume that samples are far from being independent and that “temporal” estimates of N_e must be adjusted using life-traits data (Jorde and Ryman 1995, 1996). A similar rationale has been recently applied to estimates of $N_{e(LD)}$ obtained using single-cohort samples. Waples et al. (2014) suggested to adjust estimates of $N_{e(LD)}$ for demographic bias using the ratio N_b/N_e . This ratio can be calculated accurately using two key life-history traits (Waples et al. 2011, 2013).

The demographic concerns described above are not usually addressed even in research carried out in livestock (Corbin et al. 2010, 2012; Flury et al. 2010; Goyache et al. 2011). The endangered Gochu Asturcelta pig breed (Menéndez et al. 2016a) offers a unique scenario to deal with this task. A recovery program for the breed started in 2002 using six founders (three boars and three sows). The reproductive career of the founders and their direct descendants was prolonged as much as possible, and strict breeding policies avoiding matings between close relatives were applied in the population (Menéndez et al. 2016a). This allowed to identify, across years, a number of individuals which could be classified into discrete filial generations: F₁ (direct descendants of two founders), discrete generation F₂ (F₁ × F₁ crosses), and so on till discrete generation F₅ (F₄ × F₄ crosses). This unique scenario allows to compare, in the same population, estimates of $N_{e(LD)}$ obtained when discrete generations are considered with those obtained using yearly or biannual cohort samplings. Further, the effect of the correction for demographic bias using parameters obtained via direct observation of the pedigree can also be assessed.

The current research will analyze both the information registered in the herdbook of the Gochu Asturcelta pig breed from 2006 to 2010 and the genotypes obtained for paternity testing. This will allow to assess the performance of $N_{e(LD)}$ in the following scenarios: (1) samples obtained from discrete filial generations; (2) samples obtained from

yearly cohorts; and (3) samples drawn from a number of yearly cohorts equaling to or exceeding generation length. The effect of demographic adjustment of estimates will be assessed as well. For descriptive purposes, performance will be compared with estimates of N_e obtained using single-sample molecular coancestry, temporal (two-sample) methods, and genealogical information.

Materials and Methods

Data available and sampling

Pedigree data recently analyzed by Menéndez et al. (2016a) were available. Data consisted of 3156 records (including six founders), from 515 litters, with father and mother known, registered in the herdbook of the breeders association (ACGA) from its foundation to August 2014. A total of 109 boars and 309 sows had offspring in data. Genealogies were traced to identify 11 F₁ individuals (offspring of two founders), 47 F₂ individuals (F₁ × F₁), 216 F₃ individuals (F₂ × F₂), 147 F₄ individuals (F₃ × F₃), and seven F₅ individuals (F₄ × F₄).

Table 1 gives a detailed description of the data used. Analyses were limited to the period in which F₃ and F₄ individuals were born (from 2006 to 2010). This ensured that sample size and pedigree depth (at least three equivalents to complete generations; Gutiérrez et al. 2009) were enough to obtain reliable results. Finally, pedigree analyses involved a total of 2248 individuals, born between 2006 and 2010, including 363 F₃ or F₄ individuals and 1885 individuals with different pedigree depths due to generations overlap.

A set of 17 microsatellites (IGF1, S0002, S0026, S0071, S0101, S0155, S0225, S0226, S0227, SW240, SW632, SW857, SW911, SW936, SW951, S0005, and S0090) used in paternity testing and diversity analyses (Menéndez et al. 2015, 2016b) were typed in a representative sample of the available individuals. Most microsatellites used were included in the ISAG–FAO panel (<http://www-igc.toulouse.inra.fr/pig/panel/panel2004.htm>). Primer sequences and Polymerase Chain Reaction (PCR) conditions can be found in Menéndez et al. (2016b). PCR was carried out in a GenAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) and genotyping was performed on an ABI 3130 DNA-automated sequencer (Applied Biosystems).

Genotypes of a total of 780 individuals were available. They included: (1) 324 of 363 (89%) F₃ or F₄ individuals and (2) 456 of 1885 (24%) individuals with generations overlap in their pedigree born between 2006 and 2010. Altogether, yearly samples available varied from 83 (74-typed) individuals born in 2006 to 724 (225-typed) individuals born in 2010 (see Table 1).

Table 1. Description of samples used per year of birth. The number of litters and individuals involved in computations are detailed according to pedigree knowledge: (a) those individuals included into discrete generations (F_3 or F_4) and (b) those having overlapped genealogies. Both the number of individuals registered in the herdbook (used for genealogical analyses) and the number of individuals typed (in brackets) are given.

Year of birth	Discrete generations				Overlapped generations		Totals	
	Litters	F_3	F_4	Subtotal	Litters	Individuals	Litters	Individuals
2006	6	39 (32)	0 (0)	39 (32)	5	44 (42)	11	83 (74)
2007	14	99 (98)	6 (6)	105 (104)	18	130 (32)	32	235 (136)
2008	21	50 (34)	109 (95)	159 (129)	51	404 (82)	72	563 (211)
2009	5	22 (21)	26 (26)	48 (47)	85	676 (178)	90	724 (225)
2010	3	6 (6)	6 (6)	12 (12)	79	631 (122)	82	643 (134)
Totals	49	216 (191)	147 (133)	363 (324)	238	1885 (456)	287	2248 (780)

According to the structure of data described above, analyses were sequentially carried out on: (1) discrete filial generations (F_3 and F_4); (2) yearly cohorts from 2006 to 2010; and (3) sequential biannual samplings mimicking the average generation interval of 1.8 ± 0.03 years reported for the Gochu Astucelca breed by Menéndez et al. (2016a). As mating policy avoids crosses between close relatives (Menéndez et al. 2016a), a model of random mating was assumed when necessary.

Genealogical estimates of effective population size

The equivalent to complete generations traced (t), computed as the sum of $(1/2)^n$, where n is the number of generations separating the individual to each known ancestor (Maignel et al. 1996), was calculated for each individual in the pedigree born in the five-year period 2006–2010.

Effective population sizes (N_e) and their standard errors were estimated on the basis of individual increase in inbreeding ΔF_i (Gutiérrez et al. 2008, 2009) and coancestry ΔC_{ij} (Cervantes et al. 2011a) considering $\Delta F_i = 1 - \sqrt[t_i]{1 - F_i}$ and $\Delta C_{ij} = 1 - \sqrt[t_i+t_j]{1 - C_{ij}}$, where F_i is the inbreeding coefficient of individual i , C_{ij} is the coancestry coefficient between individuals i and j (the inbreeding of a descendent from both), and t_i and t_j are their respective equivalent to complete generations. Finally, effective sizes were computed by averaging the individual increase in inbreeding and the increase in pairwise coancestry for all pairs of individuals in a reference subpopulation using the following formulae: $N_e F_i = 1/(2\Delta F_i)$ and $N_e C_{ij} = 1/(2\Delta C_{ij})$. Finally, following Cervantes et al. (2011a), the ratio $N_e C_{ij}/N_e F_i$ was computed to ascertain the existence of a possible hidden structure in data.

Single-sample molecular estimates of effective population size

$N_{e(LD)}$ was estimated as $N_{e(LD)} = \frac{1}{3(\hat{r}^2 - 1/S)}$, where \hat{r}^2 is the estimate of the correlation among alleles and S is

the sample size, using the modification proposed by Waples (2006), which correct for biases resulting from the presence of rare alleles, and was empirically adapted to different sample sizes and mating systems (here large sample sizes, ≥ 30 , and random mating apply; see Waples and Do 2010). To check for the consistency of the results obtained, three separate analyses were performed via removing, respectively, alleles with frequencies (P_{crit}) lower than 0.05, 0.02, and 0.01. A jackknife procedure was used to construct 95% confidence intervals of the estimates.

For consistency with the genealogical methods, single-sample N_e was also estimated using the molecular coancestry method proposed by Nomura (2008) as $\hat{N}_{e(M)} = \frac{1}{2\hat{f}_i}$, where \hat{f}_i is the average over $n(n-1)/2$ pairs of individuals i and j over L -analyzed loci $\hat{f}_{ij,L} = \frac{1}{W} \sum_{l=1}^L w_l \frac{f_{ij,l} - \hat{s}_l}{1 - \hat{s}_l}$, where \hat{s}_l is the expected homozygosity at a locus l . Nomura (2008) followed the suggestion by Oliehoek et al. (2006) of: (1) removing from the computations those alleles alike-by-state and not identical-by-descent and (2) weighting the contributions over loci using $W = \sum_{l=1}^L w_l = \sum_{l=1}^L \frac{(1 - \hat{s}_l)^2}{\sum_{i=1}^{n_i} \hat{p}_i^2 (1 - \sum_{i=1}^{n_i} \hat{p}_i^2)}$, where p_i is the frequency of the allele i at a given locus, to increase the importance of loci with small s_l and balanced allele frequencies. This method uses alleles at any frequency for computations. A jackknife procedure was used to construct 95% confidence intervals of the estimates.

Two-sample molecular estimates of effective population size

To illustrate differences between single-sample and two-sample estimators of molecular-based N_e , the unbiased temporal method proposed by Jorde and Ryman (2007), which has been proved to give consistent estimates across cohort pairs in a livestock framework (Goyache et al. 2011), was performed as well. This

method is based on the computation of the estimator F_s , computed as

$$F_s = \frac{\sum_{i=1}^A (x_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^A z_i(1 - z_i)^2}$$

, where A is the number of alleles at the locus, x_i and y_i are the frequencies of the i th allele in the first and second samples, respectively, and z_i is the average frequency of the i th allele over samples. Computations were performed under a sampling plan I (Waples 1989) in which individuals are sampled nondestructively and subsequently returned to the population. Under this sampling plan, the Jorde and Ryman's (2007) estimator of N_e (here noted as $N_{e(JR)}$) is $N_{e(JR)} = \frac{F_s[1 - 1/(4\bar{n})] - 1/\bar{n} + 1/N}{(1 + F_s/4)[1 - 1/(2\bar{n})]}$, where n_y is the number of individuals in the second sample, \bar{n} is the harmonic mean of the sample sizes n_x and n_y , and N is the actual census size of the population at the time of first sampling. A jackknife procedure was used to construct 95% confidence intervals of the estimates.

Demographic adjustment for bias

Following Waples et al. (2014), $N_{e(LD)}$ estimates were corrected dividing them with the ratio N_b/N_e , where N_b and N_e are the effective number of breeders and effective population size, respectively. Ratio N_b/N_e was estimated from demographic information using a discrete-time, age-structured, and deterministic model and using age-specific survival rates (s_x) and birth rates (b_x) calculated separately for males and females (Table S1). The model assumes that: (1) reproduction occurs at intervals of exactly one time unit (here one year); (2) survival and fecundity are independent of events in previous time periods; (3) there is no upper bound to the number of offspring an individual can produce in one breeding cycle; and (4) individuals survive to their first birthday and, therefore, fecundities are scaled to result in a stable population that produces a fixed number (N_1) of individuals per cohort that survive to age 1.

Following Jorde and Ryman (1995, 1996), $N_{e(JR)}$ estimates were corrected multiplying them with the ratio C/G , where C is a correction factor obtained from life table data (see Table S2) and G is the generation interval. Factor C accounts for variance due to mortality as a cohort passes from one-year class to the next and for genetic covariance among cohorts (because individuals from multiple age classes are the parents of a given cohort). The model to compute factor C requires a basic life table with information on age-specific survival rates (l_i) and birth rates at each age class i (i.e., gametic contribution; b_i ; see Table S2).

In all cases, life table data were estimated directly from the Gochu Asturcelta pig pedigree limiting the age of the parents to 5 years old.

Software used

All demographic and genealogical analyses were computed using the program ENDOG v4.8 (Gutiérrez and Goyache 2005) freely available at http://www.ucm.es/info/prodanim/html/JP_Web.htm

Molecular-based estimates of N_e were computed in all cases using the program NeEstimator (Do et al. 2014) freely available at <http://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/neestimator-software/>.

Ratio N_b/N_e was computed from life table data using the program AgeNe (Waples et al. 2011, 2013) freely available at <http://conserver.iugo-cafe.org/user/Robin%20Waples/AgeNe>.

The Jorde and Ryman's (1995, 1996) correction factor C was computed using a program kindly provided by Dr P. E. Jorde (<http://folk.uio.no/ejorde/software/factorc.zip>).

Results

Table 2 gives the estimates of N_e obtained using linkage disequilibrium ($N_{e(LD)}$), molecular coancestry ($N_{e(M)}$), and pedigree information. When discrete filial generations were considered, genealogical estimates of N_e were consistently the same varying from $N_e F_i = 5.0 \pm 0.8$ for F_3 to $5.6 \pm 0.3 F_4$. Estimates of $N_e F_i$ and $N_e C_{ij}$ were comparable across yearly and biannual samplings with the lower estimates for the cohort sampled in 2006. Parameter $\overline{\Delta F_i}$ tended to have similar values across either yearly or biannual samplings. However, both $N_e F_i$ and $N_e C_{ij}$ tended to increase with pedigree depth (and size of the breeding stock) varying from $N_e F_i = 4.6 \pm 1.9$ for Cohort₂₀₀₆ to $N_e C_{ij} = 9.2 \pm 0.3$ for Cohort₂₀₁₀. Further, ratio $N_e C_{ij}/N_e F_i$ was roughly 1 for F_3 and F_4 . However, this ratio increased with years from 1.09 for Cohort₂₀₀₆ to 1.39 for Cohort₂₀₁₀, therefore suggesting the existence of a slight hidden structure in the Gochu Asturcelta pedigree (Table 2).

$N_{e(LD)}$ took values over 17.0 for both discrete filial generations F_3 and F_4 (Table 2). Estimates of $N_{e(LD)}$ obtained for yearly or biannual samplings were adjusted for generations overlap using the ratio N_b/N_e computed using demographic information. This ratio took a value of 0.667 corresponding to demographic estimates of N_b and N_e of 222.9 and 334.9, respectively. Estimates of $N_{e(LD)}$ were highly consistent no matter the P_{crit} used. Therefore, only estimates obtained using $P_{crit} = 0.05$ are given. When yearly samplings were considered, the corrected estimates were similar to those obtained for the discrete filial

Table 2. Number of individuals (N) involved and estimates of effective size for each discrete generation, yearly cohort, and biannual sampling analyzed in the Gochu Asturcelta pig breed population computed via molecular-based methods (linkage disequilibrium, $N_{e(LD)}$ and pedigree information (individual increase in inbreeding, $N_{e(F)}$ and individual increase in coancestry, $N_{e(C)}$). In brackets, confidence intervals of the estimates on 95% (molecular-based methods) or standard errors of the estimates (genealogical methods) are provided. Additionally, the estimated correlation (r^2) and molecular coancestry (f) among alleles are given for the molecular-based methods and mean inbreeding (F), mean equivalent to discrete generations (t), and average individual increase in inbreeding (ΔF) are provided for pedigree data.

Sampling	Molecular estimates			Genealogical estimates								
	N^2	r^2	$N_{e(LD)}^3$	f	$N_{e(M)}$	N^2	F	t	ΔF	$N_{e(F)}$	$N_{e(C)}$	$N_{e(C)}/N_{e(F)}$
Discrete generations												
Generation 3	191	0.00532	17.0 (14.4; 19.9)	0.0681	7.3 (5.2; 9.9)	216	0.20 ± 0.08	3	0.10 ± 0.04	5.0 ± 0.8	5.4 ± 0.5	1.08
Generation 4	133	0.00770	17.3 (13.5; 21.8)	0.0951	5.3 (2.3; 9.3)	147	0.25 ± 0.04	4	0.09 ± 0.01	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.3	1.02
Yearly sampling												
Cohort ₂₀₀₆	74	0.01410	6.3 ⁴ [9.4 ⁵ (7.7; 11.2)]	0.0925	5.4 (4.1; 6.8)	83	0.17 ± 0.15	2.7 ± 0.7	0.10 ± 0.10	4.6 ± 1.9	5.0 ± 0.6	1.09
Cohort ₂₀₀₇	136	0.00753	27.5 ⁴ [41.2 ⁵ (31.9; 53.7)]	0.0390	12.8 (3.1; 29.4)	235	0.20 ± 0.10	3.2 ± 0.4	0.10 ± 0.05	5.2 ± 1.0	6.2 ± 0.4	1.19
Cohort ₂₀₀₈	211	0.00481	16.9 ⁴ [25.3 ⁵ (20.5; 31.1)]	0.0666	7.5 (4.1; 12)	563	0.22 ± 0.05	3.8 ± 0.4	0.08 ± 0.02	6.0 ± 0.6	7.2 ± 0.4	1.20
Cohort ₂₀₀₉	225	0.00451	18.9 ⁴ [28.4 ⁵ (23.3; 34.4)]	0.0442	11.3 (6.3; 18.8)	724	0.22 ± 0.05	4.2 ± 0.5	0.08 ± 0.02	6.3 ± 0.8	8.3 ± 0.4	1.32
Cohort ₂₀₁₀	134	0.00764	13.2 ⁴ [19.8 ⁵ (16.4; 23.7)]	0.0062	8.4 (0.1; 40.4)	643	0.25 ± 0.07	4.7 ± 0.6	0.08 ± 0.02	6.6 ± 0.7	9.2 ± 0.3	1.39
Biannual sampling¹												
Sampling ₂₀₀₆₋₂₀₀₇	210	0.00483	20.1 ⁴ [30.2 ⁵ (25.8; 38.3)]	0.0500	10.0 (6.3; 14.5)	318	0.19 ± 0.11	3.1 ± 0.5	0.10 ± 0.06	5.0 ± 1.4	5.7 ± 0.5	1.14
Sampling ₂₀₀₇₋₂₀₀₈	347	0.00291	24.2 ⁴ [36.3 ⁵ (29.3; 44.6)]	0.0356	14.1 (4.6; 28.8)	798	0.21 ± 0.07	3.6 ± 0.5	0.09 ± 0.03	5.7 ± 0.8	6.7 ± 0.4	1.18
Sampling ₂₀₀₈₋₂₀₀₉	436	0.00231	20.0 ⁴ [30.0 ⁵ (25.2; 35.5)]	0.0570	8.8 (5.7; 12.5)	1287	0.22 ± 0.05	4.0 ± 0.5	0.08 ± 0.02	6.2 ± 0.7	7.7 ± 0.4	1.24
Sampling ₂₀₀₉₋₂₀₁₀	359	0.00281	21.8 ⁴ [32.7 ⁵ (28.3; 37.7)]	0.0240	20.8 (7.2; 41.5)	1367	0.24 ± 0.06	4.4 ± 0.6	0.08 ± 0.03	6.5 ± 0.7	8.6 ± 0.4	1.32

¹Sampling mimicking the mean generation interval reported by Menéndez et al. (2016a) for the whole pedigree of the Gochu Asturcelta breed (1.8 ± 0.03 years).

²Number of individuals involved in the estimates.

³Values obtained removing alleles with frequencies (P_{min}) lower than 0.05.

⁴Estimates of effective size after correction for bias due to age structure.

⁵Original estimates of effective size and confidence intervals.

generations when sample size was high (16.9 for Cohort₂₀₀₈ and 18.9 for Cohort₂₀₀₉). However, when sample size (Cohorts 2006, 2007, and 2010) was lower, estimates were clearly biased downward or upward. Using biannual samplings, mimicking the average generation interval as recommended by Waples et al. (2013, 2014), the corrected estimates were biased upward varying from 20.0 for Sampling_{2008–2009} to 24.2 for Sampling_{2007–2008}. The increase of sampling period to three years did not change the scenario described above (Table S3). In any case, it is worth mentioning that before demographic correction (using ratio N_b/N_e), $N_{e(LD)}$ estimates were always unacceptably biased upward (Table 2).

In general, estimates of $N_{e(M)}$ took lower values than their $N_{e(LD)}$ counterparts (Table 2). $N_{e(M)}$ for discrete filial generation F_4 (5.3) was significantly lower than that of F_3 (7.3) due to a noticeable increase in molecular coancestry (9.51% vs. 6.81% in F_3). When yearly or biannual samplings were considered, estimates of $N_{e(M)}$ followed a similar trend to those of $N_{e(LD)}$; the higher the $N_{e(LD)}$ values the higher the $N_{e(M)}$ estimates. Except for Sampling_{2008–2009}, decreases in r^2 coincided with lower molecular coancestry values leading to estimates of $N_{e(M)}$ and $N_{e(LD)}$ highly biased upward (see Cohort₂₀₀₇ in Table 2). Again, the increase of sampling period to three years did not give any improvement in estimating N_e (Table S3).

Estimates of N_e were also obtained using a temporal method, previously tested in the livestock framework (Goyache et al. 2011), to gain more evidence on performance of single-sample methods to estimate N_e when samples are drawn from a number of yearly cohorts (Table 3). Estimates were corrected for overlapping generations by multiplying the original values with the ratio C/G (2.23) corresponding to a correction factor, C , computed following Jorde and Ryman (1995, 1996), of 4.01.

Although the program FactorC gave an estimate of generation interval, G , of 1.93 years, the “real” G of the population of 1.8 (± 0.03) years reported by Menéndez et al. (2016a) was used to the risk of slightly overestimate the $N_{e(JR)}$ values. When subsequent yearly samplings were considered, the estimates of $N_{e(JR)}$ had a noticeable variation fluctuating from 13.4 (Cohort₂₀₀₆ – Cohort₂₀₀₇) to 33.0 (Cohort₂₀₀₉ – Cohort₂₀₁₀). When the two samples used were separated by three years, the estimates obtained become more consistent varying from 23.6 (from Cohort₂₀₀₈ to Cohort₂₀₁₀) to 25.8 (from Cohort₂₀₀₇ to Cohort₂₀₀₉), therefore suggesting that drift signal was not strong enough in subsequent yearly samplings to give reliable estimates of N_e . Note that the estimates of $N_{e(JR)}$ for three-year samplings were slightly higher to the adjusted $N_{e(LD)}$ estimates obtained for biannual samplings (Table 2) and slightly lower to the adjusted and three-year sampling $N_{e(LD)}$ estimates (Table S3). In any case, these $N_{e(JR)}$ and $N_{e(LD)}$ estimates were fully comparable.

Discussion

The Gochu Asturcelta pig breed offers a very particular scenario useful to illustrate the performance of single-sample methods to estimate N_e in animal populations using molecular information. The breeding policy implemented by the breeders association allows to identify individuals that can be classified into discrete filial generations and, therefore, to compare the performance of different methods to estimate N_e under two different scenarios: generations overlap and discrete generations.

Genealogical estimates of effective size obtained using individual increase in inbreeding ($N_e F_i$) and individual increase in coancestry ($N_e C_{ij}$) kept consistency across reference populations (samples) and are in fully agreement with those recently reported by Menéndez et al. (2016a)

Table 3. Estimates of N_e obtained in the Gochu Asturcelta pig population using the temporal method of Jorde and Ryman (2007; $N_{e(OR)}$) with all possible combinations formed by subsequent and triennial samplings of the five yearly cohorts available. Both the original and the adjusted for overlapping generations estimates of $N_{e(OR)}$ are given. The 95% confidence intervals of the original estimates are in brackets. Sampling sizes for each sample regime are also provided.

Sample regime	Sample size	$N_{e(OR)}$ estimates		Confidence intervals
		Original	Adjusted	
Subsequent cohorts				
From Cohort ₂₀₀₆ to Cohort ₂₀₀₇	74–136	6.0	13.4	(4.0;11.9)
From Cohort ₂₀₀₇ to Cohort ₂₀₀₈	136–211	14.4	32.1	(11.3;19.7)
From Cohort ₂₀₀₈ to Cohort ₂₀₀₉	211–225	7.0	15.6	(4.8;13.6)
From Cohort ₂₀₀₉ to Cohort ₂₀₁₀	225–134	14.8	33.0	(11.4;20.9)
Triennial sampling				
From Cohort ₂₀₀₆ to Cohort ₂₀₀₈	74–211	11.4	25.4	(8.0;19.4)
From Cohort ₂₀₀₇ to Cohort ₂₀₀₉	136–225	11.6	25.8	(7.0;32.3)
From Cohort ₂₀₀₈ to Cohort ₂₀₁₀	211–134	10.6	23.6	(7.8;16.4)

for the most recent registered populations. Genealogical estimates are provided as a frame of reference for the understanding of the performance of the molecular-based methods to estimate N_e . Note that the genealogical methods applied correct for differences in pedigree depth and completeness of the individuals forming a reference population and, indirectly, account for the effects of mating policy, drift, overlap of generations, selection, and migration as a consequence of their reflection in the pedigree of each individual (Cervantes et al. 2008, 2009; Gutiérrez et al. 2008). Moreover, after the modification of the method suggested by Gutiérrez et al. (2009), and further applied for $N_e C_{ij}$ by Cervantes et al. (2011a), $N_e F_i$ accounts for the absence of self-fertilization allowing to obtain useful estimates of N_e using pedigrees with three equivalents to complete generations on average. In the current analysis, the lower estimates of $N_e F_i$ and $N_e C_{ij}$ were assessed for the yearly Cohort (2006) with mean pedigree depth ($t = 2.7 \pm 0.7$) on the limit of estimability (Gutiérrez et al. 2009).

It is not surprising that molecular-based estimates of N_e are higher than those obtained using genealogical data. Very recently, Silió et al. (2016), analyzing two experimental pig lines kept in herds closed for 24–28 generations and subject to a strict minimum coancestry mating policy, reported that molecular-based estimates of N_e based on either inbreeding or coancestry tended to exceed their genealogical counterparts. Unlike pedigree information, which refers to a virtually infinite number of loci, criteria based on observed molecular polymorphism refer to a finite number of loci. In any case, sampling sizes and number of loci used here can be considered enough to obtain reliable estimates of effective populations size even if the expected N_e were moderate or large (Antao et al. 2010).

Performance of the $N_{e(LD)}$ method

Even when discrete filial generations are considered, estimates of $N_{e(LD)}$ are at least threefold higher than the corresponding genealogical estimates (Table 2). However, estimates of $N_{e(LD)}$ for filial generations F_3 and F_4 were lower and steadier than those obtained using yearly or biannual sampling. The linkage disequilibrium method relies on the fact that, in a system where gametes are randomly distributed among a small number of zygotes, there will be departures from expected genotype frequencies and departures from expected gametic frequencies, both of which can be used to estimate N_e (Hill 1981; Waples 1991). These assumptions only fit well to samples obtained from age-structured populations. Moreover, in the case of overlapping generations, it is hard to assume that the available samples derive from a population with constant size. If population size changes, the

“background” LD from previous generations that has not broken down by recombination between loci and new LD generated by reproduction of a finite number of individuals reflect different effective sizes and, therefore, estimate of N_e based on \hat{r}^2 can be biased upward or downward for a few generations (Waples 2005; Waples et al. 2014).

In any case, estimates of \hat{r}^2 obtained from molecular information in the Gochu Asturcelta pig breed can be biased upward even when discrete filial generations are considered. Demographic information allows to estimate \hat{r}^2 assuming selective neutrality and constant population size as $\hat{r}^2 = \frac{1}{3H(N_e N_b)}$, where $H(N_e N_b)$ is the harmonic mean of N_e and N_b (see formula (5) in Waples et al. 2014). Demographic estimate of \hat{r}^2 would be here 0.00125 which underestimates the values of \hat{r}^2 obtained using molecular information whatever the sample considered (Table 2). Population studies ideally assume that LD is estimated using samples formed by unrelated individuals. This assumption is far from the pig population analyzed here and is not likely to occur in most livestock or natural animal populations therefore biasing upward the estimates of \hat{r}^2 . Even though breeding policy of the Gochu Asturcelta population is under strict control, some hidden structuring, characterized by the ratio $N_e C_{ij}/N_e F_i$ (Cervantes et al. 2011a), has appeared probably due to an excessive use for reproduction of the descendants of two founders (Menéndez et al. 2016a).

Our results confirm that estimates of $N_{e(LD)}$ obtained for filial generations F_3 and F_4 are more reliable than those assessed in scenarios with overlapping generations. Moreover, if no demographic adjustment is carried out, $N_{e(LD)}$ estimates for yearly or biannual sampling schemes were terribly wrong (Table 2). Yearly samplings appeared clearly insufficient to obtain sound estimates of $N_{e(LD)}$, probably due to small sample size (Cohorts 2006 and 2010) or sampling bias (Cohort 2007; see Table 1). Estimates can be substantially biased at small sample sizes unless the true N_e was smaller than the sample size used to estimate it (England et al. 2006; Waples 2006). Although biased upward, the current results confirm that $N_{e(LD)}$ estimates are more reliable when sampling span approaches a generation length (Waples et al. 2014). Such sampling span increases sample size, but also “homogenize” the actual number of breeders producing the sample across estimates. As theory suggests that $N_{e(LD)}$ estimates are function of the harmonic mean of N_e and N_b (Waples et al. 2014), $N_{e(LD)}$ should converge on true N_e when sampling span approaches the generation length.

Performance of other molecular-based methods to estimate N_e

The Nomura (2008) coancestry-based method gave lower estimates of N_e than $N_{e(LD)}$ (Tables 2 and S3) and nearer

to the “real” genealogical ones in the case of discrete filial generations. However, this may be due to the fact that $N_{e(M)}$ is more likely related to the number of founders represented in the samples rather than population size. Caballero and Toro (2002) reported that $1/2f$ (being f the average molecular coancestry of the analyzed population) is actually the founder genome equivalents (N_g). N_g is a key parameter to assess genetic losses due to drift which can be defined as the theoretically expected number of founders that would be required to provide the genetic diversity in the analyzed population if the founders were equally represented and had lost no alleles (Ballou and Lacy 1995). This definition is conceptually different to that of effective population size, the evolutionary analogous to census size, proposed by Wright (1931): the size of an idealized population which would give rise to the rate of inbreeding, or the rate of change in variance of gene frequencies, observed in the analyzed population. Even though the method by Nomura (2008) adjusts for the presence of alleles alike-in-state (Oliehoek et al. 2006), the main difference between his method and the Caballero and Toro’s (2002) approach is that self-coancestries (s_i), the diagonals in the between-individuals coancestry matrix (being $s_i = \frac{1+F_i}{2}$, where F_i is the homozygosity in a molecular context), are not included in the computations and, therefore, $\hat{f} < f$ and $N_{e(M)} > N_g$. Self-coancestries have a major importance in computing f : the lower the sample size the higher the weight of self-coancestries on f (Cervantes et al. 2011b). In any case, our results confirm the results by Miller et al. (2015) in bighorn sheep suggesting that \hat{f} tend to vary with \hat{r}^2 . Therefore, both estimates of N_e ($N_{e(M)}$ and $N_{e(LD)}$) cannot be considered independent.

Results obtained using the Jorde and Ryman’s (2007) approach illustrate that performance of temporal methods, when applied to data with overlapping generations, is highly dependent on sampling interval (Waples and Yokota 2007; Barker 2011) due to the particular age structure of the studied population. Here, $N_{e(JR)}$ estimates obtained using subsequent yearly samplings did not accumulate sufficient drift signal, therefore giving inconsistent N_e estimates. In turn, too long separation among samples gives estimates of N_e highly biased upward (Table S4). Note that, in our example, genealogical separation between subsequent yearly samples is $t \approx 0.5$ while four-year and five-year sampling plans (Table S4) are separated by 1.5 and 2 equivalent to discrete generations (Table 2). The Jorde and Ryman’s (2007) approach gave consistent estimates, comparable with adjusted $N_{e(LD)}$ estimates obtained for biannual (generation interval) sampling, under a three-year sampling plan. In our example, samples obtained under this sampling plan are separated by about $t = 1$. This scenario is consistent with the

performance of this method previously reported in horses (Goyache et al. 2011).

Conclusions

The current results confirm the fact that performance of $N_{e(LD)}$ can only be considered reliable in populations under generations overlapping when sampling span approaches a generation interval (Waples et al. 2014). Otherwise, sampling bias can affect the estimates of \hat{r}^2 , probably due to unaccounted variation in molecular coancestry among samples. This may be particularly important in scenarios in which samples are not likely to be formed by unrelated individuals. Furthermore, $N_{e(LD)}$ can only be considered useful if a correction of demographic bias is applied.

In such framework, even if no high variation of LD among yearly cohorts occur (Miller et al. 2015), the operational advantage of using single-sample methods to obtain molecular-based estimates of N_e is not clear: while two-sample methods may need a sample span exceeding a generation interval, single-sample methods (namely $N_{e(LD)}$) will need a representative sampling in each of the yearly cohorts included in that interval. These concerns particularly apply to natural and domestic populations with large generation intervals. As an example, it is worth mentioning that in domestic horses, generation interval usually exceeds 10 years (Cervantes et al. 2009). In such scenario, it is hard to assume that available samples are representative of a complete generation interval period (Corbin et al. 2010, 2012).

The current study has been performed using LD between unlinked loci. The availability of high-density SNP Chips offers the opportunity of estimating $N_{e(LD)}$ using LD between linked loci, therefore improving the performance of the method. However, the concerns about sampling span described above still apply. Actually, high-density SNP Chips have been used to ascertain the variation of N_e over time, expressed as generations in the past (Corbin et al. 2010, 2012; Flury et al. 2010). Even though some of these studies use complex models accounting for sources of variation such as sample size, mutation, phasing, or recombination rate together with thousands of linked SNP data (Corbin et al. 2012; Barbato et al. 2015), $N_{e(LD)}$ estimates at a given point of time are always function of both \hat{r}^2 and between-SNPs distance in Morgans (c). As fitting c is usually arbitrary, historical estimates of N_e mainly depend on \hat{r}^2 which, in turn, depends on sampling and demographic structure of the studied population.

Overall, the empirical evidence given in the current study confirms that estimates of N_e obtained using methods based in molecular information should be interpreted

with caution (Barker 2011; Goyache et al. 2011; Putman and Carbone 2014).

Acknowledgments

This work was partially funded by a specific contract between Government of Principado de Asturias and Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA; <http://www.gochuasturcelta.org/>). IA, IF, and FG are supported by grant FICYT GRUPIN14-113.

References

- Antao, T., A. Perez-Figueroa, and G. Luikart. 2010. Early detection of population declines: high power of genetic monitoring using effective population size estimators. *Evol. Appl.* 4:144–154.
- Ballou, J. D., and R. C. Lacy. 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. Pp. 76–111 in J. D. Ballou, M. Gilpin, T. J. Foose, eds. *Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population management*. Columbia University Press, NY, USA.
- Barbato, M., P. Orozco-terWengel, M. Tapio, and M. W. Bruford. 2015. SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Front. Genet.* 6:109.
- Barker, J. S. F. 2011. Effective population size of natural populations of *Drosophila buzzatii*, with a comparative evaluation of nine methods of estimation. *Mol. Ecol.* 20:4452–4471.
- Caballero, A., and M. A. Toro. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3:289–299.
- Cervantes, I., F. Goyache, A. Molina, M. Valera, and J. P. Gutiérrez. 2008. Application of individual increase in inbreeding to estimate effective sizes from real pedigrees. *J. Anim. Breed. Genet.* 125:301–310.
- Cervantes, I., J. P. Gutiérrez, A. Molina, F. Goyache, and M. Valera. 2009. Genealogical analyses in open populations: the case of three Arab-derived Spanish horse breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 126:335–347.
- Cervantes, I., F. Goyache, A. Molina, M. Valera, and J. P. Gutiérrez. 2011a. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *J. Anim. Breed. Genet.* 128:56–63.
- Cervantes, I., J. M. Pastor, J. P. Gutiérrez, F. Goyache, and A. Molina. 2011b. Effective population size as a measure of risk status in rare breeds: the case of three Spanish ruminant breeds. *Livest. Sci.* 138:202–206.
- Corbin, L. J., S. C. Blott, J. E. Swinburne, M. Vaudin, S. C. Bishop, and J. A. Woolliams. 2010. Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse. *Anim. Genet.* 41:8–15.
- Corbin, L. J., A. Y. H. Liu, S. C. Bishop, and J. A. Woolliams. 2012. Estimation of historical effective population size using linkage disequilibrium with marker data. *J. Anim. Breed. Genet.* 129:257–270.
- Do, C., R. S. Waples, D. Peel, G. M. Macbeth, B. J. Tillett, and J. R. Ovenden. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol. Ecol. Res.* 14:209–214.
- England, P. R., J.-M. Cornuet, P. Berthier, D. A. Tallmon, and G. Luikart. 2006. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conserv. Genet.* 7:303–308.
- Flury, C., M. Tapio, T. Sonstegard, C. Drögemüller, T. Leeb, H. Simianer, et al. 2010. Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. *J. Anim. Breed. Genet.* 127:339–347.
- Goyache, F., I. Álvarez, I. Fernández, L. Pérez-Pardal, L. J. Royo, and L. Lorenzo. 2011. Usefulness of molecular-based methods for estimating effective population size in livestock assessed using data from the endangered black-coated Asturcón pony. *J. Anim. Sci.* 89:1251–1259.
- Gutiérrez, J. P., and F. Goyache. 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122:172–176.
- Gutiérrez, J. P., I. Cervantes, A. Molina, M. Valera, and F. Goyache. 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating realised effective sizes from pedigrees. *Genet. Sel. Evol.* 40:359–378.
- Gutiérrez, J. P., I. Cervantes, and F. Goyache. 2009. Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals. *J. Anim. Breed. Genet.* 126:327–332.
- Hill, W. G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* 38:209–216.
- Jorde, P. E., and N. Ryman. 1995. Temporal allele frequency change and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics* 139:1077–1090.
- Jorde, P. E., and N. Ryman. 1996. Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation of effective population size from temporal change of allele frequencies. *Genetics* 143:1369–1381.
- Jorde, P. E., and N. Ryman. 2007. Unbiased estimator for genetic drift and effective population size. *Genetics* 177:927–935.
- Luikart, G., N. Ryman, D. A. Tallmon, M. K. Schwartz, and F. W. Allendorf. 2010. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conserv. Genet.* 11:355–373.
- Maignel, L., D. Boichard, and E. Vérier. 1996. Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bull.* 14:49–54.

- Menéndez, J., I. Álvarez, I. Fernández, B. de la Roza, and F. Goyache. 2015. Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed. *Arch. Anim. Breed.* 58:217–220.
- Menéndez, J., I. Álvarez, I. Fernández, and F. Goyache. 2016a. Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation. *Czech J. Anim. Sci.* 61:140–143.
- Menéndez, J., F. Goyache, A. Beja-Pereira, I. Fernández, N. A. Menéndez-Arias, R. Godinho, et al. 2016b. Genetic characterization of the endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: insights for the composition of the Iberian native pig stock. *Livest. Sci.* 187:162–167.
- Miller, J. M., J. Poissant, R. M. Malenfant, J. T. Hogg, and D. W. Coltman. 2015. Temporal dynamics of linkage disequilibrium in two populations of bighorn sheep. *Ecol. Evol.* 5:3401–3412.
- Nomura, T. 2008. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evol. Appl.* 1:462–474.
- Oliehoek, P. A., J. J. Windig, J. A. M. van Arendonk, and P. Bijma. 2006. Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics* 173:483–496.
- Putman, A. I., and I. Carbone. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecol. Evol.* 4:4399–4428.
- Silió, L., C. Barragán, A. I. Fernández, J. García-Casco, and M. C. Rodríguez. 2016. Assessing effective population size, coancestry and inbreeding effects on litter size using the pedigree and SNP data in closed lines of the Iberian pig breed. *J. Anim. Breed. Genet.* 133:145–154.
- Waples, R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121:379–391.
- Waples, R. S. 1991. Genetic methods for estimating the effective size of Cetacean populations. *Rep. Int. Whal. Comm. (Special issue)* 13:279–300.
- Waples, R. S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: To what time periods do the estimates apply? *Mol. Ecol.* 14:3335–3352.
- Waples, R. S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv. Genet.* 7:167–184.
- Waples, R. S., and C. Do. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.* 3:244–262.
- Waples, R. S., and M. Yokota. 2007. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* 175:219–233.
- Waples, R. S., C. Do, and J. Choquet. 2011. Calculating N_e and N_e/N in age-structured populations: a hybrid Felsenstein-Hill approach. *Ecology* 92:1513–1522.
- Waples, R. S., G. Luikart, J. R. Faulkner, and D. A. Tallmon. 2013. Simple life history traits explain key effective population size ratios across diverse taxa. *Proc. Biol. Sci.* 280:20131339.
- Waples, R. S., T. Antao, and G. Luikart. 2014. Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size. *Genetics* 197:769–780.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97–159.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Life table used to calculate the ratio between effective number of breeders (N_b) and effective population size (N_e) using demographic data, as proposed by Waples et al. (2014, see references section).

Table S2. Life table used to calculate the correction factor (C) for overlapping generations proposed by Jorde and Ryman (1995, 1996, see references section).

Table S3. Number of individuals (N) involved and estimates of effective size for three-years sampling in the Gochu Asturcelta pig breed population computed via molecular-based methods (linkage disequilibrium, $N_{e(LD)}$, and molecular coancestry, $N_{e(M)}$) and pedigree information (individual increase in inbreeding, $N_e F_i$, and individual increase in coancestry, $N_e C_{ij}$).

Table S4. Estimates of N_e obtained in the Gochu Asturcelta pig population using the temporal method of Jorde and Ryman (2007; $N_{e(JR)}$) with all possible four-year and five-year sampling plans formed with combinations of the five yearly cohorts available.

Supplementary Table S1. Life table used to calculate the ratio between effective number of breeders (N_b) and effective population size (N_e) using demographic data, as proposed by Waples et al (2014, see references section). Age-specific survival rates (s_x ; i.e. probability of surviving from age x to age $x + 1$) and birth rates (b_x ; i.e. mean number of offspring in one time period produced by a parent of age x) were calculated separately for males and females directly from the Gochu Asturcelta pedigrees limiting the age of the parents to 5 years old. Computations were carried out assuming the harmonic mean of the yearly cohorts registered from 2006 to 2010 (133) as parameter N_1 (total number of offspring per time period that survive to age 1) and no different Poisson variance in reproductive success among same-sex and same-age individuals.

Age class (i)	<i>males</i>		<i>females</i>	
	l_i	b_i	l_i	b_i
1 ^a	0.461	6.6	0.389	6.6
2	0.360	6.6	0.392	7.7
3	0.133	5.9	0.169	6.6
4	0.026	5.8	0.043	4.2
5	0.020	4.3	0.008	6.2

^ain years

Supplementary Table S2. Life table used to calculate the correction factor (C) for overlapping generations proposed by Jorde and Ryman (1995, 1996, see references section). Age-specific survival rates (l_i) and birth rates at each age class i (gametic contribution; b_i) are listed. Parameters l_i and b_i were estimated directly from the Gochu Asturcelta pedigrees limiting the age of the parents to 5 years old. Note that if data do not result in a constant population size, the model by Jorde and Ryman (1995, 1996) adjusts all b_i 's to yield $\text{Sum } l_i^* b_i = 1$.

Age class (i)	l_i	b_i
1 ^a	0.4251	1.97
2	0.3755	1.90
3	0.1510	1.49
4	0.0344	5.56
6	0.0141	2.31

^ain years

Supplementary Table S3. Number of individuals (N) involved and estimates of effective size for three-years sampling in the Gochu Asturcelta pig breed population computed via molecular-based methods (linkage disequilibrium, $N_{e(LD)}$, and molecular coancestry, $N_{e(M)}$) and pedigree information (individual increase in inbreeding, $N_e F_t$, and individual increase in coancestry, $N_e C_{ij}$). In brackets, confidence intervals of the estimates on 95% (molecular-based methods) or standard errors of the estimates (genealogical methods) are provided. Additionally, the estimated correlation (\hat{r}^2) and molecular coancestry (\hat{f}) among alleles are given for the molecular-based methods and mean inbreeding (F), mean equivalent to discrete generations (t) and average individual increase in inbreeding ($\overline{\Delta F_i}$) are provided for pedigree data.

	Molecular estimates					Genealogical estimates						
	N [†]	\hat{r}^2	$N_{e(LD)}$ [‡]	\hat{f}	$N_{e(M)}$	N ^a	F	t	$\overline{\Delta F_i}$	$N_e F_t$	$N_e C_{ij}$	$\frac{N_e C_{ij}}{N_e F_t}$
Three-annual Sampling	421	0.00239	23.9 [§] [35.8 ^{††} (29.4; 43.2)]	0.04412	11.3 (5.0; 20.1)	881	0.21 ± 0.08	3.5 ± 0.6	0.09 ± 0.04	5.6 ± 1.1	6.3 ± 0.5	1.13
Sampling ₂₀₀₆₋₂₀₀₈												
Sampling ₂₀₀₇₋₂₀₀₉	572	0.00176	24.6 [§] [36.9 ^{††} (30.7; 44.0)]	0.04279	11.7 (6.9; 17.7)	1522	0.22 ± 0.06	3.9 ± 0.6	0.08 ± 0.03	6.0 ± 0.8	7.1 ± 0.4	1.18
Sampling ₂₀₀₈₋₂₀₁₀	570	0.00176	22.6 [§] [33.9 ^{††} (28.9; 39.3)]	0.03746	13.3 (7.2; 21.4)	1930	0.23 ± 0.06	4.2 ± 0.6	0.08 ± 0.02	6.3 ± 0.7	7.9 ± 0.4	1.25

[†] Number of individuals involved in the estimates

[‡] Values obtained removing alleles with frequencies (P_{crit}) lower than 0.05

[§] Estimates of effective size after correction for bias due to age structure

^{††} Original estimates of effective size and confidence intervals

Table S4. Estimates of N_e obtained in the Gochu Asturcelta pig population using the temporal method of Jorde and Ryman (2007; $N_{e(JR)}$) with all possible four-year and five-year sampling plans formed with combinations of the five yearly cohorts available. Both the original and the adjusted for overlapping generations estimates of $N_{e(JR)}$ are given. The 95% confidence intervals of the original estimates are in brackets. Sampling sizes for each sample regime are also provided.

Sample regime	Sample size	$N_{e(JR)}$ estimates		Confidence Intervals
		original	adjusted	
Four-year sampling				
From Cohort ₂₀₀₆ to Cohort ₂₀₀₉	74-225	18.2	40.5	(11.0;52.5)
From Cohort ₂₀₀₇ to Cohort ₂₀₁₀	136-134	18.1	40.3	(10.4;69.1)
Five-year sampling				
From Cohort ₂₀₀₆ to Cohort ₂₀₁₀	74-134	25.8	57.5	(14.8;101.3)



7. Resultados y Discusión

7.1. Multipaternidad en ganado porcino

En el primero de los trabajos asociados a la presente Memoria (Menéndez *et al.* 2015) se ha testado la validez de una batería de 20 microsatélites (IGF1, S0002, S0026, S0071, S0101, S0155, S0225, S0226, S0227, S0228, SW240, SW632, SW911, SW936, SW951, SW857, S0005, S0090, S0218 y SW24), en su mayor parte incluidos en el panel recomendado por la ISAG-FAO (Laval *et al.* 2000; <http://www-lgc.toulouse.inra.fr/pig/panel/panel2004.htm>), para la realización de pruebas de filiación en la raza Gochu Asturcelta. La instrumentación del Programa de Conservación tenía en cuenta la necesidad de registro sistemático de genealogías, En una población con una variabilidad genética de partida muy escasa, pérdidas de variabilidad genética producidas por deriva pueden afectar a la viabilidad de la población (Goyache *et al.* 2003; Álvarez *et al.* 2008) siendo necesario asegurar la calidad de las genealogías registradas. En un escenario de ganaderos no profesionales las paternidades declaradas podrían no tener la suficiente fiabilidad. Las diferencias esperables entre los individuos nacidos una vez puesto en marcha el esquema de cría serían muy bajas por lo que se consideró necesario establecer protocolos fiables para la comprobación de paternidades que pudieran llevarse a cabo de forma rutinaria en los momentos iniciales de la instauración del sistema de cría.

7.1.1. Resultados obtenidos

La batería de microsatélites se genotipó en 19 individuos pertenecientes a dos grupos de cría cuyos progenitores eran hermanos completos. El grupo A consistía en 2 verracos y 2 cerdas, los cuatro animales hermanos completos criados en el mismo cercado. El primer parto de la dos hembras del Grupo A produjo 13 lechones diferentes. El grupo B consistía en un verraco adulto que se mantuvo en el mismo cercado que un verraco y una cerda jóvenes, hermanos completos. El primer parto de la cerda del Grupo B produjo 6 lechones. Los verracos pudieron acceder a las

cerdas sin restricciones. La asignación de paternidad y maternidad, en su caso, se realizó utilizando el programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007) y una población de referencia consistente en los genotipos correspondientes a 141 individuos de Gochu Asturcelta.

A pesar de que seis de los microsatélites testados se separaron del equilibrio Hardy-Weinberg de forma estadísticamente significativa, las probabilidades de no exclusión estimadas para los tres escenarios posibles, dos padres desconocidos, un solo progenitor desconocido y los dos progenitores conocidos, fueron de 0,00384536, 0,00005149 y 0,00000005, respectivamente. Los análisis efectuados permitieron asignar todos los lechones analizados a una pareja de progenitores con suficiente confianza estadística a pesar de que los dos verracos de cada Grupo tuvieron descendencia con cada una de las hembras del Grupo. La prueba de Chi-cuadrado demostró que verraco adulto del Grupo B no tuvo un éxito reproductivo estadísticamente diferente del de su compañero joven a pesar de que era esperable que hubiera presentado diferencias debido a un mayor vigor.

7.1.2. Importancia para el programa de conservación

Este trabajo es consecuencia directa de las condiciones reales de la puesta en marcha del Programa de Conservación del Gochu Asturcelta. Uno de los mayores inconvenientes para la conservación de estirpes de cerdo celta en el Noroeste de España ha sido que, en los últimos cincuenta años, los ganaderos perdieron las capacidades para la cría de ganado porcino. En el caso del Gochu Asturcelta, ni los ganaderos interesados ni los operarios del SERIDA-Villaviciosa a cargo del Núcleo de Multiplicación tenían experiencia en el manejo de este ganado. Los patrones de cría de grandes y pequeños rumiantes no resultaron aplicables y la no separación de sexos a edades a las que en esas especies ganaderas no era esperable un éxito reproductivo dio lugar a la producción de camadas de paternidad incierta. Este hecho, que se produjo inicialmente en el Núcleo de Multiplicación de

la raza, motivó su paralización temporal y pudo dar al traste con el programa.

Como labores preliminares, previas al reconocimiento oficial de la raza y su inclusión en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (BOE de 24 de enero de 2007), el SERIDA había realizado genotipados en 39 individuos de Gochu Asturcelta con 9 microsatélites (IGF1, S0005, S0090, S0155, S0218, S0225, SW240, SW632 y SW951; Royo *et al.* 2004, 2008) para su comparación con 34 individuos de raza Bísara 21 individuos de raza ibérica y Alentejana y 10 cerdos de razas mejoradas (Hampshire, Landrace y Large White). La batería de marcadores descrita se mostró insuficiente para realizar correctamente la asignación de paternidades. Si bien las causas por las que pueden encontrarse fallos en la asignación de paternidades son bien conocidas (Jones *et al.* 2010), incluyendo fallos en la determinación del alelo, la presencia de alelos nulos o la imposibilidad de muestrear todos los padres posibles, el problema encontrado aquí venía dado por la identidad genética entre los posible padres. Este problema, que era esperable que se reprodujera en condiciones no controladas, llevó a aumentar el número de microsatélites a genotipar de forma rutinaria. Por otra parte, se comprobó la necesidad de transmitir a los ganaderos unas pautas claras de manejo reproductivo. Se ha descrito en jabalí que los machos de mayor tamaño o edad pueden tener mayores éxitos reproductivos en condiciones naturales por razones etológicas relacionadas con la vigilancia del macho dominante durante el periodo de celo de la hembra (Delgado *et al.* 2008). Sin embargo, estas circunstancias no parecen ser directamente aplicables a la cría en cautividad ya que el verraco joven del Grupo B tuvo un éxito reproductivo similar al del verraco adulto.

La experiencia vivida en los momentos iniciales del Programa de Conservación del Gochu Asturcelta marcó profundamente el inicio de la actividad de cría de ACGA: se promovieron pautas de cría claras con promoción de cruzamientos de mínima consanguinidad incluyendo el uso puntual de semen obtenido en animales del Núcleo de Multiplicación y se asumió la necesidad de monitorizar permanentemente la variabilidad genética de población tanto con la información genealógica acumulada

(Menéndez *et al.* 2016a) como estableciendo diferentes métodos que aprovecharan la información molecular generada en realización de pruebas de filiación (Menéndez *et al.* 2016c). La puesta a punto de una más amplia batería de marcadores de tipo microsatélite permitió profundizar en la caracterización de la población de Gochu Asturcelta en el contexto ibérico (Menéndez *et al.* 2016b).

7.2. Política de apareamientos en la raza Gochu Asturcelta

En el segundo de los trabajos asociados a la presente Memoria (Menéndez *et al.* 2016a) se ha realizado un análisis de las genealogías registradas en el Libro Genealógico del Gochu Asturcelta para la comprobación del efecto que haya podido tener la política de apareamientos recomendada por ACGA a sus criadores en el mantenimiento de la variabilidad genética de partida en la población de Gochu Asturcelta. Para ello se han analizado 3.156 registros, obtenidos hasta agosto de 2014, de animales con genealogías completas, excepto los fundadores. Los datos analizados, procedentes de 515 camadas producidas por 109 verracos y 309 cerdas reproductoras, se organizaron en dos poblaciones de referencia cuyos resultados se compararon con los resultados obtenidos mediante el análisis del pedigrí completo: a) la población formada por la cría nacidos en 2013 y 2014 el pedigrí completo (232 individuos; PopO); y b) la población formada por los 18 individuos nacidos en 2012 y 2013 y seleccionados como reproductores (PopR). Los análisis se realizaron mediante el programa ENDOG v.4.8 (Gutiérrez y Goyache 2005).

7.2.1. Resultados obtenidos

El número de equivalentes a generaciones discretas de las poblaciones de referencia fue de 5, muy similar a los 4.3 ± 0.9 del pedigrí completo. Esta profundidad de pedigrí se consideró suficiente para poder cumplir con los

objetivos previstos. Gutiérrez *et al.* (2009) consideran necesario disponer de pedigrís de, al menos, 3 equivalentes a generaciones discretas para obtener resultados fiables en parámetros cruciales para predecir la capacidad evolutiva de una población como el tamaño efectivo.

La comparación de los parámetros más importantes que caracterizan las pérdidas de variabilidad genética de la población debidas al sistema de cría parece indicar que no se han producido pérdidas inasumibles de variabilidad genética tras el inicio del programa de conservación (Figura 2). De los 6 fundadores (f) con que se inició el Programa de Conservación solo 4 y 5 tuvieron representación en las poblaciones de referencia PopO y PopR, respectivamente. El cociente entre el tamaño efectivo de fundadores (f_e), que caracteriza contribuciones desequilibradas de los fundadores a la descendencia (Lacy 1989), y f fue de, aproximadamente, 0,6 para el pedigrí completo pero más alto para PopO y PopR (0,9 y 0,7, respectivamente). Los parámetros número efectivo de ancestros (f_a ; Boichard *et al.* 1997) y equivalente a genomas fundadores (f_g ; Ballou y Lacy 1995) caracterizan, respectivamente, las pérdidas de variabilidad genética por aparición de cuellos de botella en el pedigrí y todas las pérdidas por deriva genética. Mientras que las pérdidas por deriva siguieron afectando a la variabilidad genética de la población, con cocientes f_g/f_e de alrededor de 0,6 para las poblaciones testadas, no parece haberse producido un cuello de botella claro por utilización abusiva de reproductores (cociente f_a/f_e igual a 1 en las poblaciones de referencia y superior a 1 en el pedigrí completo). Esta situación se testó alternativamente mediante el cálculo del número efectivo de no fundadores (nf_e ; Caballero y Toro 2000). El cociente nf_e/f_e volvió a ser superior a 1 en PopO y el pedigrí completo y ligeramente inferior (0,91) en PopR.

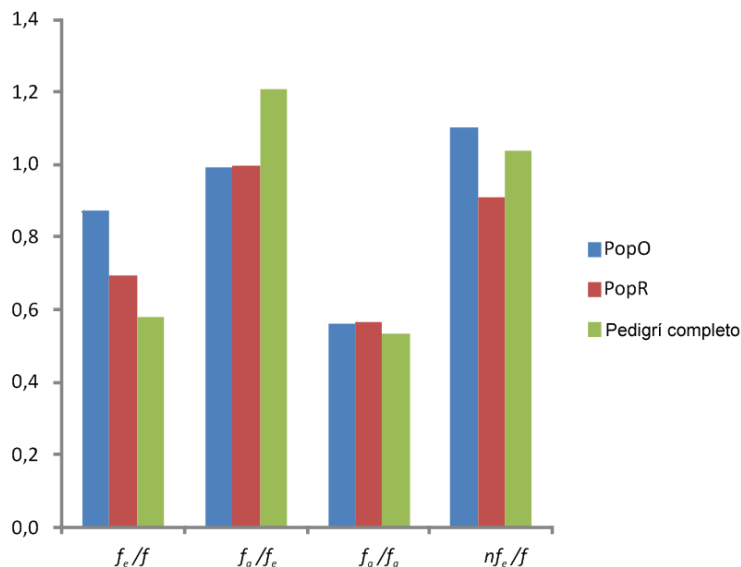


Figura 2. Cocientes de los parámetros que explican el origen de los genes en la raza de Gochu Asturcelta para las dos poblaciones de referencia ajustadas y el pedigrí completo analizado. Los parámetros utilizados para el cálculo de los cocientes son: número de fundadores (f), tamaño efectivo de fundadores (f_e), número efectivo de ancestros (f_a), equivalente a genomas fundadores (f_g) y número efectivo de no fundadores ($n f_e$).

La consanguinidad media de la población (F) creció sostenidamente con la acumulación de pedigrí hasta llegar a un valor medio de $0,30 \pm 0,09$ en los animales nacidos en 2014. Sin embargo, la media de los incrementos individuales de consanguinidad (ΔF_i ; Gutiérrez *et al.* 2008, 2009), tras registrar valores muy altos en 2005 (0,17), se mantuvo en valores estables alrededor de 0,07 a partir del año 2009. Estos valores estables de ΔF_i se reflejaron en valores estables de tamaño efectivo ($N_e F_i$), que variaron entre $6,29 \pm 1,08$ para el pedigrí completo y $7,44 \pm 0,87$ para PopR. Los valores de tamaño efectivo estimados a partir de incrementos individuales de coascendencia ($N_e C_{ij}$; Cervantes *et al.* 2011) fueron ligeramente superiores, variando entre $7,09 \pm 0,52$ para el pedigrí completo y $9,91 \pm 0,41$ para PopR.

7.2.2. Comparación con otros escenarios de conservación

La población de Gochu Asturcelta, por su extremadamente pequeño tamaño inicial, es difícilmente comparable con otras poblaciones porcinas cuyos análisis genealógicos están disponibles en la bibliografía científica. La mayor parte de ellas son poblaciones comerciales que cuentan con varios cientos de fundadores y pedigrís profundos que pueden superar los 11 equivalentes a generaciones discretas (Melka y Schenkel 2010; Welsh *et al.* 2010; Tang *et al.* 2013). A pesar de ello, el intervalo generacional de la raza de Gochu Asturcelta (1,8 años; Menéndez *et al.* 20016a) es claramente similar al descrito para estas poblaciones comerciales que oscilaba entre 1,6 y 2,2 años. Esto llama la atención, ya que el esquema de cría de ACGA ha promovido la mayor utilización posible en el tiempo de los animales fundadores y de primeras generaciones filiales (Argamentería y Menéndez 2012) en un intento de alargar el intervalo generacional y reducir la acumulación de consanguinidad. Esta situación pueden explicarse, sin embargo, por el interés en producir lechones para su utilización como reproductores en las ganaderías que se incorporaban progresivamente a ACGA, lo que acerca a la población, en el periodo analizado, al comportamiento de una población comercial.

Quizás la población con la que es posible establecer alguna comparación con el Gochu Asturcelta es la piara de cerdo ibérico mantenida en la Finca “El Dehesón del Encinar” desde 1944 hasta 2013 (Toro *et al.* 2000; Silió y Rodrigañez 2013; Silió *et al.* 2016). Esta población cerrada, iniciada con 20 verracos y 82 cerdas (Silió y Rodrigañez 2013) y que ha llegado a disponer de 28 equivalentes a generaciones discretas en su pedigrí (Silió *et al.* 2016), presenta un intervalo generacional notablemente superior al del Gochu Asturcelta, variando entre 1,92 y 3,17 años dependiendo de la cohorte anual considerada. Asimismo, el tamaño efectivo de esta población de cerdo ibérico es también superior a la de Gochu Asturcelta. Toro *et al.* (2000), utilizando varianzas familiares, describió un tamaño efectivo medio de 13,8. Aunque los métodos de varianzas familiares tienden a sobreestimar el tamaño efectivo de una población con generaciones solapadas ya que se ignoran importantes fuentes de deriva como la

selección familiar y otros (Gutiérrez *et al.* 2008; Cervantes *et al.* 2008), estimas recientes realizadas con las mismas técnicas que las utilizadas en Gochu Asturcelta en la estirpe Torbiscal de cerdo ibérico dieron mayores valores de tamaño efectivo tanto cuando se calcularon por incremento individual en consanguinidad ($N_e F_i$), que variaron entre 57,6 y 64,8 entre las generaciones 21 y 28, como por incrementos individuales en coascendencia ($N_e C_{ij}$) en que variaron de 59,0 a 71,0 (Silió *et al.* 2016). En todo caso, los valores de tamaño efectivo calculados para las últimas generaciones criadas en “El Dehesón del Encinar” suponen entre el 56% y el 70% del censo de los 102 fundadores de la población mientras que el tamaño efectivo calculado para el Gochu Asturcelta siempre fue superior al censo de los fundadores de las poblaciones de referencia analizadas. Si bien en el profundo pedigrí de “El Dehesón del Encinar” han podido acumularse a lo largo del tiempo sucesos de deriva que tienen reflejo en el tamaño efectivo, se puede concluir que una política de cría bien planificada puede tener un efecto positivo en la conservación de la variabilidad genética fundadora (Royo *et al.* 2007; Silió *et al.* 2016).

7.2.3. Importancia para el programa de conservación

El análisis del pedigrí del Gochu Asturcelta permite asegurar que la política de apareamientos llevada a cabo por ACGA ha permitido evitar la aparición de un cuello de botella como consecuencia de la instrumentación del programa de conservación. Es claro que se han producido pérdidas de variabilidad genética por deriva, como demuestran los valores calculados para el tamaño efectivo de fundadores (f_e) y el equivalente a genomas fundadores (f_g). De los seis fundadores que constituyeron la población base, dos no tuvieron un éxito reproductivo real por causas no achacables a la política de conservación (Argamentería y Menéndez 2012), lo que explica parcialmente los valores de f_e . Sin embargo, el cociente f_g/f_e sugiere que en la población presente las pérdidas por deriva pueden ser del 40% de la variabilidad representada por los fundadores que dejaron descendencia viable. La política de apareamientos ha sido claramente restrictiva de los

apareamientos entre parientes cercanos como sugiere el parámetro F_{IS} , equivalente al parámetro α de Caballero y Toro (2000), que es fundamentalmente cero para el pedigrí completo (0,008) y para los animales más jóvenes seleccionados para reproductores (- 0,007; PopR). Para el pedigrí completo, el parámetro F_{IS} sugiere que los apareamientos no se desvían sustancialmente del azar a pesar de los apareamientos entre hermanos completos que sucedieron accidentalmente en el inicio del Programa de Conservación (Menéndez *et al.* 2015). Sin embargo, aunque los valores estimados de $N_e F_i$ y $N_e C_{ij}$ son cercanos, el cociente $N_e C_{ij} / N_e F_i$ es mayor de 1 lo que podría sugerir la existencia de cierto grado de subdivisión de la población (Cervantes *et al.* 2011) y cuestionaría el efecto de la política de apareamientos. Un análisis pormenorizado del pedigrí permitió conocer que el pedigrí del Gochu Asturcelta se deriva de dos familias de reproductores (*L'Utiru x La Preñá* y *Machu x Fema 2*) mientras que hay una fundadora que no se encuentra bien representada en el pedigrí completo. Desde que Ballou y Lacy (1995) sugirieron que desequilibrar las contribuciones para la siguiente generación a favor de individuos concretos, en casos en que la representación de ciertas líneas de fundadores tuviera mucho mayor representación que otras en la población presente, podría contribuir al mantenimiento de la variabilidad genética de una población, esta estrategia se ha propuesto para su aplicación en otras razas asturianas en riesgo (Goyache *et al.* 2003; Royo *et al.* 2007; Álvarez *et al.* 2008). ACGA ha seleccionado dos machos descendientes de la fundadora 9003 *Fema 1* para su inclusión en el Núcleo de Multiplicación de la raza y fomentar su representación en la población presente.

En todo caso, la política de apareamientos de ACGA si parece haber evitado la aparición de un cuello de botella por utilización abusiva para reproducción de individuos concretos, no necesariamente fundadores. Con raras excepciones (Álvarez *et al.* 2011), los programas de conservación se suelen iniciar con un número de individuos relativamente reducido que sufren un notable cuello de botella tras la puesta en marcha del sistema de cría, muchas veces provocado por la selección de características de tipo consideradas deseables (Royo *et al.* 2007; Álvarez *et al.* 2008). Resulta

sorprendente que el cociente f_a/f_e sea igual a 1 en las poblaciones de referencia y superior a 1 en el pedigrí completo. De hecho, para el pedigrí completo, se pudieron identificar como ancestros que explicaban el 100% de la variabilidad de la población hasta 10 animales, incluyendo 4 fundadores y 6 de sus descendientes (ver Tabla 3 de Menéndez *et al.* 2016a). Parece claro que la política de apareamientos de ACGA ha impedido que la variabilidad genética de algunos reproductores se resumiera en uno de sus descendientes y que, a pesar del peso reproductivo de los animales no fundadores identificados como ancestros, los fundadores conservaron cierto grado de contribución marginal en el pedigrí analizado siendo identificados, a su vez, como ancestros en términos de Boichard *et al.* (1997). El parámetro nf_e caracteriza la pérdida de variabilidad debida a la segregación mendeliana producida en los apareamientos (Caballero y Toro 2000). Nuevamente, el cociente nf_e/f_e tendió a ser superior a 1 lo que sugiere que la política de apareamientos aplicada, que incluía el mantenimiento de la carrera reproductiva de los animales del Núcleo de Multiplicación tanto como fuera posible y el cruzamiento de estos animales con sus descendientes hasta dos generaciones más tarde, ha contribuido a minimizar las pérdidas de variabilidad genética por deriva.

7.3. Relaciones genéticas de la raza porcina Gochu Asturcelta en el contexto ibérico

En el tercero de los trabajos asociados a la presente Memoria (Menéndez *et al.* 2016b) se ha profundizado en la caracterización molecular de la población de Gochu Asturcelta mediante marcadores moleculares neutros. Este trabajo pretendía, por una parte, contribuir al conocimiento de la raza proporcionando una documentación suficiente sobre su fondo genético y las relaciones genéticas con las poblaciones porcinas de su entorno y, por otra parte, aportar información que permitiera discernir si la clasificación tradicional de las poblaciones porcinas de la península ibérica en cerdo celta e ibérico (Aparicio 1944; Sotillo y Serrano 1985) tiene alguna base genética. La morfología de la raza la asimila a las poblaciones porcinas

del norte y centro de Europa (Santos e Silva et al. 2008; Sotillo y Serrano 1985) lo que sugeriría la existencia de un origen común con esos cerdos. Las poblaciones de cerdo celta de la península ibérica resultarían de las migraciones indoeuropeas hacia la Península, mientras que el cerdo de estirpe ibérica sería el descendiente del cerdo preexistente en el territorio (Aparicio 1944; Sotillo Serrano, 1985).

Se analizaron 17 marcadores de tipo microsatélite (SW936, S0155, S0225, S0101, S0090, SW240, SW857, S0071, IGF1, S0026, SW911, S0226, S0227, SW951, SW632, S0002, S0005) en 137 individuos de raza Gochu Asturcelta, 9 cerdos de raza Celta de Galicia, 14 Bísaros, 20 Alentejanos, 12 de raza Ibérica, 25 Hampshire, 13 Landrace, 23 Large White y 21 jabalíes obtenidos en diferentes provincias del noroeste de España. Para tener en cuenta el efecto de la deriva producida tras la puesta en marcha del programa de cría, los animales de raza Gochu Asturcelta se dividieron en dos poblaciones: a) “inicial”, incluyendo 31 individuos nacidos antes de 2005 (entre ellos 3 fundadores) con amplia carrera reproductiva en el Núcleo de Multiplicación de la raza (Menéndez *et al.* 2016); y b) “presente”, incluyendo 124 individuos nacidos en 2009. Los individuos de raza Celta de Galicia y Bísara se incluyeron en un grupo “celta” de la península ibérica. Asimismo, los individuos de estirpe ibérica y los de las razas mejoradas se agruparon para su análisis en las poblaciones “ibérica” y “cosmopolita”.

Asimismo, se secuenció un fragmento de 647 pares de bases de la región de control de la replicación del ADN mitocondrial en la población “inicial” de Gochu Asturcelta, 21 jabalíes y los animales disponibles de raza Celta de Galicia, Bísara, Alentejana e Ibérica junto con 12 individuos Landrace y 3 Large White y las 44 secuencias (7 Duroc, 26 Ibéricos, 2 Landrace, 2 Large White y 7 jabalíes) previamente analizadas por Alves *et al.* (2003) para proceder a una correcta asignación de las secuencias obtenidas a los grupos haplotípicos descritos por Larson *et al.* (2005).

7.3.1. Resultados obtenidos

La información proporcionada por los microsatélites permitió conocer que las dos poblaciones de Gochu Asturcelta presentaron los mayores valores de diferenciación con los otros grupos de cerdos con valores de F_{ST} que variaron desde $0,095 \pm 0,008$ a $0,153 \pm 0,014$ entre los pares formado por la población presente de Gochu Asturcelta y los cerdos cosmopolitas y entre la población inicial de Gochu Asturcelta y los cerdos de estirpe ibérica, respectivamente. Sin embargo, las dos poblaciones de Gochu Asturcelta presentaban una diferenciación muy escasa ($F_{ST} = 0,021 \pm 0,005$). Además, las dos poblaciones de Gochu Asturcelta presentaron los valores más bajos de diversidad tanto para heterocigosis esperada ($0,560 \pm 0,025$ y $0,556 \pm 0,014$) como para número medio de alelos por locus ajustado por el tamaño muestral (3,1 y 2,9), siendo siempre más bajos en la población presente. La población de jabalí presentó los valores más altos para esos dos parámetros ($0,717 \pm 0,031$ y 4,2, respectivamente). Aunque en el total de la muestra analizada se encontró un valor positivo y alto de F_{IS} ($0,082 \pm 0,016$), la población inicial de Gochu Asturcelta presentó el único valor negativo, aunque con una gran desviación típica, de F_{IS} ($- 0,024 \pm 0,047$), lo que sugiere la presencia de un exceso de heterocigotos, y la población presente tuvo un valor de F_{IS} cercano a 0 ($0,011 \pm 0,037$). Análisis bayesianos realizados mediante el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) permitieron asignar cada uno de los grupos porcinos analizados (Gochu Asturcelta, cerdo celta ibérico, cerdo ibérico, cerdo cosmopolita y jabalí) a su propio grupo (*cluster*) genético, aunque se encontró cierta estructura en el cerdo cosmopolita, formados por tres razas distintas, cuyos individuos se incluyeron en dos *clusters* diferentes, y, sorprendentemente, en el Gochu Asturcelta con un porcentaje significativo de individuos (25,3%) de la población presente que se agruparon separadamente a los demás individuos de la raza.

Las 174 secuencias de ADN mitocondrial analizadas permitieron identificar 30 haplotipos. Las nuevas secuencias obtenidas en Menéndez *et al.* (2016b) no incluyeron ningún haplotipo de origen asiático. El jabalí presentó los mayores valores de diversidad haplotípica y nucleotídica

(0,854 y 0,00329, respectivamente) mientras que el Gochu Asturcelta presentó los menores valores (0,443 y 0,00071, respectivamente). En este sentido, el Gochu Asturcelta solo presentó tres haplotipos, siendo el mayoritario H5 (71% de las muestras), uno de ellos solo presente en un macho fundador (H12), y con dos de las tres líneas maternas fundadoras compartiendo el haplotipo minoritario (H3).

Análisis de redes (Bandelt *et al.* 1999) permitieron asignar las filogenias de las secuencias obtenidas a los grupos haplotípicos descritos por Larson *et al.* (2005). Todas las poblaciones porcinas testadas presentaron secuencias que pudieron asignarse a las dos superfamilias haplotípicas más frecuentes en cerdo europeo: A y C. En todo caso, la mayor parte de las secuencias de cerdos celtas y cosmopolitas pertenecían a la superfamilia A, más frecuente en cerdo centroeuropeo, mientras que la mayor parte de las secuencias de jabalíes y cerdo ibérico pertenecían a la superfamilia C, más frecuente en la península ibérica y norte del Magreb (Larson *et al.* 2005; Ramírez *et al.* 2009). El Gochu Asturcelta estuvo representado tanto en la superfamilia A (H5) como en la C (H3). Las frecuencias haplotípicas de las poblaciones de cerdo autóctono de la península ibérica se analizaron mediante un análisis factorial. Se identificaron dos componentes principales con autovalor mayor de 1 que explicaban, respectivamente, el 40,02% y el 27,05% de la variabilidad. El primer factor sugería la existencia de una variabilidad propia de las razas porcinas portuguesas mientras que el segundo factor tendía a agrupar la variabilidad del Gochu Asturcelta y el cerdo Celta de Galicia.

7.3.2. Relaciones genéticas y diferenciación del Gochu Asturcelta con las poblaciones porcinas de su entorno

Durante la preparación del programa de conservación del Gochu Asturcelta se realizaron análisis preliminares que pretendían evaluar el grado de diferenciación de la raza respecto de las poblaciones más relacionadas con ella desde el punto de vista geográfico o histórico. Para ello se genotiparon con una batería de 9 microsatélites 39 individuos de

Gochu Asturcelta, 34 de raza Bísara, 21 cerdos de raza ibérica y Alentejana y 10 cerdos de diferentes razas mejoradas (Royo *et al.* 2004, 2008). Aunque los análisis sugerían una clara diferenciación de los cerdos de estirpe celta y centro europeo de los de estirpe ibérica y una ligera diferenciación del Gochu Asturcelta de las poblaciones Bísara y de cerdos mejorados, los resultados no eran concluyentes lo que podía deberse a la utilización de una batería de microsatélites insuficiente y a un muestro poco representativo. En concreto, los análisis preliminares realizados no permitían conocer si la diferenciación genética del Gochu Asturcelta se debía a causas reales o un simple efecto resultante de la gran identidad genética de los individuos de la raza. Además, una batería de microsatélites podía resultar insuficiente para identificar grupos genéticos que permitieran asignar claramente al Gochu Asturcelta a una estirpe concreta de cerdo en la península ibérica. Para solventar estos problemas se procedió a utilizar un mayor número de marcadores de tipo microsatélite ya puestos a punto en el laboratorio del SERIDA (Menéndez *et al.* 2015), aumentar la muestra analizada y utilizar marcadores mitocondriales para incrementar la resolución del estudio.

El análisis de dos poblaciones diferentes, inicial y presente, de Gochu Asturcelta ha permitido establecer que la diferenciación del Gochu Asturcelta respecto de otras poblaciones de cerdo celta ibérico encontrada previamente (Royo *et al.* 2004, 2008) se debe a la escasa variabilidad genética de la raza. Aunque los resultados obtenidos pueden estar sesgados al comparar dos poblaciones muy homogéneas de Gochu Asturcelta con poblaciones (celta, cosmopolita e ibérica) que incluían individuos de varias razas porcinas, aumentando artificialmente la variabilidad dentro de esos grupos, la diferenciación genética encontrada para el Gochu Asturcelta difícilmente puede ser por sí misma un argumento que justifique su conservación. La discusión de si se debe conservar preferentemente aquellas poblaciones ganaderas en riesgo que hayan sufrido grandes cuellos de botella y presenten en la actualidad una gran identidad genética o poblaciones más diversas que mantengan cierta variabilidad genética que permita implantar en el futuro programas de selección está lejos de

resolverse (Toro 2002). La población de Gochu Asturcelta, a pesar de su pequeño censo efectivo y alta consanguinidad (Menéndez *et al.* 2016a) presenta buenas características reproductivas en libido, fertilidad, prolificidad, características maternas y supervivencia de los lechones (Argamentería y Menéndez 2012). Si la identidad genética de la raza Gochu Asturcelta hubiera significado una fijación de alelos favorables para esos caracteres, u otros como la calidad de carne, las distancias genéticas encontradas supondrían un argumento a favor de su conservación.

Los análisis bayesianos no identificaron grupos genéticos que apoyaran la división de las poblaciones porcinas autóctonas de la península ibérica en estirpes celta e ibérica. Este tipo de análisis suelen experimentar dificultades para identificar poblaciones (*clusters*) ancestrales a las que asignar los genotipos disponibles cuando no hay una clara diferenciación entre poblaciones o se ha producido flujo de genes entre las poblaciones analizadas en tiempos recientes en términos evolutivos (Pritchard *et al.* 2000). Sin embargo, el ADN mitocondrial tampoco ha permitido clarificar este aspecto. Si bien el hecho de que la mayor parte de los cerdos ibéricos y jabalíes testados se asignen a la superfamilia haplotípica C y la mayor parte de los cerdos célticos se asignen a la superfamilia haplotípica A no permite rechazar la hipótesis clásica que considera al cerdo de estirpe ibérica como el representante de la población porcina ancestral de la península y al cerdo de estirpe celta como una población migrante del centro de Europa (Aparicio 1944; Sotillo Serrano, 1985), la presencia de secuencias de tipo A y C en todas las poblaciones analizadas no permite confirmarla. De hecho, el análisis de componentes principales realizado sugiere que la composición de ADN mitocondrial de las poblaciones analizadas refleja fundamentalmente la historia reciente de las poblaciones más que su origen ancestral: las razas portuguesas y españolas han debido tener manejos y flujos genéticos diferenciados y las dos razas porcinas célticas españolas (Gochu Asturcelta y Celta de Galicia) son las que han experimentado mayores cuellos de botella poblacionales. En todo caso existen causas que explican la presencia cruzada de secuencias de tipo A y C en cerdos de estirpes céltica e ibérica, e incluso jabalí: a) hasta los años 50

del siglo pasado, las poblaciones de cerdo celta eran mayoritarias en España y Portugal y se usaban como mejoradores de las poblaciones de cerdos ibérico manejadas en el suroeste peninsular (Aparicio 1944); b) durante la segunda parte del siglo XX se han realizado cruzamientos dirigidos de cerdo ibérico con razas centroeuropeas, especialmente Duroc, que pueden haber aportado secuencias mitocondriales de tipo A (Alves *et al.* 2003); y c) la liberación inapropiada de poblaciones comerciales de cerdos ha podido ocasionar la introgresión de secuencias de tipo A en poblaciones de jabalí de amplias zonas de España (van Asch *et al.* 2012).

7.3.3. Importancia para el programa de conservación

Aunque este trabajo pretendía, fundamentalmente, documentar las relaciones genéticas del Gochu Asturcelta con las poblaciones porcinas de su entorno, de su realización se han derivado otras informaciones de interés para evaluar la ejecución del programa de conservación.

Las dos poblaciones, inicial y presente de Gochu Asturcelta presentaron bajos valores de F_{IS} . La presencia de valores negativos de F_{IS} , que caracteriza un exceso de heterocigotos, en la población inicial ($-0,024 \pm 0.047$) es típica de los inicios de un programa de conservación cuando se incluyen en el esquema de cría fundadores de distintas procedencias que han experimentado sus particulares cuellos de botella y fijado diferentes alelos (Álvarez *et al.* 2008). Por otro lado, el hecho de que la población presente un valor F_{IS} no diferente de 0 (0.011 ± 0.037), unido a la muy escasa diferenciación genética entre ambas poblaciones de Gochu Asturcelta sugiere que la política de apareamientos puesta en marcha por ACGA que evita cruzamientos entre animales muy emparentados ha sido capaz de mantener las frecuencias alélicas estables entre años y generaciones aunque el parentesco genealógico haya aumentado (Royo *et al.* 2007). Esto se testó calculando el parámetro molecular correspondiente al equivalente a genomas fundadores (f_g), como la inversa del doble de la coascendencia molecular (Caballero y Toro 2002), tras corregir los valores de

coascendencia por tamaño muestral (Cervantes *et al.* 2011b). Este parámetro presentó prácticamente el mismo valor para la población inicial (1,14) y para la población presente (1.13) lo que sugiere que la ejecución del programa de cría no ha producido pérdidas adicionales de variabilidad genética por deriva tras los momentos iniciales del programa de conservación.

7.4. Utilidad de la información molecular en la estimación del tamaño efectivo en poblaciones ganaderas

En el cuarto de los trabajos asociados a la presente Memoria (Menéndez *et al.* 2016c) se ha testado la utilidad de métodos basados en información molecular para monitorizar la capacidad evolutiva de la raza de Gochu Asturcelta, evaluada en términos de tamaño efectivo de la población. La extremadamente pequeña población fundadora del programa de conservación (Argamenteoría y Menéndez 2012) y la constatación práctica de que, aunque contenidas, se han producido pérdidas de variabilidad genética desde el inicio del programa de cría de la raza (Menéndez *et al.* 2016b,c) hizo pensar en testar ese tipo de métodos (Goyache *et al.* 2011) que pudieran aportar información adicional útil para el programa de conservación. Aunque la raza de Gochu Asturcelta dispone de genealogías suficientes para monitorizar la población (Menéndez *et al.* 2016b), todavía el pedigrí es poco profundo y estimas de tamaño efectivo obtenidas con diferentes metodologías pueden contribuir a una monitorización efectiva de la variabilidad genética de la población (Cervantes *et al.* 2011b).

El Gochu Asturcelta constituye una población singular en la que testar estas metodologías, que se ven afectadas por numerosas fuentes de sesgo (England *et al.* 2006; Luikart *et al.* 2010; Waples y Do 2010; Goyache *et al.* 2011; Jorde y Ryman 2007). Las fuentes de sesgo que presentan más dificultades de solución en poblaciones reales con generaciones solapadas son las relacionadas con la no independencia de las muestras genotipadas, con la presencia de parientes de diversas generaciones en las diferentes

cohortes anuales y la dinámica demográfica de cada población que condiciona la representatividad de las muestras obtenidas (Jorde y Ryman 1995, 1996; Goyache *et al.* 2011; Waples *et al.* 2011, 2013). La particular política de apareamientos y estructura demográfica del Gochu Asturcelta (Menéndez *et al.* 2015, 2016b) permitía identificar individuos con pedigrí con generaciones solapadas y generaciones discretas en las mismas cohortes anuales. Las cohortes anuales formadas por individuos con padre y madre conocidos inscritas en el Libro Genealógico del Gochu Asturcelta entre los años 2006 y 2010 incluían 2.248 registros. De 780 de esos individuos se disponía de genotipos correspondientes a 17 marcadores microsatélites. De los 2.248 individuos registrados, 216 (191 con genotipo) disponían de tres generaciones discretas en su pedigrí (F_3), resultado de cruces $F_2 \times F_2$, y 147 (133 con genotipo) de cuatro generaciones discretas (F_4 ; cruces $F_3 \times F_3$). El resto de los animales disponibles en el periodo 2006-2010 (1.885 de los que 456 tenían genotipo) presentaban generaciones solapadas en su pedigrí. En conjunto, las cohortes anuales tenían una profundidad media de pedigrí que variaba entre $2,7 \pm 0,7$ (año 2006) y $4,7 \pm 0,6$ (año 2010) equivalentes a generaciones discretas. Esta singular estructura demográfica permitía testar el rendimiento de diferentes métodos de estimación del tamaño efectivo de la población basados en información molecular y contrastarlos con las estimas genealógicas.

7.4.1. Resultados obtenidos

Siguiendo un trabajo anterior (Menéndez *et al.* 2016a), se han calculado los tamaños efectivos genealógicos mediante incrementos individuales de consanguinidad ($N_e F_i$) y coascendencia ($N_e C_{ij}$), utilizando el programa ENDOG v4.8 (Gutiérrez y Goyache 2005), para compararlos con los obtenidos a partir de una única muestra mediante desequilibrio de ligamiento ($N_{e(LD)}$) y coascendencia molecular ($N_{e(M)}$), utilizando el programa NeEstimator (Do *et al.* 2014). Como contraste añadido de los métodos moleculares basados en una muestra única se calcularon tamaños efectivos mediante el método temporal propuesto por Jorde y Ryman (2007)

utilizando también el programa NeEstimator. Los ajustes demográficos se realizaron tras calcular el cociente N_b/N_e con el programa AgeNe (Waples *et al.* 2011, 2013) y el factor de corrección C con el programa factorC (<http://folk.uio.no/ejorde/software/factorc.zip>).

Las estimas de $N_e F_i$ y $N_e C_{ij}$ fueron muy similares para F_3 y F_4 , variando entre $5,0 \pm 0,8$ y $5,6 \pm 0,3$, independientemente de la frecuencia alélica mínima considerada. Para cada cohorte anual, las estimas tendieron a crecer con la profundidad de pedigrí, especialmente en el caso de $N_e C_{ij}$, siendo el cociente $N_e C_{ij} / N_e F_i$ de 1,39 en el año 2010 mientras que este cociente fue de 1, en términos prácticos para F_3 y F_4 . Tras ajustar por sesgo demográfico (cociente N_b/N_e de 0,667), las estimas de $N_{e(LD)}$ fueron de, aproximadamente 17,0 para F_3 y F_4 . Estas estimas fueron similares a las obtenidas en las cohortes anuales que tenían un tamaño muestral grande. Sin embargo, con tamaños muestrales mas reducidos las estimas de $N_{e(LD)}$ obtenidas fueron sesgadas. En todo caso, antes del ajuste por la estructura demográfica de la población las estimas estuvieron claramente sesgadas hacia arriba. Realizando estimas de $N_{e(LD)}$ utilizando cohortes bianuales que pretendían representar el intervalo generacional medio (Menéndez *et al.* 2016a) en la forma recomendada por Waples *et al.* (2013, 2014), los resultados obtenidos, aunque corregidos por demografía, se sesgaron hacia arriba variando entre 20,0 y 24,2. Los valores de $N_{e(M<<f)}$ fueron menores que los de $N_{e(LD)}$ pero siguieron un patrón similar, ya que menores valores de coascendencia molecular media en la población considerada se correspondieron, en general, con menores valores de \hat{F}^2 . Las estimas de N_e obtenidas mediante el método temporal de Jorde y Ryman (2007) se corrigieron multiplicándolas por un valor de 2,23, correspondiente al cociente C/G . Las estimas obtenidas entre muestras correspondientes a dos cohortes anuales sucesivas mostraron grandes variaciones (de 13,4 a 33,0) sugiriendo que la señal de deriva entre los nacidos en años sucesivos era escasa. Cuando las estimas se calcularon entre muestras separadas tres años los valores obtenidos fueron más estables (entre 23,6 y 25,8) y similares a las estimas de $N_{e(LD)}$ obtenidas con cohortes bianuales.

7.4.2. Utilidad de las estimas moleculares del tamaño efectivo en pedigrís con generaciones solapadas

Incluso cuando se consideran generaciones discretas, las estimas de N_e basados en información molecular son mayores que las obtenidas mediante información genealógica (Goyache *et al.* 2011). Aunque la información genealógica se refiere a un número infinito de loci en la población ideal y, al menos, se asume que en poblaciones finitas todos los fundadores aportan a la población alelos diferentes para cada loci (Falconer y MacKay 1996), la información molecular se refiere a un número finito de loci que en la población fundadora pueden ser idénticos por estado (Baumung y Sölkner 2003), lo que hace que los resultados obtenidos utilizando ambas metodologías no sean directamente comparables. Silió *et al.* (2016), analizando dos líneas cerradas de cerdo ibérico, manejadas con políticas de apareamientos de mínima coascendencia y profundidades de pedigrí entre las 24 y 28 generaciones, encuentran que las estimas de N_e calculadas teniendo en cuenta la homocigosis o coascendencia molecular observada en genotipos obtenidos mediante Chips SNPs de media densidad tienden a ser superiores que las correspondientes estimas genealógicas de $N_e F_i$ y $N_e C_{ij}$.

Las estimas de $N_{e(LD)}$ calculadas para las dos poblaciones con generaciones discretas en su pedigrí, F_3 y F_4 , son, al menos, tres veces superiores a las estimas genealógicas. Sin embargo, son siempre menores y más estables que las obtenidas en cohortes con generaciones solapadas en su pedigrí. Este hecho sirve para confirmar que las asunciones de los métodos basados en desequilibrio de ligamiento solo se aplican directamente a generaciones discretas (Hill 1981; Waples 1991). En casos de generaciones solapadas el desequilibrio de ligamiento creado en las generaciones precedentes que no se ha perdido por recombinación y el nuevo desequilibrio de ligamiento creado en la última generación refleja diferentes N_e . Las estimas de $N_{e(LD)}$ obtenidas pueden presentar sesgos hacia arriba o hacia abajo durante algunas generaciones (Waples 2005; Waples *et al.* 2014). Por otra parte, en casos de generaciones solapadas no puede asumirse que las muestras obtenidas en una cohorte anual sean

independientes. Aunque el caso del Gochu Asturcelta es extremo, con una gran cantidad de hermanos completos en cada cohorte anual, la presencia de parientes cercanos en las muestras genotipadas hace que el desequilibrio de ligamiento observado supere las estimas obtenidas a partir de información demográfica asumiendo que no existe selección y tamaño de población constante (Waples *et al.* 2014). Por lo tanto, las estimas de $N_{e(LD)}$ calculadas tendrán un sesgo que solo puede corregirse teniendo en cuenta la estructura demográfica de la población. La utilización de muestras que incluyan un ámbito temporal similar al intervalo generacional medio contribuye a homogeneizar el número de reproductores que producen las cohortes analizadas evitando que se produzcan sesgos súbitos en la estructura familiar de las muestras que forman cohortes anuales (Menéndez *et al.* 2016c; Waples *et al.* 2014).

Las estimas obtenidas por métodos diferentes al desequilibrio de ligamiento también presentan dificultades para su interpretación. El método basado en coascendencia molecular ($N_{e(M)}$) propuesto por Nomura (2008) sería, aparentemente, superior al basado en desequilibrio de ligamiento al producir, con una sola muestra, estimas más cercanas a la genealógicas que las estimas correspondientes de $N_{e(LD)}$. Sin embargo, las estimas desequilibrio de ligamiento y coascendencia molecular observadas en la misma cohorte no son independientes (Miller *et al.* 2015) y, en consecuencia, las limitaciones del método $N_{e(LD)}$ serían directamente aplicables a las estimas de N_e basadas en coascendencia molecular. Además, puede haber confusión entre el concepto de $N_{e(M)}$ y el parámetro equivalente a genomas fundadores que se calcula como la inversa del doble de la coascendencia molecular media de la cohorte analizada (Caballero y Toro 2002). Esos dos parámetros caracterizan distintos aspectos de la población (Menéndez *et al.* 2016a), su capacidad evolutiva y las pérdidas de variabilidad genética producidas por todas las causas de deriva, respectivamente, y confundirlas puede llevar a conclusiones equivocadas. Es necesario señalar que los diferentes valores que se obtendrían en las estimas de $N_{e(M)}$ (Nomura 2008) y equivalentes a genomas fundadores (Caballero y Toro 2002) se debe, fundamentalmente, a diferencias de

cálculo ya que $N_{e(M)}$ no considera las autocoascendencias (Nomura 2008). Asimismo, las estimas de N_e obtenidas mediante métodos temporales, en poblaciones con generaciones solapadas, parecen ser muy dependientes del intervalo entre muestras (Barker 2011; Waples y Yokota 2007). Goyache *et al.* (2011) sugerían que los métodos temporales tenían mejor rendimiento según el intervalo entre muestras se aproximaba al intervalo generacional. Los resultados obtenidos en Gochu Asturcelta sugieren que el intervalo necesario entre muestras puede ser dependiente de la estructura demográfica de la población: en casos de generaciones solapadas con un gran número de parientes cercanos en las muestras consideradas, el intervalo entre muestras necesario para captar la deriva genética de la población puede superar el intervalo generacional (Menéndez *et al.* 2016c).

7.4.3. Importancia para el programa de conservación

El inicio del Programa de Conservación del Gochu Asturcelta, con solo seis fundadores, se realizó en una situación que solo puede calificarse como de emergencia (Argamentería y Menéndez 2012). En esta situación, la monitorización de la población para evitar pérdidas no accidentales de variabilidad genética y permitir su viabilidad era un requisito. En el inicio del programa, con un número reducido de reproductores y ganaderías, el seguimiento genealógico se ha demostrado como una herramienta eficaz para preservar, en la medida de lo posible, el patrimonio genético del Gochu Asturcelta (Menéndez *et al.* 2016a). Sin embargo, el éxito del programa conducirá, a medio plazo, a un aumento del número de ganaderías y reproductores implicados y, de forma inevitable, a una menor calidad de la recogida de información genealógica. Una mayor dispersión geográfica de las ganaderías dificultará el movimiento de reproductores necesario para el mantenimiento de la política de apareamientos de ACGA. En esa situación, era clara la necesidad de disponer de herramientas diferentes a las genealógicas para la monitorización de la población (Cervantes *et al.* 2011; Goyache *et al.* 2011).

En todo caso, la interpretación de los resultados de los métodos para la estima del tamaño efectivo de la población basados en información molecular deben ser interpretados con precaución, siendo conscientes de las siguientes variables:

La muestra analizada debe tener un tamaño suficiente y representativo de la población a riesgo de obtener estimas muy sesgadas.

La presencia de generaciones solapadas en el pedigrí exige que cualquier estima se corrija por el sesgo producido por la particular demografía de la población.

La presencia de parientes cercanos en las muestras obtenidas puede producir un sesgo importante en las estimas, especialmente en muestras pequeñas.

El intervalo temporal que se utilice para definir la cohorte a analizar es un factor crítico y su definición dependerá de la estructura demográfica y genética de la población.

Aunque muchos trabajos científicos han hecho hincapié en la necesidad de disponer de suficiente número de marcadores para evitar sesgo en las estimas (Waples 2006; England *et al.* 2006), especialmente en caso de tamaños muestrales pequeños, este requerimiento tiene menor importancia en poblaciones de animales domésticos donde el número de marcadores disponibles supera con mucho los necesarios para este fin (Antão *et al.* 2010). En todo caso, la necesidad de disponer de un mayor número de marcadores se resolvería fácilmente, salvo por su coste económico, mediante la utilización de Chips comerciales de SNPs, que en la especie porcina son de densidad media (60 k SNP BeadChip de Illumina; Ramos *et al.* 2009; Ramayo-Caldas *et al.*, 2010; Burgos-Paz *et al.* 2013; Silió *et al.* 2016), pero el resto de las limitaciones expuestas anteriormente se mantendrían.

En conjunto, las estimas de tamaño efectivo molecular pueden considerarse útiles sólo para la población considerada siempre que se conozca suficientemente la estructura demográfica y genética de la misma y se dispongan de estimas suficientes a lo largo del tiempo para evaluar las fuentes de sesgo. En todo caso, la pretendida ventaja de los métodos de estimación del tamaño efectivo de una población mediante información molecular, la necesidad de disponer de una sola muestra o de muestras obtenidos en un periodo de tiempo corto, no sería relevante en términos de gestión de la población, especialmente en casos de especies con intervalo generacional largo.

7.5. Perspectivas de futuro

Esta Memoria es una contribución al conocimiento del cerdo de raza Gochu Asturcelta. La conservación de las razas autóctonas asturianas es importante desde el punto de vista cultural (Álvarez Sevilla 2001, 2005) pero, más allá del impulso inicial de conservacionistas entusiastas y administraciones públicas el programa de conservación solo será un éxito sostenido en el tiempo si la sociedad percibe que de la raza se desprenden resultados de interés general. Por supuesto, deben existir iniciativas que permitan poner en el mercado un producto de calidad apreciado por los consumidores, diferenciado de los productos obtenidos de razas comerciales y firmemente protegido de los, por desgracia, habituales fraudes al consumidor, pero no deben dejarse de lado las posibilidades de que la sociedad perciba que una población en riesgo puede ser útil para el avance científico.

De los trabajos realizados en esta Memoria se desprende la necesidad de mantener la monitorización de la variabilidad genética en una población que presenta una estructura singular entre las poblaciones ganaderas no experimentales: se deriva de un número muy reducido de fundadores y contiene individuos que presentan en su pedigrí tanto generaciones discretas como solapadas.

El número de fundadores de la población de Gochu Asturcelta es muy reducido. En esa situación, los análisis genealógicos que asumen que todos los fundadores aportan alelos diferentes a la población pueden dar idea de la existencia de una variabilidad genética mínima que puede no existir. Como ejemplo, los análisis de ADN mitocondrial sugieren que el número de haplotipos de ADN mitocondrial presentes en la raza es menor que el de líneas maternas fundadoras (Menéndez *et al.* 2016b). Así, es urgente profundizar en el conocimiento de la variabilidad genética de la raza con la utilización de las mejores herramientas disponibles, particularmente Chips de SNPs como el 60 k SNP BeadChip de Illumina (Ramos *et al.* 2009; Silió *et al.* 2016).

La utilización de Chips de SNPs de media o alta densidad permitiría profundizar en las metodologías para monitorizar el tamaño efectivo de la población mediante homocigosis y coascendencia molecular (Silió *et al.* 2016), la determinación de segmentos cromosómicos homocigóticos (*Runs Of Homozygosity*; ROH; ver Curik *et al.* para una revisión) y la utilización de desequilibrio de ligamiento entre loci ligados utilizando modelos más complejos que puedan tener en cuenta otras fuentes de variación como las tasas de mutación, fase o recombinación (Corbin *et al.* 2012; Barbato *et al.* 2015).

La necesidad de estas actuaciones, unidas a la estructura demográfica del Gochu Asturcelta ofrece una oportunidad única de profundizar en estos aspectos. Con la generalización del uso de los marcadores moleculares se han realizado numerosos trabajos tendentes a diferenciar en qué grado la homocigosis de los individuos se debe realmente a la consanguinidad producida por el sistema de apareamientos: la autocigosis en términos de Cotterman (1940; Ballonoff 1974). En un estudio de simulación, Baumung y Sölkner (2003) propusieron estimar la autocigosis como una desviación de la heterocigosis esperada en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg

como
$$a = \frac{1}{n} \sum_{L=1}^n \left(1 - \frac{H_{oL}}{H_{eL}} \right)$$
 donde H_{oL} y H_{eL} son, respectivamente la heterocigosis observada y esperada para un locus L (para $L = 1, 2, 3, \dots, n$).

En estudios sobre genotipos reales (Zavarez *et al.* 2015), la autocigosis se ha estimado mediante la longitud de los segmentos cromosómicos

homocigotos (ROH) como $F_{ROH} = \frac{\sum_{j=1}^n L_{ROH}}{L_{total}}$ (McQuillan *et al.* 2008),

donde L_{ROH} es la longitud del segmento cromosómico homocigótico j y L_{total} es la longitud total del genoma genotipado o calculando los elementos de la diagonal de la matriz de relaciones genómicas (VanRaden, 2008; VanRaden *et al.*, 2011).

Baumung y Sölkner (2003) realizaron sus simulaciones asumiendo que se conocen los genotipos de los animales fundadores y que estos animales sólo son homocigotos por estado y no por descendencia, lo que no sucede en poblaciones reales en que, normalmente, el genoma de la población fundadora no se conoce. En el Gochu Asturcelta se puede calcular la identidad por estado de los genomas fundadores permitiendo conocer, por observación directa, los incrementos en homocigosis o segmentos homocigóticos debidos a identidad por descendencia.

Por otra parte, la existencia de numerosas familias de hermanos completos con padres con muestra de ADN disponible (Menéndez *et al.* 2016a,c) permitiría estimar tasas de mutación para SNPs situados en diferentes zonas del genoma de forma directa. En este sentido, cabe destacar que las estimas más utilizadas de las tasas de mutación para microsatélites en una especie ganadera se obtuvieron con un pedigrí que comprendía un total de 127 individuos y 246 loci (Crawford y Cuthbertson 1996).

Los trabajos incluidos en la presente Memoria contribuyen a poner en valor el potencial interés científico, y no solo cultural y económico, de la conservación de la raza de Gochu Asturcelta.



8. Conclusiones

PRIMERA

La raza porcina de Gochu Asturcelta es una población en riesgo extremo, fundada sobre un número extremadamente reducido de reproductores, que precisa de una monitorización constante para asegurar su viabilidad.

SEGUNDA

Las genealogías registradas en el Libro Genealógico de la raza porcina de Gochu Asturcelta son una herramienta útil para la monitorización de la variabilidad genética de la población. Aunque las pérdidas de variabilidad genética producidas por deriva tras la puesta en marcha del programa de cría de la asociación de criadores ACGA son importantes, la política de apareamientos recomendada por ACGA ha impedido la aparición de un cuello de botella por utilización abusiva de un número reducido de reproductores que podría haber hecho inviable la población.

TERCERA

La gran identidad genética de la población de Gochu Asturcelta impide establecer relaciones genéticas claras con las poblaciones porcinas más importantes de su entorno geográfico mediante marcadores moleculares neutros. Aunque cabe excluir la asignación de la raza de Gochu Asturcelta a la estirpe porcina de cerdo ibérico, ni marcadores de tipo microsatélite ni fragmentos de la región de control del ADN mitocondrial permiten confirmar la división tradicional de las poblaciones porcinas autóctonas de la península ibérica en estirpes celta e ibérica reflejando, en mayor medida, la historia genética reciente de esas poblaciones.

CUARTA

Las estimas del tamaño efectivo de la población basadas en información molecular pueden ser de utilidad para la monitorización de la población si la muestra disponible es de gran tamaño, representativa de la estructura genética de cada cohorte anual, las estimas se realizan comprendiendo periodos temporales iguales o superiores al intervalo generacional, se tiene en cuenta la estructura demográfica de la población evaluada y se dispone de una serie temporal de estimas obtenidas mediante la misma metodología. La utilidad de una sola estima obtenida mediante un solo muestreo debe cuestionarse.

QUINTA

La particular estructura de la población de Gochu Asturcelta, derivada de un número muy reducido de fundadores, con presencia de generaciones discretas y solapadas en su pedigrí y un número importante de hermanos completos cuyo genoma puede seguirse hasta la población fundadora ofrece grandes posibilidades para la realización de futuros proyectos que permitan establecer la relación entre identidad por estado y la identidad por descendencia y su reflejo en el genoma.



9. Bibliografía

- Alderson, G.L.H. A system to maximize the maintenance of genetic variability in small populations. En: Alderson, L. (ed.), *Genetic Conservation of Domestic Livestock*. CAB International. Wallingford, 1991.
- Álvarez, I., Fernández, I., Lorenzo, L., Payeras, L., Cuervo, M. y Goyache, F. Founder and present maternal diversity in two endangered Spanish horse breeds assessed via pedigree and mitochondrial DNA information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2012, Volume 129, 271-279.
- Álvarez, I., Royo, L.J., Pérez-Pardal, L., Fernández, I., Lorenzo, L. y Goyache F. Assessing diversity losses due to selection for coat colour in the endangered bay-Asturcón pony using microsatellites. *Livestock Science*, 2011, Volume 135, 199-204.
- Álvarez I., Royo L.J., Gutiérrez J.P., Fernández I., Arranz J.J. y Goyache F. Relationship between genealogical and microsatellite information characterising losses of genetic variability: empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. *Livestock Science*, 2008, Volume 115, 80-88.
- Álvarez Sevilla, A. Les races autóctones del Principáu d'Asturies. Fundación Belenos, Uviéu/Oviedo (Principau d'Asturies), 2001.
- Álvarez Sevilla, A. El Gochu Asturcelta o "Gochu'l País". Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta, Oviedo, 2005.
- Alves, E., Óvilo, C., Rodríguez, M.C. y Silió, L. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, 2003, Volume 34, 319-324
- Antão, T., Pérez-Figueroa, A. y Luikartm G. Early detection of population declines: high power of genetic monitoring using effective population size estimators. *Evolutionary Applications*, 2010, Volume 4, 144-154.
- Aparicio, G. Zootecnia especial. Etnología compendiada, 3ª edición. Imprenta Moderna, Córdoba (España), 1944.
- Argamentería, A. y Menéndez, J. La recuperación del Gochu Asturcelta. En: Manual del Gochu Asturcelta (Ed. A. Argamentería). Asturgraf, Oviedo (Asturias) pp. 35-46, 2012.
- Avise, J.C.. *Molecular Markers, Natural History and Evolution* (2nd Revised ed.). Sinauer Associates Inc., U.S.A., 2004.

- Ballonoff, P. Genetics and social structure. Dowden, Hutchinson, & Ross, Stroudsburg, PA, 1974.
- Bandelt, H-J., Forster, P. y Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, Volume 16, 37–48.
- Barbato, M., Orozco-terWengel, P., Tapio, M. y Bruford, M.W. SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontiers in Genetics*, 2015, Volume 6, 109. doi: 10.3389/fgene.2015.00109
- Baumung, R. y Sölkner, J. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genetics Selection Evolution*, 2003, Volume 35, 369-383.
- Beja-Pereira, A. Bento, P., Ferrand, N. y Brenning, B. Genetic polymorphism of the 17th exon at porcine RYR1 locus ; a new variant in a local Portuguese pig breed demonstrated by SSCP analysis *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2001, Volume, 118, 213-234.
- Ballou, J.D. y Lacy, R.C. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations, pp 76-111. En J.D. Ballou, M. Gilpin, T.J. Foose (eds.), *Population Management for Survival & Recovery. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation*. Columbia University Press, New York, 1995.
- Boichard, D., Maignel, L. y Verrier E. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genetics Selection Evolution*, 1997, Volume 29, 5-23.
- Boitard S., Chevalet, C., Mercat, M.-J., Meriaux, J. C., Sánchez, A., Tibau, J. y Sancristobal, M. Genetic variability, structure and assignment of Spanish and French pig populations based on a large sampling. *Animal Genetics*, 2010, Volume 41, 608-615.
- Bosse, M., Megens, H-J., Madsen, O., Paudel, Y., Frantz, L.A.F., Schook, L.B., Crooijmans, R.P.M.A. y Groenen, M.A.M. Regions of Homozygosity in the Porcine Genome: Consequence of Demography and the Recombination Landscape. *PLoS Genetics*, 2012, Volume 8(11): e1003100
- Burgos-Paz ,W., Souza, C.A., Megens, H.J., Ramayo-Caldas, Y., Melo, M., Lemús-Flores, C., Caal, E., Soto, H.W., Martínez, R., Álvarez, L.A.,

- Aguirre, L., Iñiguez, V., Revidatti, M.A., Martínez-López, O.R., Llambi, S., Esteve-Codina, S., Rodríguez, M.C., Crooijmans, R.P.M.A., Paiva, S.R., Schook, L.B., Groenen, M.A.M. y Pérez-Enciso, M. Porcine colonization of the Americas: a 60k SNP story. *Heredity*, 2013, Volume 110, 321–330.
- Caballero, A. y Toro, M. A. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetical Research*, 2000, Volume 75, 331-343.
- Caballero, A. y Toro, M. A. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 2002, Volume 3, 289-299.
- Carril, J., Rivero, G., García, J., Rivero, C., Vázquez, J. y Fernández M. Presentación de la raza porcina Celta. *Archivos de Zootecnia*, 2001, Volume 50, 291-299.
- Cervantes I, Goyache F, Molina A, Valera M, Gutierrez JP, 2008. Application of individual increase in inbreeding to estimate realized effective sizes from real pedigrees. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125:301-310.
- Cervantes, I., Goyache, F., Molina, A., Valera, M. y Gutiérrez, J.P. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2011a, Volume 128, 56-63.
- Cervantes, I., Pastor, J.M., Gutiérrez, J.P., Goyache, F. y Molina, A. Effective population size as a measure of risk status in rare breeds: The case of three Spanish ruminant breeds. *Livestock Science*, 2011b, Volume 138, 202–206.
- Corbin, L.J., Liu, A.Y.H., Bishop, S.C. y Woolliams, J.A. Estimation of historical effective population size using linkage disequilibria with marker data. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2012, Volume 129, 257-270.
- Cotterman, C. 1940. A calculus for statistico-genetics. Ph.D. Thesis, Ohio State University.
- Crawford A.M. y Cuthbertson R.P. Mutations in Sheep Microsatellites, *Genome Research*, 1996, Volume 6, 876-879.

- Curik, I., Ferencakovic, M. y Sölkner, J. Inbreeding and runs of homozygosity: a possible solution to an old problem. *Livestock Science*, 2014, Volume 166, 26-34.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J. y Ovenden J.R. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Research*, 2014, Volume 14, 209-214.
- Eding, J.H. y Laval, G. Measuring genetic uniqueness in livestock. En Oldenbroek, J.K. (ed) Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources, pp 33 -58. DLO Inst. Anim. Sci. and Health. Lelystad, The Netherlands, 1999.
- England, P. R. Cornuet, J-M., Berthier, P., Tallmon, D. A. y Luikart, G.. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics*, 2006, Volume 7, 303–308.
- Falconer D.S. y MacKay T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics, Longman, Harlow, 1996.
- FAO-UNEP. Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos (WWL-DAD:2) Ed.: Beate D. Scherf. Roma, 1997.
- FAO. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration. Rome, 2007.
- Fernández, A., Rodrigáñez, J., Toro, M. A., Rodríguez, M. C. y Silió, L. Inbreeding effects on the parameters of the growth function in three strains of Iberian pigs. *Journal of Animal Science*, 2002, Volume 80, 2267–2275.
- Fernández, J., Villanueva, B., Pong-Wong, R. y Toro, M.A. Efficiency of the use of pedigree and molecular marker information in conservation programs. *Genetics*, 2005, Volume 170, 1313–1321.
- Frantz, L.A.F., Schraiber, J.G., Madsen, O., Megens, H-J., Cagan, A., Bosse, M., Paudel, Y., Crooijmans, R.P.M.A., Larson, G. y Groenen, M.A.M. Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes. *Nature Genetics*, 2015, Volume 4, 1141–1148.

- Giuffra, E., Kijas, J.M.H., Armager, V., Carlborg, O., Jeon, J.T. y Anderson, L.. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 2000, Volume 154, 1785–91.
- Gómez, M. 2003. The conservation programme for Basque pig breeds. *Archivos de Zootecnia*, 2003, Volume 52, 231-235.
- Gómez, M.D., Valera, M., Molina, A., Gutiérrez, J.P. y Goyache F. Assessment of inbreeding depression for body measurements in Spanish Purebred (Andalusian) horses. *Livestock Science*, 2009, Volume 122, 149-155.
- Goyache, F., Gutiérrez, J.P. y Cervantes, I. Comments on: Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse (Leroy *et al.* 2013), 2013 <http://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9686-45-1/comments>
- Goyache, F., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Gómez, E., Álvarez, I., Díez, J. y Royo, L.J. Monitoring pedigree information to conserve the genetic variability in endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2003, Volume 120, 95-103.
- Goyache, F., Álvarez, I., Fernández, I., Pérez-Pardal, L., Royo, L.J. y Lorenzo, L. Usefulness of molecular-based methods for estimating effective population size in livestock assessed using data from the endangered black-coated Asturcón pony. *Journal of Animal Science*, 2011, Volume 89, 1251–1259.[
- Gutiérrez J.P. y Goyache F. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2005, Volume 122, 172–176.
- Gutiérrez, J.P., Altarriba, J., Díaz, C., Quintanilla, R., Cañón, J. y Piedrafita, J. Pedigree analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 2003, Volume 35, 43-64.
- Gutiérrez, J.P., Cervantes, I., Molina, A., Valera, M. y Goyache, F. Individual increase in inbreeding allows estimating effective sizes from pedigrees. *Genetics Selection Evolution*, 2008, Volume 40, 359-378.

- Gutiérrez, J.P., Cervantes, I. y Goyache, F. Improving the estimation of realised effective population sizes in farm animals. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2009, Volume 126, 327-332.
- Hill, W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, 1981, Volume 38, 209-216.
- Hinrichs, D., Meuwissen, T.H.E., Ødegard, J., Holt, M., Vangen, O. y Woolliams, J.A. Analysis of inbreeding depression in the first litter size of mice in a long-term selection experiment with respect to the age of the inbreeding. *Heredity*, 2007, Volume 99, 81–88.
- Hodges, J. The management of global animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Paper*, 1992, Volume 104.
- James, J. Computation of genetic contributions from pedigrees. *Theoretical and Applied Genetics*, 1972, Volume 42, 272-273.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. y Thein, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, Volume 314, 67-73.
- Jones, A.G, Small, C.M., Paczolt K.A., y Ratterman, N.L. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2010, Volume 10, 6–30.
- Jorde, P. E. y Ryman N. Temporal allele frequency change and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics*, 1995, 139, 1077-1090.
- Jorde, P. E. y Ryman N. Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation of effective population size from temporal change of allele frequencies. *Genetics*, 1996, Volume 143, 1369-1381.
- Jorde, P. E. y Ryman N. Unbiased Estimator for Genetic Drift and Effective Population Size. *Genetics*, 2007, Volume 177:927-935.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. y Marshall, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, *Molecular Ecology*, 2007, Volume 16, 1099–1006.
- Lacy, R.C. Analysis of Founder Representation in Pedigrees: Founder Equivalent and Founder Genome Equivalents. *Zoo Biology*, 1989, Volume 8, 111-123.
- 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. y Cooper, A. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 2005, Volume 11, 1618-1621.
- Larson, G., Albarella U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Vigne, J-D., Edwards, C.J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Tresset, A., Balaçescu. A., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., Van Wijngaarden-Bakker, L., Masseti, M., Bradley, D.G. y Cooper, A. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *PNAS*, 2007, Volume 104, 15276–15281.
- Larson, G. y Fuller, D.Q. The Evolution of Animal Domestication. *Annual Review in Ecology Evolution and Systematics*, 2014, Volume 45, 115–136.
- Laval, G., Iannuccelli, N., Legault, D., Milan, D., Groenen, M.A.M., Giuffra, E., Anderson, L., Nissen, P.H., Jørgensen, C.B., Beeckmann, P., Geldwermann, H., Foulley, J.L., Chevalet, C. y Ollivier, L. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection Evolution*, 2000, Volume 32, 187-204.
- Leroy G, Mary-Huard T, Verrier E, Danvy S, Charvolin E, Danchin-Burge C. Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse. *Genetics Selection Evolution*, 2013, 45:1.
- Luikart G. y Cornuet J-M. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Genetics*, 1998, Volume 13, 55-65.
- Luikart, G., N. Ryman, D.A. Tallmon D. A., Schwartz, M.K. y Allendorf, F. W. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 2010, Volume 11, 355–373
- McQuillan, R., Leutenegger, A.L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C.S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Smolej-Narancic, N., Janicijevic, B., Polasek, O., Tenesa, A., MacLeod, A.K., Farrington, S.M., Rudan, P., Hayward, C., Vitart, V., Rudan, I., Wild, S.H., Dunlop, M.G., Wright, A.F., Campbell, H., Wilson, J.F. Runs of homozygosity in European populations. *American Journal of Human Genetics*, 2008, Volume 83, 359-372.

- Malécot, G. 1948. Les Mathématiques de l'Hérédité. Masson et Cie, Paris, France.
- Manaseryan, N., Miracle, P., Van Wijngaarden-Bakker, L., Bradley, D.G., Cooper, A., Dolman, G. y Masseti, M. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *PNAS*, 2007, Volume 104, 15276-15281.
- Melka M.G. y Schenkel F. Analysis of genetic diversity in four Canadian swine breeds using pedigree data. *Canadian Journal of Animal Science*, 2010, Volume 90, 331-340.
- Menéndez, J., 2012. La asociación de criadores de Gochu Asturcelta. En: Manual del Gochu Asturcelta pp. 29-34 (Ed. A. Argamentería). Asturgraf, Oviedo (Asturias), 2012.
- Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., de la Roza, B. y Goyache F. Multiple paternity in domestic pig under equally probable natural matings. A case study in the endangered Gochu Asturcelta pig breed. *Archives of Animal Breeding*, 2015, Volume 58, 217-220. doi:10.5194/aab-1-1-2015
- Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I. y Goyache, F. Genealogical analysis of the Gochu Asturcelta pig breed: insights for conservation. *Czech Journal of Animal Science*, 2016a, Volume 61, 140-143. doi: 10.17221/8787-CJAS
- Menéndez, J., Goyache, F., Beja-Pereira, Fernández, I., Menéndez-Arias, N.A., Godinho, R. y Álvarez, I. (2016) Genetic characterization of the endangered Gochu Asturcelta pig breed using microsatellite and mitochondrial markers: insights for the composition of the Iberian native pig stock. *Livestock Science*, 2016b, Volume 187, 162-167. doi:10.1016/j.livsci.2016.03.013
- Menéndez, J., Álvarez, I., Fernández, I., Menéndez-Arias, N.A. y Goyache, F. (2016) Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered Gochu Asturcelta pig breed. *Ecology and Evolution*, 2016c, Volume 6, 4971-4980. doi: 10.1002/ece3.2240
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.*

- Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology*, 1986, Volume 51, 263-273.
- Nei, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 1977, Volume 41, 225-233.
- Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. University Press, New York. selected populations, 1987.
- Nomura, T. Estimation of Effective Number of Breeders from Molecular Coancestry of Single Cohort Sample. *Evolutionary Applications*, 2008, Volume 1, 462-474.
- Ollivier, L. *Éléments de génétique quantitative*. INRA et Masson, Paris, 1981.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M. y Estoup, A. Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 2004, Volume 13, 55-65.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., y Saccone, C. *Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes*. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, Volume 48, 427-434.
- Pham, L.D., Do, D.N., Nam, L.Q., Van Ba, N., Minh, L.T.A., Hoan, T.X., Cuong, V.C. y Kadarmideen, H.N. Molecular genetic diversity and genetic structure of Vietnamese indigenous pig populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2014, Volume 131, 379-386.
- Pritchard, J., Stephens, M. y Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, Volume 155, 945-959.
- Ramayo-Caldas, Y., Castello, A., Pena, R.N., Alves, E., Mercadé, A., Souza, C.A., Fernández, A.I., Pérez-Enciso, M. y Folch, J.M. Copy number variation in the porcine genome inferred from a 60 k SNP BeadChip. *BMC Genomics*, 2010, Volume 11, 593. doi:10.1186/1471-2164-11-593
- Ramírez, O., Ojeda, A., Tomàs, A., Gallardo, D., Huang, L.S., Folch, J.M., Clop, A., Sánchez, A., Badaoui, B., Hanotte, O., Galman-Omitogun, O., Makuza, S.M., Soto, H., Cadillo, J., Kelly, L., Cho, I.C., Yeghoyan, S., Pérez-Enciso, M. y Amills, M. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, Volume 26, 2061-2072.

- Ramos, A.M., Crooijmans, R.P.M.A., Affara, N.A., Amaral, A.J., Archibald, A.L., Beever, J.E., Bendixen, C., Churcher, C., Clark, R., Dehais, P., Hansen, M.S., Hedegaard, J., Hu, Z-L., Kerstens, H.H., Law, A.S., Megens, H-J., Milan, D., Nonneman, D.J., Rohrer, G.A., Rothschild, M.F., Smith, T.P.L., Schnabel, R.D., Van Tassell, C.P., Taylor, J.F., Wiedmann, R.T., Schook, L.B. y Groenen, M.A.M. Design of a High Density SNP Genotyping Assay in the Pig Using SNPs Identified and Characterized by Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE*, 2009, Volume 4(8): e6524. doi:10.1371/journal.pone.0006524
- Reynolds, J., Weir, B.S. y Cockerham, C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 1983, Volume 105, 767-779,
- Royo, L.J., Álvarez, I., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Beja-Pereira, A., Diéguez, E. y Goyache, F. 2004. Caracterización preliminar del Gochu Celta de Asturias mediante microsatélites. Comunicación oral en el IV Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. Ponte de Lima, Portugal, 15-17 Septiembre 2004.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Fernández, I., Pérez-Pardal, L., Álvarez-Sevilla A., Godinho, R., Ferrand, N. y Goyache, F. Genetic Characterisation of Celtic-Iberian Pig Breeds Using Microsatellites. En "Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig", Capo d'Orlando – Messina (Italy), October 11-13, 2007. Editors: L. Nanni Costa, P. Zambonelli, V. Russo. Italian National Library in Florence, Italy, pp. 32-35, 2008.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Gutiérrez, J.P., Fernández, I. y Goyache, F. Genetic variability in the endangered Asturcón pony assessed using genealogical and molecular information. *Livestock Science*, 2007, Volume 107, 162-169.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Beja-Pereira, A., Molina, A., Fernández, I., Jordana, J., Gómez, E., Gutiérrez, J.P. y Goyache, F. (2005) The origins of Iberian horses assessed via mitochondrial DNA. *Journal of Heredity*, 2005, Volume 96, 663-669.
- Santos e Silva, J., Vicente, A., Alves, C., Fernandes, P., Carril, J.A., Álvarez-Sevilla, A., Fernández, L., Álvarez, I. y Goyache, F. Dynamic and Socio-Economical Valorisation of the Local Celtic Pig Breeds. En "Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig", Capo

- d'Orlando – Messina (Italy), October 11-13, 2007, 2008. Editors: L. Nanni Costa, P. Zambonelli, V. Russo. Italian National Library in Florence, Italy, pp. 390-398, 2008.
- Santos Arán, P. Ganadería Práctica. Ganado de cerda. Explotación e industrialización del cerdo. Imprenta de "Alrededor del Mundo, 1917.
- Scherf, B.D. WORLD WATCH LIST for domestic animal diversity. 3rd edition. FAO, Rome, 2000.
- Silió, L., Barragán, C., Fernández, A.I., García-Casco, J. y Rodríguez, M.C. Assessing effective population size, coancestry and inbreeding effects on litter size using the pedigree and SNP data in closed lines of the Iberian pig breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2016, Volume 133, 145–154.
- Silió L. y Rodrigáñez J. Una experiencia irrepetible: la piara de cerdos ibéricos de 'El Dehesón del Encinar' (1944-2012). En: *Libro de Actas XV Jornadas de Producción Animal de la AIDA*, 2013, Volume I, 3-16.
- Simon, D.L. European approaches to conservation of farm animal genetic resources. *AGRI*, 1999, Volume 25, 79-99.
- Sölkner, J., Filipčič, L. y Hampshire, N. Genetic variability of populations and similarity of subpopulations in Austrian cattle breeds determined by analysis of pedigrees. *Animal Science*, 1998, Volume 67, 249-256.
- Sotillo J.L. y Serrano, V. Producción Animal II. Etnología Zootécnica. Ediciones Tebar-Flores, Madrid, 1985.
- Sutovsky, P., Mccauley, T.C., Sutovsky, M. y Day, B.N. Early Degradation of Paternal Mitochondria in Domestic Pig (*Sus scrofa*) Is Prevented by Selective Proteasomal Inhibitors Lactacystin and MG132. *Biology and Reproduction*, 2003, Volume 68, 1793–1800.
- Tang, G.Q., Xue, J., Lian, M.J., Yang, R.F., Liu, T.F., Zeng, Z.Y., Jiang, A.A., Jiang, Y.Z., Zhu, L., Bai, L., Wang, Z. y Li, X.W. Inbreeding and Genetic Diversity in Three Imported Swine Breeds in China Using Pedigree Data. *Asian Australasian of Animal Science*, 2013, Volume 26, 755-765.
- Toro, M.A. Genetic distances: a useful tool to be applied with caution. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2002, Volume 125, 3-4.

- Toro, M.A. y Pérez-Enciso, M. Optimization of selection response under restricted inbreeding. *Genetics Selection Evolution*, 1990, Volume 22, 93-107.
- Toro, M.A., Rodrigáñez, J., Silió, L. y Rodríguez, C. Genealogical analysis of a close herd Black Hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, 2000, Volume 14, 1843–1851.
- VanRaden, P.M. Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*, 2008, Volume 91, 4414-4423.
- VanRaden, P.M., Olson, K.M., Wiggans, G.R., Cole, J.B. y Tooker, M.E. Genomic inbreeding and relationships among Holsteins, Jerseys, and Brown Swiss. *Journal of Dairy Science*, 2011, Volume 94, 5673-5682.
- Waples, R.S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 1989, Volume 121, 379-391.
- Waples, R.S. Genetic methods for estimating the effective size of Cetacean populations. *Report of the International Whaling Commission Special Issue*, 1991, Volume 13, 279-300.
- Waples, R.S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 2006, Volume 7, 167-184.
- Waples, R.S. y Do, C. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolution Applied*, 2010, Volume 3, 244–262.
- Waples, R. S., Do, C. y Chopelet, J. Calculating N_e and N_e/N in age-structured populations: a hybrid Felsenstein-Hill approach. *Ecology*, 2011, Volume 92, 1513–1522.
- Waples, R.S. y Yokota, M. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics*, 2007, Volume 175, 219-233.
- Waples, R. S., Antao, T. y Luikart, G. Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size. *Genetics*, 2014, Volume 197, 769–780.

- Waples, R. S., Luikart, G., Faulkner, J. R. y Tallmon, D.A. 2013. Simple life history traits explain key effective population size ratios across diverse taxa. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 2013, Volume 280, 1339.
- Welsh C.S., Stewart T.S., Schwa C. y Blackburn H.D. Pedigree analysis of 5 swine breeds in the United States and the implications for genetic conservation. *Journal of Animal Science*, 2010, Volume 88, 1610-1618.
- Windig, J.J., Eding, H., Moll, L. y Kaal, L. Effects on inbreeding of different strategies aimed at eliminating scrapie sensitivity alleles in rare sheep breeds in The Netherlands. *Animal Science*, 2004, Volume 79, 11–20.
- Woolliams, J.A. y Mäntysaari, E.A. 1995. Genetic contributions of Finnish Ayrshire bulls over four generations. *Animal Science*, 1995, Volume 61, 177-197.
- Wright, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 1931, Volume 16, 97-159.
- Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 1965, Volume 19, 395-420.
- Wright, S. Evolution and the genetics of populations. Vol. 3: Results and Evolutionary Deductions. The University of Chicago Press, 1977.
- Zavarez, L.B., Utsunomiya, Y.T., Carmo, A.S., Neves, H.H.R., Carvalheiro, R., Ferenkacovic, M., Pérez-O'Brien, A.M., Curik, I., Van Tassell, C.P., da Silva, M.V.G.B., Sonstegard, T.S., Cole, J.B., Sölkner, J., Garcia, J.F. Assessment of autozygosity in Nellore cows (*Bos indicus*) through high-density SNP genotypes. *Frontiers in Genetics*, 2015, Volume 5, 5. doi: 10.3389/fgene.2015.00005



10. Resumen

El Gochu Asturcelta es una raza porcina autóctona de Asturias en extremo riesgo. Tradicionalmente se asume que la raza pertenece al tronco porcino celta de la península ibérica al igual que la raza de cerdo Celta de Galicia o la raza Bísara de Portugal. El Gochu Asturcelta prácticamente se extinguió en la segunda mitad del siglo XX. En 2002 se fundó la asociación de criadores ACGA que, con seis fundadores, inició un programa de conservación con el apoyo del Gobierno del Principado de Asturias. El objetivo de la presente Memoria es contribuir al conocimiento de la raza de Gochu Asturcelta mediante la caracterización de su variabilidad genética y de sus relaciones genéticas con las poblaciones porcinas más importantes de su entorno geográfico. Para cumplir con ese objetivo se han aplicado diversas metodologías para: a) evaluar el efecto de la política de apareamientos recomendada por ACGA para el mantenimiento de la variabilidad genética de la raza; b) conocer si la asignación del Gochu Asturcelta al grupo de cerdos de estirpe celta de la península ibérica tiene respaldo genético; y c) estimar el tamaño efectivo de la raza de Gochu Asturcelta para predecir su viabilidad.

En un primer trabajo (Menéndez *et al.* 2015) se desarrolló una batería de 20 microsatélites para llevar a cabo pruebas de paternidad en el marco del programa de conservación. Esta batería de marcadores se aplicó a 19 lechones producidos por tres cerdas diferentes, cada una de las cuales se habían mantenido, accidentalmente, sin restricciones para el apareamiento con dos verracos diferentes. En dos de los casos los verracos eran hermanos completos de las cerdas madres. En el tercer caso, uno de los verracos era hermano completo de la cerda. La batería de microsatélites permitió asignar los lechones a uno de los verracos candidatos con confianza estadística alta. Todas las camadas testadas tuvieron dos padres diferentes. Los apareamientos accidentales analizados ocurrieron en un momento muy inicial del programa de cría poniendo en riesgo la calidad de las genealogías recogidas en el Libro Genealógico de ACGA. Se recomendaron estrictas pautas de manejo y apareamientos para evitar nuevos apareamientos no supervisados entre parientes cercanos.

Un segundo trabajo (Menéndez *et al.* 2016a) analizó la información registrada en el Libro Genealógico de la raza de Gochu Asturcelta desde su fundación hasta agosto de 2014 para determinar si la política de apareamientos llevada a cabo por ACGA ha tenido éxito en preservar la representación de los fundadores en la población presente. La consanguinidad media del pedigrí fue muy alta ($0,230 \pm 0,078$). Sin embargo la tasa de incremento individual en consanguinidad se ha mantenido estable, alrededor de 0,07, desde 2009. Se han registrado notables pérdidas de variabilidad genética por deriva. El parámetro equivalente a genomas fundadores (f_g), que caracteriza las pérdidas de variabilidad genética debidas a cualquier causa de deriva, fue de, aproximadamente, el 60% del valor de tamaño efectivo de fundadores (f_e), que caracteriza las pérdidas de variabilidad genética debidas a contribuciones desequilibradas de los fundadores. Sin embargo, el cociente entre el número efectivo de ancestros (f_a) y f_e fue de, aproximadamente, 1. Este hecho sugiere que la política de apareamientos de ACGA ha permitido evitar la aparición de un cuello de botella en la población resultante del uso abusivo de un número reducido de reproductores. Se pudo constatar la necesidad de desequilibrar las contribuciones genéticas para las siguientes generaciones a favor de una línea fundadores poco representada.

En un tercer trabajo (Menéndez *et al.* 2016b) la variabilidad genética del Gochu Asturcelta se evaluó mediante marcadores moleculares para conocer las relaciones genéticas de la raza con otras de importancia en su entorno geográfico y para determinar si la clasificación tradicional del cerdo autóctono de la península ibérica en estirpes celta e ibérica tiene concordancia con diferencias genéticas entre marcadores neutros. Dos poblaciones de Gochu Asturcelta (inicial y presente) se genotiparon con 17 marcadores de tipo microsatellite para tener en cuenta la posible deriva acumulada desde el inicio del programa de cría de la raza. Las dos poblaciones de Gochu Asturcelta se compararon con cuatro poblaciones de cerdos domésticos, que incluían individuos de ocho razas diferentes, y jabalí. La diferenciación entre las dos poblaciones de Gochu Asturcelta fue muy baja ($F_{ST} = 0.021 \pm 0.005$). El parámetro equivalente a genomas

fundadores, calculado a partir de información molecular, tomó prácticamente el mismo valor para las dos poblaciones de Gochu Asturcelta, lo que sugiere que la raza no ha experimentado pérdidas de variabilidad genética importantes desde la puesta en marcha del programa de cría. En todo caso, las dos poblaciones de Gochu Asturcelta mostraron una notable diferenciación genética respecto de las otras poblaciones disponibles, probablemente debido a la gran identidad genética de los animales de Gochu Asturcelta genotipados. Por otra parte se secuenció un fragmento de 647 pares de bases de la región de control del ADN mitocondrial en 174 individuos de las mismas poblaciones. De los 30 haplotipos identificados, el Gochu Asturcelta solo presentó tres. Las familias haplotípicas A (más frecuente en cerdo centroeuropeo) y C (más frecuente en cerdo ibérico y jabalí ibérico y del norte de África) estuvieron presentes tanto en cerdos de estirpe celta como en la estirpe ibérica y en razas de cerdos cosmopolitas. La composición de ADN mitocondrial de la península ibérica refleja la historia reciente de las poblaciones analizadas más que su composición ancestral. Este hecho hace difícil apoyar la división tradicional del cerdo de la península ibérica en estirpes celta e ibérica mediante el polimorfismo de marcadores moleculares neutros.

Un cuarto trabajo (Menéndez *et al.* 2016c) profundizó en la estimación del tamaño efectivo (N_e) de la población de Gochu Asturcelta. Se aplicaron diversas metodologías para estimar N_e mediante información molecular y se compararon sus resultados con estimas genealógicas. Se utilizaron genotipos de 17 marcadores microsatélites obtenidos en 780 individuos de raza Gochu Asturcelta que se asignaron a dos generaciones filiales discretas (F_3 y F_4) y cinco cohortes anuales (desde 2006 a 2010) con solapamiento generacional. Cualquiera que fuera el método utilizado, las estimas moleculares de N_e fueron mayores que las genealógicas. Estimaciones de N_e calculadas mediante el desequilibrio de ligamiento de una sola muestra de la población ($N_{e(LD)}$) en F_3 y F_4 fueron más estables y menores que las calculadas para cohortes anuales o bianuales. Las estimaciones de $N_{e(LD)}$ calculadas sobre muestras con solapamiento generacional solo fueron comparables con las obtenidas para las generaciones discretas cuando el

periodo de muestreo era similar al intervalo generacional y se efectuaron correcciones para evitar el sesgo demográfico. Estimaciones de N_e calculadas mediante coascendencia molecular en una sola muestra de la población ($N_{e(M)}$) no fueron independientes de las estimaciones correspondientes de $N_{e(LD)}$ debido a que tanto el desequilibrio de ligamiento como la coascendencia molecular tendieron a covariar. En todo caso, los valores de las estimaciones de $N_{e(M)}$ fueron menores que los correspondientes de $N_{e(LD)}$ debido a que reflejan en mayor medida el número de genomas fundadores que el tamaño efectivo de la población. Las estimaciones de N_e obtenidas mediante métodos temporales (dos muestras) fueron muy dependientes del intervalo entre muestras y resultaron inaceptablemente sesgadas hacia arriba antes de realizar correcciones por sesgo demográfico. En conjunto, la evidencia empírica obtenida sugiere que las estimaciones moleculares de N_e deben interpretarse cuidadosamente en muestras con generaciones solapadas. Esas estimaciones pueden ser útiles cuando se dan las siguientes condiciones: a) el tamaño muestral es suficiente y representativo de la estructura genética y relaciones de parentesco de la población; b) se aplica corrección por sesgo demográfico; y c) el intervalo utilizado para la definición de la cohorte a genotipar no es arbitrario y se corresponde con la demografía y estructura genética de la población. Esas restricciones hacen que los métodos basados en la toma de una sola muestra no tengan una gran ventaja operativa.

La particular estructura de la población de Gochu Asturcelta, con presencia de generaciones discretas y solapadas en su pedigrí, la convierte en un escenario único para el desarrollo de futuros estudios tendientes a establecer la relación entre autocigosis (homocigosis debida identidad por descendencia) e identidad por estado.



11. Summary

Gochu Asturcelta is an extremely endangered pig breed native of Asturias (Northern Spain). It is assumed that the breed, together with the Galician *Celta* or the Portuguese *Bísara* breeds, is one of the remaining representatives of the Celtic pig strain native of the Iberian Peninsula. The *Gochu Asturcelta* nearly became extinct at the end of the 20th century. In 2002, a group of enthusiastic farmers founded the breeders association ACGA and initiated a recovery programme with six founders and the support of the Government of *Principado de Asturias*. The aim of this PhD Thesis is to contribute to the documentation of the *Gochu Asturcelta* pig breed via the characterisation of both the genetic variability of the breeding stock and the genetic relationships between the *Gochu Asturcelta* breed and the major pig populations in the Iberian Peninsula. To accomplish with this general aim a number of methodologies have been applied to: a) assess the effect of the mating policy implemented by ACGA on the preservation of the genetic variability of the breed; b) ascertain if the traditional classification of the *Gochu Asturcelta* breed as Celtic breed of the Iberian Peninsula has genetic support; and c) estimate the effective population size of the *Gochu Asturcelta* breed to monitor its evolutionary viability.

In a first work (Menéndez *et al.* 2015) a set of 20 microsatellites was developed to carry out paternity tests in the breed. This microsatellite set was first applied on 19 *Gochu Asturcelta* piglets of three different sows. Each sow was accidentally kept with two different boars, in most cases full sibs of the sows, with no restrictions for mating. The microsatellite set developed was useful to assign all offspring to a candidate boar with high statistical confidence. All litters had two different parents showing that multiple paternities are possible in domestic pig under natural mating. The accidental matings analysed occurred in a very initial moment of the recovery programme of the breed jeopardising the quality of the genealogies registered in the ACGA's herdbook. Strict mating policies and management procedures were further recommended by ACGA to avoid unsupervised mating between closer relatives.

A second work (Menéndez *et al.* 2016a) analysed the information registered in the *Gochu Asturcelta* pig breed herdbook from its foundation

in 2002 to August 2014 to assess if the mating policy implemented by the breeders association (ACGA) was successful in preserving the genetic background of the founders in the present population. As expected, mean inbreeding was very high (0.230 ± 0.078) for the whole pedigree. However, mean individual increase in inbreeding tended to keep steady values (around 0.07) after 2009. Drift caused noticeable losses of genetic diversity. Parameter founder genome equivalents (f_g), which characterises losses of genetic diversity due to all causes of drift, was roughly 60% of the effective number of founders (f_e) which characterises losses of genetic diversity due to unequal contributions of the founders. However, the ratio between the effective number of ancestors (f_a) and f_e was about 1. This suggests that the ACGA's mating policy has avoided an extreme bottleneck in the population due to abusive use of a small number of individuals for reproduction. The need of unbalancing further genetic contributions to the population towards descendants of a very poorly represented founder was also highlighted.

In a third work (Menéndez *et al.* 2016b) the genetic background of the *Gochu Asturcelta* pig breed was analysed to contribute to its documentation and to ascertain if the traditional classification of native pig of the Iberian Peninsula into the Celtic-Iberian and the Iberian groups has genetic support. Two populations of *Gochu Asturcelta* pig (initial and present) were typed for 17 microsatellites to account for the drift accumulated after the start of the breeding programme of the breed. These two *Gochu Asturcelta* populations were compared with other four domestic pig populations (including eight breeds) and Wild Boar. Differentiation between the two *Gochu Asturcelta* populations analysed was very low ($F_{ST} = 0.021 \pm 0.005$). Parameter founder genome equivalents computed using molecular coancestry has virtually the same value for the two *Gochu Asturcelta* populations suggesting that the breed has not suffered additional genetic losses of genetic variability due to drift after the implementation of the breeding scheme. In any case, *Gochu Asturcelta* populations showed a noticeable genetic distance with the other populations analysed, probably due to the extreme genetic identity of the

individuals typed. Further, a fragment of the control region of the mitochondrial DNA (647 bp) was analysed on 174 samples. Among the 30 haplotypes identified *Gochu Asturcelta* had only three different haplotypes. The haplotypic superfamilies A (more frequent in Central Europe pig) and C (more frequent in Iberian pig and Maghreb Wild Boar) were present in all the Celtic-Iberian, Iberian and Cosmopolitan pig breeds analysed. The mitochondrial DNA composition of the pig stock of the Iberian Peninsula mainly reflected the recent history of the analysed pig populations, therefore making difficult to ensure to give genetic support to the classical classification of native pig strains of the Iberian Peninsula.

A fourth work (Menéndez *et al.* 2016c) went deeper on the ascertainment of the effective population size (N_e) of the *Gochu Asturcelta* pig breed. To do so, various methodologies to estimate effective population size using molecular information were applied and their results compared with those obtained using genealogies. Genotypes corresponding to a set of 17 microsatellites were obtained on 780 *Gochu Asturcelta* individuals which were classified into two filial discrete generations (F_3 and F_4) and five annual Cohorts (from 2006 to 2010) with generations overlap. Whatever the method used, molecular-based estimates of N_e exceeded those obtained using pedigree data. Single-sample estimates of effective population size using linkage disequilibrium ($N_{e(LD)}$) for filial generations were lower and steadier than those obtained using yearly or bi-annual samplings. $N_{e(LD)}$ estimated for samples including generations overlap could only be compared with those obtained for the discrete filial generations when sampling span approached a generation interval and demographic correction for bias was applied. Single-sample estimates of effective population size using molecular coancestry ($N_{e(M)}$) were not independent on their $N_{e(LD)}$ counterparts because linkage disequilibrium and molecular coancestry tended to covary. In any case, $N_{e(M)}$ estimates were lower than the corresponding $N_{e(LD)}$ estimates because the former more likely reflect the number of founder genomes rather than population size. Temporal estimates of N_e were highly dependent on the between-samples interval considered. In any case, the temporal estimates of N_e were unacceptably

high before correction for demographic bias. Overall, the empirical evidence obtained suggest that estimates of N_e obtained using methods based in molecular information should be interpreted with caution in an scenario in which generations overlap is the rule. The use of molecular-based estimates of N_e could be used if the following conditions are fulfilled: a) the sample used has size enough and is representative of the genetic structure and the parentage relationships within the population analysed; b) correction for demographic bias is applied when overlapping generations exist; c) the interval fitted to define the cohort correspond well with the demographic and genetic structure of the population. With such constraints the advantage of using single-sample methods to obtain molecular-based estimates of N_e is not clear in operational terms.

The particular structure of the *Gochu Asturcelta* pig breed, with presence of both discrete and overlapped filial generations in its pedigree, offers a unique opportunity for the development of future studies aiming at the differentiation between autozygosity (homozygosity due to identity by descent) and identity by state.