

J. Mata¹, A. Martínez², J.L. Vega-Pla³, L.A. Bermejo¹,
J.V. Delgado², C.J. Barba⁴

¹ Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad de La Laguna

² Departamento de Genética. Universidad de Córdoba.

³ Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Córdoba

⁴ Federación Nacional de Criadores de la Cabra Canaria. Telde. Las Palmas.



Asociación Nacional de Criadores
de la Cabra Canaria

Avances en el control genealógico de la Agrupación Caprina Canaria

INTRODUCCIÓN

La identificación de los animales, precisa y sin errores, es parte fundamental en todo proceso en el que se acumule información para hacer una posterior valoración de los individuos en función de la misma. Los errores en la asignación de paternidad tienen unas repercusiones negativas graves y contrastadas en la ganancia genética de los modelos en los cuales el modelo de evaluación a utilizar sea el modelo animal (Gelderman y cols., 1986; Wiggans y cols., 1988). Según Ron y cols. (1996) los errores en las asignaciones de paternidad observadas por distintos autores para ganado vacuno de leche europeo oscilan entre un 4 y un 30%.

Lo que *a priori* parece una premisa elemental, ha revelado ser uno de los puntos críticos en los planes de mejora de caprino, especialmente en lo relativo al control genealógico. En este sentido, en Canarias, concurren factores de diversa índole que agravan más aún el problema, pudiéndose destacar los siguientes :

- Manejo extensivo de grandes rebaños con monta natural libre y varios sementales simultáneamente.
- Hábitos arraigados de manejo reproductivo en animales estabulados que, aún cuando practican monta natural dirigida, usan simultánea o consecutivamente más de un semental para la cubrición, incluso cuando se trata de pequeños lotes de hembras.
- Escasa difusión de la práctica de técnicas reproductivas como la sincronización de celos y la inseminación artificial.

Desde la Asociación Nacional de Criadores de Cabra Canaria se aborda el problema del control de paternidad a corto y medio plazo a dos niveles:

- Planteándose prácticas de manejo en la cubrición basadas en la alternancia de machos que, por un lado, nos garanticen las asignaciones de paternidad con un porcentaje mínimo de error y por otro se interpongan en la menor medida posible con los hábitos de manejo e intereses del ganadero.
- Complementando el manejo anterior, en los casos de duda, con la determinación de la paternidad mediante el uso de marcadores genéticos .

En el presente trabajo se exponen, solamente, la metodología y los resultados obtenidos en el uso de una batería concreta de marcadores genéticos para la determinación de la paternidad.

Los marcadores genéticos son estructuras variables de unos individuos a otros que no han sido objeto de la selección dirigida por el hombre. Presentan, al menos, dos variantes detectables. La identificación de las variantes paterna y materna de un mismo marcador en distintos individuos, permite, en muchas ocasiones, diferenciarlos unos de otros y controlar la filiación de los mismos. Estos marcadores deben cumplir algunos requisitos:

- Ser estables a lo largo de la vida de un individuo,
- Estar controlados por un solo gen o locus genético
- Las técnicas empleadas para su caracterización deben ser científicamente probadas, reproducibles y precisas.

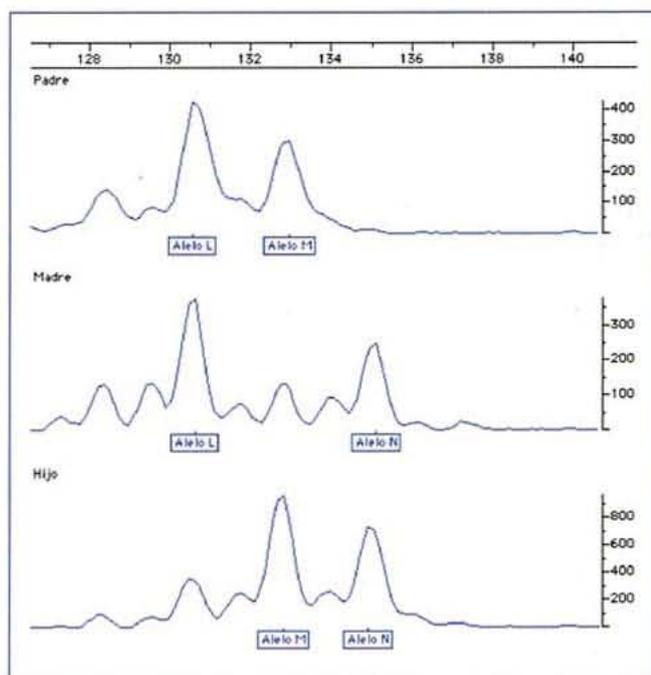
Tabla 1. Características de los microsatélites usados en tres reacciones múltiples

Marcador	Fluorocromo	Cebadores: directo y reverso	Tamaño (pb)	Referencia
BM8125	HEX	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG GGGGGTTAGACTTCAACATACG	00-127	Bishop <i>et al.</i> 1994
CSSM031	HEX	CCAAGTTTAGTACTTGTAAAGTAGA GACTCTCTAGCACTTTATCTGTGT	128-173	Moore <i>et al.</i> 1994
ILST005	HEX	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC	175-190	Brezinsky <i>et al.</i> 1993
CSSM066	TET	ACCAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTAATGCACTGAGGAGCTTGG	175-255	Moore <i>et al.</i> 1995
ILST011	TET	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	265-285	Brezinsky <i>et al.</i> 1993
McM53	FAM	GGAGTTGTAGAGTCAGATGA GACAAAGGTGATGTCAGGTGT	75-105	Smith <i>et al.</i> 1995
BM6526	FAM	CATGCCAAACAATATCCSGC TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	145-190	Bishop <i>et al.</i> 1994

- Son muy frecuentes y están repartidos por todo el ADN y, a menudo, presentando un alto grado de polimorfismo en cuanto al número de repeticiones de la secuencia.
- El modelo de herencia es mendeliano y los alelos detectados presentan codominancia.
- Se necesitan cantidades muy pequeñas de material biológico para la determinación de las variantes alélicas.

- Las técnicas empleadas para la detección de la variabilidad son muy simples en comparación con otras técnicas de investigación del polimorfismo del ADN.

Estas características han llevado a considerar a los microsatélites como los marcadores genéticos de elección para conseguir, no sólo la identificación y control de la genealogía, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas.

Gráfico 1. Representación familiar para un marcador genérico


MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales usados en este trabajo fueron hembras adultas, machos adultos y crías de ambos sexos de los tres tipos étnicos procedentes de La Finca del Pico del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, estando garantizada la variabilidad genética de los animales ya que se trata de un rebaño heterogéneo compuesto por individuos procedentes de distintas granjas y zonas de las islas. En total se ha trabajado con 113 muestras de sangre, siendo 24 procedentes del tipo palmero, 17 del tipo majorero y 72 del tipo tinerfeño. En este estudio básicamente se ha buscado valorar una batería concreta y contrastada de microsatélites que nos sirvan como herramienta eficaz en la asignación de paternidades dudosas, después de haber aplicado unas pautas específicas de manejo reproductivo. Dado el carácter eminentemente aplicado se ha recurrido a un panel de marcadores propuesto por Bragança y cols. (1999) para rumiantes domésticos en general.

Se extrae el ADN de una muestra sangre mediante lavados sucesivos en TE (Tris HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM, pH 8) y posterior digestión con Proteinasa K. Se am-

plifican específicamente los microsatélites con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, 1985), para ello se emplean cebadores marcados con fluorocromos que permitirán la caracterización alélica con un secuenciador automático «ABI 373». Se emplean reacciones de amplificación múltiples para aminorar los costes tanto de los reactivos como del tiempo empleados en la realización de la parte experimental de este trabajo.

Los microsatélites usados se exponen en la Tabla 1 así como los fluorocromos con los que han sido marcados cada uno de ellos.

Un sistema informático analiza los datos recogidos del secuenciador automático y proporciona información del tamaño de los fragmentos estudiados y se identifican las diferentes variantes presentes en cada uno de los microsatélites.

A partir de los datos obtenidos de la tipificación de cada individuo se siguen una serie de estudios y cálculos que permiten obtener una información muy valiosa de la población en estudio

Identificación individual: Este registro configura una fórmula genética que se espera sea distinta para cada uno de los ejemplares que se estudie. Permite comprobar en cualquier momento la identidad de un individuo sencilla-

mente comparando una nueva muestra con la fórmula que hay registrada.

Control genealógico: Se compara la fórmula genética de cada individuo con la de sus padres y se determina si puede o no ser hijo de ellos.

Cálculo de frecuencias alélicas: Se hace por recuento directo de las variantes presentes en el total de la muestra para un marcador concreto.

Contenido de Información Polimórfica (PIC): Este parámetro refleja el polimorfismo detectado y es un indicador de la calidad de los marcadores en estudios genéticos (de segregación, de identificación y control de paternidad, de población) Para su cálculo se usa la fórmula propuesta por Bolstein y cols., (1980).

Probabilidad de exclusión «a priori» (PE) y combinada (PEC): Es la probabilidad de un marcador para detectar a priori una paternidad falsa en una población concreta con unas frecuencias alélicas determinadas. Esta misma probabilidad expresada para una batería de marcadores se denomina probabilidad de exclusión combinada. Para calcular la probabilidad de exclusión por locus se usa la fórmula desarrollada por Jamieson (1994). La combinada resulta de multiplicar las probabilidades de los marcadores de la batería.

Tabla 2. Alelos y frecuencias alélicas encontrados para el total de la base muestral de los tres tipos de la A.C.C.

LOCUS	ALELOS (BP)	F	LOCUS	ALELOS (BP)	F
BM6526	H (168)	0,027	CSSM66	E (182)	0,115
	I (170)	0,069		G (186)	0,509
	G (166)	0,124		S (210)	0,076
	F (164)	0,023		T (212)	0,211
	S (190)	0,115		Z (222)	0,009
	Q (186)	0,198		J (242)	0,048
	M (178)	0,069		N (250)	0,014
	R (188)	0,350		I (240)	0,014
	L (176)	0,023			
BM8125	M (119)	0,050	ILSTS011	N (280)	0,733
	L (117)	0,469		P (284)	0,074
	K (115)	0,217		O (282)	0,098
	N (121)	0,201		M (278)	0,079
	P (125)	0,061		H (268)	0,014
CSSM31	S (145)	0,009	MCM53	Q (97)	0,078
	Q (141)	0,066		O (93)	0,417
	L (131)	0,447		U (105)	0,108
	P (139)	0,219		R (99)	0,139
	U (149)	0,066		P (95)	0,126
	V (151)	0,133		S (101)	0,008
	B (161)	0,057		T (103)	0,091
ILSTS005	M (181)	0,807	L (87)	0,008	
	N (183)	0,165	M (89)	0,021	
	L (179)	0,009			
	K (177)	0,013			

Tabla 3. Contenido de información polimórfica, probabilidad de exclusión y probabilidad de exclusión conjunta de los microsatélites estudiados

Locus	PIC	Nº de alelos	PE
BM6526	0,83	9	0,616
MCM53	0,75	9	0,519
CSSM31	0,69	7	0,507
BM8125	0,64	5	0,444
CSSM66	0,64	8	0,382
ILSTS011	0,41	5	0,256
ILSTS005	0,35	5	0,192
PEC			0,991

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados nos permiten hacer una valoración del interés que podrían tener estos microsatélites en la resolución de paternidades dudosas en la A.C.C., sobre todo como complemento de la aplicación de unas pautas adecuadas de apareamientos alternativos. (Gráfico 1)

En la Tabla 2 se recogen las frecuencias de las distintas variantes o alelos en cada marcador microsatélite para el total de la base muestral, estando expresados los alelos en pares de bases (bp) y las frecuencias (f) referidas a la unidad.

En la Tabla 3 se plasman los resultados de los cálculos hechos a partir de las frecuencias alélicas previas, para obtener el PIC y la PE de cada uno de los marcadores tipificados así como la probabilidad de exclusión combinada (PEC) de la totalidad de los mismos.

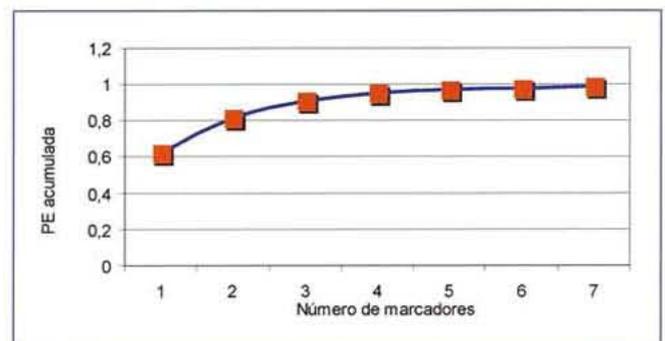
Tal y como se observa en la tabla los marcadores se han ordenado de mayor a menor en cuanto a su contenido de información polimórfica y en cuanto a su poder de exclusión, siendo clara la correlación positiva entre ambos parámetros.

Otro aspecto destacable (Gráfico 1) es la evolución de la PEC vista de forma progresiva, según se van incorporando microsatélites de mayor a menor de acuerdo con sus probabilidades de exclusión, con lo cual observamos como la probabilidad de exclusión combinada aumenta muy significativamente al principio para hacerlo de forma muy menos relevante en los últimos.

En cualquier caso, probabilidades de exclusión combinada de los niveles obtenidos parecen más que suficientes para hacer discriminaciones entre los posibles padres ya que en nuestro caso, todas las paternidades dudosas fueron resueltas con éxito.

La batería de microsatélites utilizada demuestra ser plenamente eficaz para la determinación de paternidades dudosas y asumible económicamente en el contexto del plan de mejora de la A.C.C., especialmente si se plantea asociada a las pautas de manejo reproductivo propuestas.

Gráfico 2. Evolución progresiva de la probabilidad de exclusión de la batería de marcadores



Asociación Nacional de Criadores de la Cabra Canaria

Cura Gordillo, 13
35210 Telde (Gran Canaria)

Tel.: y Fax: 928 69 28 71
E-mail: cjbc@mixmail.com