

Exploración Inicial de la Estructura Genética del Cerdo Doméstico (*Sus scrofa domestica*) en Sampués, Sucre, Colombia, utilizando Microsatélites

INITIAL EXPLORATION OF THE GENETIC STRUCTURE OF DOMESTIC PIG (*Sus scrofa domestica*) IN SAMPUÉS, SUCRE, COLOMBIA, USING MICROSATELLITES

Enrique Pardo P.¹, Alfonso Calderón R.², Guillermo Arrazola P.³

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la variabilidad genética de una población de cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) en Sampués, Sucre, Colombia, para determinar su situación genética. Se estudiaron 50 muestras de la población. Se utilizaron 20 microsatélites, cinco pertenecientes a la lista de los recomendados por la FAO/ISAG para estudios de biodiversidad porcina y los restantes representan la mayor parte del genoma porcino. Se pudo precisar que los microsatélites utilizados resultaron polimórficos, detectándose entre 3 (*SW2019*) y 14 (*SW957*) alelos, con un número medio de alelos de 6 y un total de 120. La heterocigosidad media esperada fue de 0.5465 y la heterocigosidad media observada fue de 0.5203. Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) oscilaron entre 0.2823 y 0.7252 para los loci *SW1041* y *SW957*, respectivamente. Los resultados muestran a la población de cerdos estudiada como un grupo con alto grado de diversidad genética.

Palabras clave: marcadores microsatélites, *Sus scrofa domestica*, diversidad, equilibrio Hardy-Weinberg, Sampués

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the genetic variability of a population of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) in Sampués, Sucre, Colombia to determine their genetic status. Fifty samples were studied. Twenty microsatellites were used where five of them were from the list of those recommended by FAO/ISAG for studies of swine biodiversity and the remaining represent the majority of the porcine genome. It was possible to determine that the microsatellites used were polymorphic, detecting between 3 (*SW2019*) and 14 (*SW957*) alleles, with an average number of alleles of 6 and a total of 120. The expected average heterozygosity was 0.5465 and the observed average heterozygosity was 0.5203. The values of polymorphic information content (PIC) ranged from 0.2823 to 0.7252 for the loci *SW1041* and *SW957*, respectively. The results show the population of studied pigs as a group with a high degree of genetic diversity.

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba, Colombia

² Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Colombia

³ Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías, Universidad de Córdoba, Colombia

⁴ E-mail: epardop@correo.unicordoba.edu.co

Recibido: 8 de julio de 2016

Aceptado para publicación: 14 de diciembre de 2016

used were polymorphic, detecting between 3 (SW2019) to 14 (SW957) alleles with an average 6 and a total of 120. The mean expected heterozygosity was 0.5465 and the mean observed heterozygosity was 0.5203. The polymorphism information content (PIC) ranged between 0.2823 and 0.7252 for *SW1041* and *SW957* loci respectively. The results showed that the studied population as a group with a high degree of genetic diversity.

Key words: microsatellite markers, *Sus scrofa domestica*, diversity, Hardy-Weinberg equilibrium, Samped

INTRODUCCIÓN

El cerdo pertenece al orden Artiodactyla, familia Suidae y género *Suis*. Apareció durante el Mioceno, hace 25 a 600 millones de años, originándose a partir del jabalí (*Sus scrofa*), y fue domesticado hace unos 10 000 años (Giuffra *et al.*, 2000). Tanto la evidencia arqueológica como la evidencia molecular muestran que los cerdos domésticos se originaron independientemente en varias partes del mundo, a partir de múltiples subespecies de jabalíes europeos y asiáticos (Kijas y Anderson, 2001; Larson *et al.*, 2005). De otro lado, los cerdos silvestres y domésticos pertenecen a la misma especie (*Sus scrofa*), el primero de los cuales tiene 36 cromosomas y el doméstico tiene 38 (Bosma, 1976).

El cerdo, *Sus scrofa*, es una especie foránea al continente americano. Inicialmente llegaron a las Antillas y desde allí emigraron al resto del continente. Colón trajo cerdos en su segundo viaje (Burgos *et al.*, 2013). Años después, y por exigencia de Carlos V, la excursión de Rodrigo Bastidas que salió de la Española y fundó Santa Marta en 1525, trajo 300 cerdos (Peña y Mora, 1977). Es posible que dichos cerdos hayan sido los primeros que llegaron a Colombia.

El departamento de Sucre es una de las regiones de Colombia con menor población de cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*). Presentó una población estimada de 124 455

ejemplares en 2016, de los cuales, el 96.4% eran de crianza de traspatio (Ministerio de Agricultura, 2016), siendo mayormente de tipo criollo y cruces con diversas razas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica enzimática *in vitro*, utilizada para amplificar exponencialmente una región determinada de ADN, cuya secuencia se conoce, a partir de una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Es la técnica más empleada para el estudio de marcadores polimórficos como son los microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats), formados por secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem (Hancock, 1999). Son marcadores neutrales de gran valor informativo, que constituyen una poderosa herramienta para estudios genéticos, los cuales han sido utilizados para estudios de caracterización y diversidad genética, relaciones genéticas entre poblaciones, influencia de una raza sobre otra (admixture), pruebas de paternidad, consanguinidad y cuellos de botella genéticos, entre otros (Quiroz *et al.*, 2007).

Los objetivos del presente estudio fueron identificar el estado de la diversidad genética de la población de cerdos domésticos en Samped, Sucre, mediante la utilización de 20 microsatélites, calcular heterocigosidades por *locus* y contrastar dicha información con la obtenida en otras poblaciones con los mismos marcadores genéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras de pelo de 50 cerdos domésticos, procedentes de explotaciones familiares de Sampués, departamento de Sucre, Colombia (9° 11' 0.8" latitud Norte y 75° 22' 51" longitud Oeste). Se desconoce el registro genealógico de los cerdos.

El ADN se extrajo de las muestras mediante una modificación al protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001), a partir del bulbo piloso, mediante digestión de proteínas con la enzima Proteínasa K y una purificación con fenol-cloroformo.

Se utilizaron 20 microsatélites, cinco de los cuales pertenecen a la lista recomendada por FAO/ISAG (FAO, 2011) para estudios de biodiversidad porcina y los restantes representan la mayor parte del genoma porcino (Cuadro 1). La amplificación de los mismos se efectuó utilizando un termociclador Mycycler Bio-Rad® en un volumen final de 25 ml que incluyó 10 μ l de dNTPs 100 μ M, 2.5 μ l de amortiguador 10X, 1.0 μ l de MgCl₂ 25 mM, 3.0 μ l de cebadores específicos de cada locus de 10 pmol, 0.3 μ l de enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen®) a una concentración de 1 U/ μ l, 4.0 μ l de ADN genómico a una concentración de 50 ng/ μ l y 4.2 μ l de agua bidestilada esterilizada.

La reacción de PCR consistió de una fase de desnaturalización a 94 °C por 30 s, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridización a 56 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 30 s. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en una cámara Mini-Protean II Biorad®. Las bandas se visualizaron por tinción con nitrato de plata (Shanlian *et al.*, 2012).

La determinación del tamaño alélico se efectuó mediante la escalera alélica, y la asignación alélica se realizó mediante el ajuste a una curva de regresión lineal desarrollada a partir de las distancias de migración de los fragmentos de tamaño conocido.

Las frecuencias alélicas, heterocigosidades, valor de F_{IS} (Weir, 2012), existencia de equilibrio Hardy-Weinberg (HW), riqueza alélica y coeficiente de consanguinidad se evaluaron mediante el programa GENEPOP v. 4.0.6 (Rousset, 2008). Adicionalmente, se calculó el Contenido de Información Polimórfica (PIC) para medir la diversidad alélica de los microsatélites (Botstein *et al.*, 1980) mediante el programa CERVUS v. 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Los *loci* de los 20 microsatélites fueron polimórficos detectándose un total de 120 alelos. El número de alelos por locus varió entre 3 (*SW2019*) y 14 (*SW957*) (Cuadro 1), con un valor medio para todos los loci de 6 alelos.

Los valores de PIC (Cuadro 2) fluctuaron entre 0.2823 (*SW2019*) y 0.7252 (*SW957*), correspondiendo estos valores con los marcadores que presentaron el menor y el mayor número de alelos. El PIC promedio encontrado fue de 0.5478.

La heterocigosidad esperada (Cuadro 2), varió entre 0.1164 para *SW1067* y 0.8583 para el marcador *SW957*, con una media de 0.5465. La heterocigosidad observada (Cuadro 2) varió entre 0.0241 para *SW1067* y 0.8638 para el microsatélite *SW2519*, con una media de 0.5203. La heterocigosidad esperada fue un poco mayor que la heterocigosidad observada.

El test de equilibrio Hardy-Weinberg indicó que 15 microsatélites se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg y cinco loci mostraron una desviación significativa con respecto al equilibrio H-W (*SW2019*, *S0215*, *SW72*, *S0385*, *SW1067*).

El estadístico F_{IS} (Cuadro 2) fluctuó entre -0.404 para *SW911* y 0.387 para el marcador *SW1067*. Doce de los 20 marca-

Cuadro 1. Microsatélites, número de alelos detectados (NA), repetición y rango alélico (pb) del cerdo doméstico en Sampués (Sucre, Colombia)

Marcador	NA	PCR Cebadores	Rango alélico (pb)
<i>SW489</i>	6	CAAGTGTGAAATTTGTGCGG CGAAGTGCTAACTATAAGCAGCA	148 - 181
<i>SW2519</i>	10	CGTCTTCCCAGTAGGCTTTG GGATACTAAGTGTCTCCCCC	187 - 232
<i>SW780</i>	5	TCTACCAGCTAAATTGCTCACTG TAGGACCTGGAATATACTCCCTG	115 - 170
<i>SW2083</i>	4	AAATTTTGTGAGTTTTGTGTGGG ACACCTGAGAGTGTGTCTTGTAGC	143 - 167
<i>SW2019</i>	3	ATGATGCGAACCTGGAACCTC TATGTGTAAGTTGGTCCCATGC	127 - 147
<i>SW2410</i>	5	ATTTGCCCCCAAGGTATTTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	103 - 137
<i>S0215</i>	6	TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT	125 - 194
<i>SW72</i>	6	ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTC	97 - 119
<i>SW911</i>	5	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	147 - 177
<i>IFNG</i>	6	TGTTTCAGTGGGTTAAGGATCG TTCCCTACACCCTGCCTTC	221 - 245
<i>SW1041</i>	4	ATCAGAAAATGGTCAACAGTTCA GGAGAATTCCCAAAGTTAATAGG	93 - 101
<i>SWR345</i>	5	AACAGCTCCGATTCAACCC TACTCAGCCTTAAAAGGAAGGG	134 - 160
<i>TNFB</i>	9	TCCTTCTTCTCTCCCCAACAGTTT CTCAGCGAGTCCTCCTCATACTATC	142 - 203
<i>S0385</i>	6	CTATTAGGAGGGTTG AGTTCAGAAGCTGTTGCT	145 - 192
<i>SW787</i>	5	CTGGAGCAGGAGAAAGTAAGTTC GGACAGTTACAGACAGAAGAAGG	144 - 164
<i>S0090</i>	5	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	227 - 251
<i>SW1083</i>	6	CCTTGCTGGCCTCCTAAC CATACTCCAAAATTTCTATGTTGA	108 - 152
<i>SW957</i>	14	AGGAAGTGAGCTCAGAAAGTGC ATGGACAAGCTTGGTTTTCC	112 - 157
<i>SW2427</i>	6	GCATGTTATTGAGTTGATGTGTAGG TCGGAATTCCAGAAAATTGG	116 - 146
<i>SW1067</i>	4	TGCTGGCCAGTGAAGTCTG CCGGGGGATTAACAAAAG	137 - 175

Cuadro 2. Microsatélites tipificados, Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho), Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de probabilidad por desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg e Índice de fijación F_{IS} del cerdo doméstico de Sampedra (Sucre)

Marcador	He	Ho	PIC	HW (p value)	F_{IS}
SW489	0.5321	0.6449	0.5523	0.3823 ns	0.253
SW2519	0.7453	0.8638	0.6826	0.3182 ns	-0.192
SW780	0.3223	0.2497	0.5221	0.2982 ns	-0.224
SW2083	0.5624	0.4535	0.3357	0.0643 ns	-0.132
SW2019	0.3674	0.2513	0.2823	0.0032 *	-0.283
SW2410	0.6793	0.3714	0.5815	0.1137 ns	0.177
S0215	0.6017	0.5685	0.2947	0.0026 *	-0.072
SW72	0.2571	0.7636	0.6698	0.0012 *	-0.361
SW911	0.6867	0.7314	0.5628	0.6154 ns	-0.404
IFNG	0.5572	0.5488	0.5021	0.3442 ns	0.175
SW1041	0.7159	0.2365	0.5380	0.1834 ns	-0.368
SWR345	0.5830	0.5927	0.5133	0.3976 ns	-0.335
TNFB	0.2539	0.2425	0.3451	0.1211 ns	0.134
S0385	0.5938	0.6916	0.6142	0.0007 *	0.289
SW787	0.5356	0.7321	0.7055	0.2164 ns	-0.212
S0090	0.6504	0.6541	0.5186	0.3672 ns	0.126
SW1083	0.5544	0.4072	0.6867	0.1277 ns	-0.128
SW957	0.8583	0.6971	0.7252	0.2219 ns	-0.307
SW2427	0.7574	0.6816	0.6583	0.2293 ns	0.224
SW1067	0.1164	0.0241	0.6659	0.0016 *	0.387
	0.5465	0.5203	0.5478		-0.0627

ns: No significativo

* Marcadores que no están en equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0.05$)

dores presentan signo positivo y ocho presentan signo negativo. El F_{IS} promedio fue de -0.0627.

DISCUSIÓN

Los resultados revelan un elevado nivel de polimorfismo, demostrado en la cantidad y el promedio de alelos por *locus* obtenido.

Otros estudios de diversidad genética en cerdo reportan valores mayores como Pham *et al.* (2014) entre 9 y 20 alelos y un número medio de alelos de 15.1, así como valores menores como Chang *et al.* (2009) entre 2 y 6 alelos y un número medio de 3.7 alelos, Zaman *et al.* (2015) entre 2 y 11 alelos y un número medio de 6.5 alelos, y Cortés *et al.* (2016) entre 3 y 8 alelos y un número medio de 5.2 alelos.

Según Botstein *et al.* (1980), 16 de los 20 marcadores utilizados pueden ser considerados muy informativos ($PIC > 0.5$) para determinar la variabilidad genética en la población del cerdo doméstico en Sampués. Asimismo, cuatro marcadores son medianamente informativos (PIC entre 0.25 y 0.5). El valor medio de PIC en el presente estudio, resultó menor en comparación con datos previamente publicados en estudios realizados con cerdos de razas vietnamitas, indios y polacos (Pham *et al.*, 2014; Zaman *et al.*, 2015; Szmato³a *et al.*, 2016, respectivamente), similar a los reportados por estudios en cerdos nativos de China (Zhang *et al.*, 2003) y mayor al reportado por Chang *et al.* (2009) y Oh *et al.* (2014).

La proporción de individuos heterocigotos detectados en el presente estudio fue mayor al 50%, lográndose valores de 54.65% para la heterocigosidad media esperada y 52.03% para la heterocigosidad media observada (Cuadro 2), revelando un alto grado de variabilidad, evento que se considera ocurre, cuando los valores superan el 0.5. Este valor es menor a otros reportes (Pham *et al.*, 2014; Zaman *et al.*, 2015; Cortés *et al.*, 2016; Szmato³a *et al.*, 2016), similar a lo hallado por Zhang *et al.* (2003) y mayor al reportado por Chang *et al.* (2009) con un H_e de 0.375 y Oh *et al.* (2014) con un H_e de 0.439.

De los microsatélites examinados, 15 estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual muestra genéticamente estable a la población (Cuadro 2), y esto podría revelar que los cruzamientos en la población se originaron de forma azarosa, o si hay animales nuevos que se han añadido últimamente, estos descienden de poblaciones con igual acervo genético a los individuos de la población analizada (Wang, 2012). Cinco marcadores (*SW2019*, *S0215*, *SW72*, *S0385*, *SW1067*) mostraron desviación significativa respecto al equilibrio H-W, revelando un exceso de homocigotos, lo cual podría ser el resultado de eventos de endogamia al interior de la misma (Allendorf *et al.*, 2012). No obstante, la

endogamia afecta por igual todo el genoma por lo que se esperaría que si este fenómeno fuera el más trascendente, todos los marcadores utilizados deberían mostrar un exceso de homocigotos, cosa que no ocurre. Otra explicación para esta desviación podría ser la existencia del efecto Wahlund, lo cual mostraría la existencia de diferencias entre poblaciones contiguas de cerdo doméstico para los marcadores (*SW2019*, *S0215*, *SW72*, *S0385*, *SW1067*), pero no para los otros marcadores. La permanencia de las diferencias en estos microsatélites podría darse por el limitado flujo génico entre poblaciones cercanas. Asimismo, pudiera acontecer que los marcadores (*SW2019*, *S0215*, *SW72*, *S0385*, *SW1067*) se encuentran ligados a genes influenciados por selección natural. También puede darse la presencia de alelos nulos en dichos loci (Chapuis y Estoup, 2007), suceso descartable en este estudio por no haberse encontrado. Por último, pudo haber ocurrido un efecto fundador (arribaron pocos sementales que se reprodujeron mucho).

Los cálculos del estadístico F_{IS} para los 20 microsatélites, muestran ocho marcadores con signo positivo, revelando exceso de homocigotos, y 12 con signo negativo. El F_{IS} promedio de -0.0627 revela un bajo valor de exogamia, pero con un ligero exceso de heterocigotos. Los valores riqueza alélica y número medio de alelos por locus indican que dicha población muestra cierto grado de variabilidad.

Al no existir en Sampués, Sucre, reportes sobre la diversidad genética de *Sus scrofa domestica*, no se puede excluir la probabilidad de endogamia en esta población del Caribe colombiano.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten inferir que los microsatélites utilizados en la población de cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) en Sampués, Sucre, Colombia, muestran un alto

grado de polimorfismo. Igualmente, el gran número de marcadores con un PIC alto, posibilitan perfeccionar e implementar esta técnica para otros estudios dentro de la raza como la exploración genealógica y la asignación de individuos a poblaciones. Asimismo, los niveles de heterocigosidad esperada y observada revelan que muestra un alto grado de variabilidad genética.

LITERATURA CITADA

1. **Allendorf W, Luikart G, Aitken SN. 2012.** Conservation and the genetics of populations. 2nd ed. Massachusetts: Wiley-Blackwell. 624 p.
2. **Bosma A. 1976.** Chromosomal polymorphism and G-banding patterns in the wild boar (*Sus scrofa* L) from the Netherlands. *Genetica* 46: 391-399. doi: 10.1007/BF00128086
3. **Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
4. **Burgos W, Souza CA, Megens HJ, Ramayo Y, Melo M, Lemús C, Caal E, et al. 2013.** Porcine colonization of the Americas: a 60k SNP story. *Heredity* 110: 321-330. doi: 10.1038/hdy.2012.109
5. **Chang WH, Chu HP, Jiang YN, Li SH, Wang Y, Chen CH, et al. 2009.** Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers. *J Anim Sci* 87: 1-8. doi:10.2527/jas.2007-0562
6. **Chapuis MP, Estoup A. 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24: 621-631. doi:10.1093/molbev/msl191
7. **Cortés O, Martínez AM, Cañon J, Sevane N, Gama LT, Ginja C, et al., 2016.** Conservation priorities of Iberoamerican pig breeds and their ancestors based on microsatellite information. *Heredity* 117: 14-24. doi: 10.1038/hdy.2016.21
8. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011.** Draft guidelines on molecular genetic characterization of animal genetic resources. [Internet]. Available in: <http://www.fao.org/docrep/meeting/022/am652e.pdf>
9. **Giuffra E, Kijas JM, Amarger V, Carlborg O, Jeon JT, Andersson L. 2000.** The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154: 1785-1791.
10. **Hancock JM. 1999.** Microsatellites, evolution and applications. USA: Oxford University Press. 368 p.
11. **Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007.** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16: 1099-1106. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
12. **Kijas JM, Andersson L. 2001.** A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *J Mol Evol* 52: 302-308. doi: 10.1007/s002390010158
13. **Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, et al. 2005.** Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307: 1618-1621. doi: 10.1126/science.1106927
14. **Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. ICA. Censo pecuario nacional. Colombia. 2016.** [Internet]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2012.aspx>
15. **Oh JD, Cacho RG, Choi JY, Seo JH, Song KD, Vega RSA, et al. 2014.** Genetic analysis of Philippine native pigs (*Sus scrofa* L) using microsatellite loci. *Philippine J Sci* 143: 87-93.

16. **Peña M, Mora C. 1977.** Historia de Colombia. Bogotá: Ed Norma. 270 p.
17. **Pham LD, Do DN, Nam LQ, Van Ba N, Minh LT, Hoan TX, et al. 2014.** Molecular genetic diversity and genetic structure of Vietnamese indigenous pig populations. *J Anim Breed Genet* 131: 379-386. doi: 10.1111/jbg.12068
18. **Quiroz J, Martínez A, Marques J, Calderón J, Vega-Pla J. 2007.** Relación genética de la vaca Marismeña con algunas razas andaluzas. *Arch Zootec* 56: 449-454.
19. **Rousset F. 2008.** Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103-106. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
20. **Sambrook J, Russell DW. 2001.** Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344 p.
21. **Shanlian Q, Jichen C, Si L, Xinjian L. 2012.** A comparison of silver staining protocols for detecting DNA in polyester-backed polyacrylamide gel. *Braz J Microbiol* 43: 649-652. doi: 10.1590/S1517-83822012000200029
22. **Szmato³a T, Ropka K, Tyra M, Piórkowska K, Zukowski K, Oczkiewicz M, Blicharski T. 2016.** The genetic structure of five pig breeds maintained in Poland. *Ann Anim Sci* 16: 1019-1027. doi: 10.1515/aoas-2016-0006
23. **Wang J. 2012.** On the measurements of genetic differentiation among populations. *Genet Res* 94: 275-289. doi: 10.1017/S0016672312000481
24. **Weir BS. 2012.** Estimating F-Statistics: a historical view. *Philos Sc.* 79: 637-643. doi: 10.1086/667904
25. **Zaman G, Chandra M, Laskar S, Ferdoci AM, Rank DN. 2015.** Molecular characterization of Assam Local pig. *Indian J Biotech* 14: 416-419.
26. **Zhang GX, Wang ZG, Sun FZ, Chen WS, Yang GY, Guo SJ, et al., 2003.** Genetic diversity of microsatellite loci in fifty-six Chinese native pig breeds. *Acta Genet Sinica* 30: 225-233.