

Grupo de Investigación «Mejora y Conservación de los Recursos Genéticos de los Animales Domésticos» (AGR-218) Plan Andaluz de Investigación
 Amparo Martínez Martínez¹, Juan Vicente Delgado Bermejo² y José Luís Vega Pla³

¹ Laboratorio de Genética Molecular Aplicada, Investigadora del Departamento de Genética, Universidad de Córdoba (España)

² Profesor Titular del Departamento de Genética, Universidad de Córdoba (España)

³ Laboratorio de Investigación Aplicada, Servicio de Cría Caballar y Remonta. Ministerio de Defensa, Córdoba (España), Universidad de Córdoba



Universidad
de Córdoba

Definición de un panel específico de microsatélites para control genealógico de las razas de Ovinos Precoces

INTRODUCCIÓN

El Grupo de Investigación del Programa Andaluz de Investigación denominado «Mejora y Conservación de los Recursos Genéticos de los Animales Domésticos» (AGR218) tiene como objetivo general la mejora y la conservación de las poblaciones de animales domésticos. Son dos conceptos fuertemente vinculados entre sí y que dependen del tamaño de la población implicada. Así aspectos como el desarrollo de la población, su estado de definición, el desarrollo tecnológico y formativo de sus ganaderos, entre otros hacen que una población demande medidas de mejora o de conservación.

El grupo AGR218 viene trabajando intensamente en la investigación y desarrollo de medidas de esta naturaleza en poblaciones de ganado. Entre los distintos aspectos tratados destacan los siguientes:

1. La organización de la recogida de la información productiva, ambiental y genealógica en poblaciones locales.
2. La implantación de medidas de apoyo al control genealógico con el uso de marcadores moleculares.
3. La caracterización genética de las poblaciones de animales domésticos, basada en caracteres productivos, morfológicos y marcadores genéticos. Estos estudios se han realizado en diversas especies de animales domésticos como son ovinos, caprinos, bovinos, porcino, aves o abejas.
4. El diseño de esquemas de selección y programas integrales de mejora genética de las poblaciones locales de ganado (Oveja Segureña, Cabra Murciano-Granadina, Caballo Hispano-Árabe, etc.)

5. La creación y gestión de bancos de germoplasma con fines de conservación, conexión genética de los rebaños y difusión de la mejora (Cerdo Ibérico, Caballo Hispano-Árabe, Caballo de las Retuertas, Vaca Marismeña, etc.)
6. La transferencia de tecnología y conocimientos alcanzados en estos campos en el ámbito europeo mediante la participación en proyectos europeos, en el Iberoamericano con la coordinación de una RED CYTED (XII-H) con participación de varios países europeos y latinoamericanos y también en el ámbito nacional participando en proyectos de investigación junto con investigadores de otras regiones españolas como Murcia, Cataluña y Canarias.

Marcadores moleculares

Un individuo de una población determinada presenta una serie de características que difieren del resto y que se incrementan a medida que las relaciones de parentesco son menores; esto conduce a que dos poblaciones que dejan de intercambiar material genético mediante el apareamiento, lleguen con el tiempo a presentar caracteres comunes a todos los miembros de cada una de ellas pero diferentes entre las dos. El conocimiento de la secuencia del ADN en puntos concretos puede poner en evidencia el grado relativo de distanciamiento que están teniendo dichas poblaciones. A estos puntos que presentan variación se les denomina marcadores genéticos. Dentro de ellos los microsatélites son un tipo de marcadores muy empleados en los estudios de genética de poblaciones. Se trata de repeticiones en tándem de motivos simples (ejemplo (TG)_n, donde 10 < n < 30)



Son muy frecuentes y están repartidos por todo el ADN y a menudo, presentando un alto grado de variabilidad en cuanto el número de repeticiones de la secuencia; el modelo de herencia es común y las variantes presentes son codominantes; las técnicas empleadas para la detección de la variabilidad son muy simples en comparación con otras técnicas de investigación del ADN; se necesitan cantidades muy pequeñas de ADN para la determinación de las variantes, incluso aunque esté bastante degradado. Estas características han llevado a considerar a los microsatélites como los marcadores de elección para conseguir, no sólo un método fiable de identificación individual y de control de las genealogías, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas.

Desde mediados de 1980 la verificación de la paternidad viene siendo utilizada para el control y saneamiento de los registros genealógicos y en el comercio internacional de especies domésticas como el ganado vacuno y equino. Actualmente los laboratorios de genética prácticamente han sustituido las técnicas clásicas de grupos y polimorfismos sanguíneos por la tipificación de secuencias microsatélites. Los avances técnicos en el análisis de ADN y la eficacia de la metodología han facilitando su rápida implantación.

Como la forma de herencia de cada microsatélite es codominante, un individuo no puede tener un determinado alelo si éste no está presente en al menos uno de sus progenitores. Cualquier alelo no materno debe proceder del padre, y si el supuesto padre carece de este alelo no puede ser el verdadero padre. Cuando se comparan los genotipos de un marcador, obtenidos en un individuo y sus progenitores, las combinaciones posibles originan diversos dictámenes: Compatible, No padre ni madre, No padre, No madre, No padre o madre, Compatible sin tener en cuenta la madre o Compatible sin tener en cuenta el padre.

Probabilidad de exclusión

La exclusión de un progenitor es cierta al 100% cuando no hay posibilidad de transmisión de un determinado alelo presente en el individuo por parte del supuesto progenitor, aunque se acepta que ante la posibilidad de una mutación inesperada se debería excluir un progenitor o ambos con

más de un marcador. En el caso de que no se detecte ninguna incompatibilidad en los marcadores analizados, se considera al progenitor como compatible y por lo tanto válido para figurar como tal en los registros genealógicos animales. Para demostrar la fiabilidad del dictamen de compatibilidad se procede a la selección de una batería de marcadores con una probabilidad de exclusión *a priori* alta en la población a la que pertenecen los progenitores y el individuo en cuestión.

Uno de los primeros planteamientos para hacer pruebas de paternidad fiables, es la necesidad de detectar la mayoría de paternidades falsas que se presenten. Para la evaluación de la capacidad de un marcador de excluir una paternidad falsa se han desarrollado fórmulas dependiendo de la necesidad de excluir un sólo progenitor o los dos.

La eficacia de un sistema genético para dilucidar un test de paternidad, viene determinada por la probabilidad de exclusión (PE) de dicho sistema en una población y está en función del polimorfismo del sistema y de las frecuencias de los alelos que lo componen. La combinación de las probabilidades de exclusión de los diferentes *loci* (PEC), tiene un valor que se utiliza para determinar la eficacia *a priori* de un conjunto marcadores genéticos para resolver casos de paternidad discutible en una población dada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 100 animales de la raza ovina Merino Precoz y 100 de la raza Fleischschaf. El ADN se ha extraído de muestras de sangre mediante el Kit BLOODCLEAN de Purificación de ADN (BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratorios, S.A. Madrid, España) siguiendo las indicaciones del fabricante para este kit.

Se han amplificado 28 microsatélites (Tabla 1) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Los fragmentos obtenidos mediante la PCR se han sometido a una electroforesis en un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente.

La Probabilidad de Exclusión *a priori* por marcador (PE) y para el conjunto de los marcadores (PEC) se ha calculado con el programa informático Cervus 2.0 (Marshall y cols., 1998)

RESULTADOS

En la tabla 1 se pueden ver los resultados para los 28 microsatélites utilizados. El marcador ETH10 es monomórfico para las dos razas estudiadas por lo que no se tendrá en cuenta para estudios de control genealógico de las mismas. El marcador TGLA126 se desvía significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg, por lo que a pesar de mostrar un alto número de alelos y unos valores altos de Heterocigosidad, PIC, PE1 y PE2, tampoco este marcador se incluirá en el panel para control genealógico.

Tabla 1. Microsatélites analizados, número de alelos por marcador (NA), Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), Contenido de Información Polimórfica (PIC), Probabilidad de Exclusión conociendo sólo uno de los progenitores (PE1) , conociendo los dos progenitores (PE2)

Microsatélite	NA	Ho	He	PIC	PE1	PE2
ETH10	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	0,000
OarFCB304	9	0,5476	0,5259	0,4549	0,143	0,272
ETH225	4	0,6000	0,6143	0,5419	0,188	0,334
RM006	4	0,5952	0,5793	0,5284	0,177	0,338
D5S2	4	0,5595	0,6252	0,5714	0,211	0,376
TGLA122	9	0,4881	0,5974	0,5608	0,207	0,383
McM527	6	0,5714	0,6552	0,5919	0,238	0,396
MAF65	6	0,6118	0,6785	0,6143	0,251	0,411
OarCP34	7	0,6250	0,6623	0,6169	0,256	0,431
INRA35	6	0,6235	0,7070	0,6466	0,277	0,442
BM6506	5	0,7143	0,7015	0,6477	0,279	0,450
BM6526	6	0,6824	0,6986	0,6533	0,287	0,465
INRA6	9	0,6000	0,6949	0,6534	0,291	0,473
BM8125	6	0,6941	0,7198	0,6688	0,304	0,477
OarCP20	7	0,6941	0,7231	0,6817	0,321	0,501
ILSTS11	6	0,7738	0,7391	0,6919	0,325	0,502
BM1824	5	0,7529	0,7515	0,7066	0,342	0,520
INRA63	9	0,7024	0,7466	0,7109	0,359	0,540
MAF209	9	0,7500	0,7576	0,7212	0,365	0,547
BM1818	10	0,7091	0,7788	0,7436	0,399	0,579
CSRD247	10	0,7765	0,7886	0,7524	0,406	0,584
OarFCB11	10	0,7105	0,7866	0,7531	0,408	0,588
OarFCB48	11	0,6588	0,7768	0,7499	0,410	0,593
SPS115	8	0,7882	0,7958	0,7612	0,415	0,594
CSSM66	10	0,7647	0,7967	0,7637	0,423	0,601
TGLA53	10	0,7711	0,8283	0,8003	0,477	0,650
TGLA126	12	0,5854	0,8289	0,8024	0,486	0,658
HSC	11	0,8000	0,8664	0,8464	0,563	0,723
Media	7,50	0,6482	0,6937	0,6513	0,9999	1,0000

De estos 28 microsatélites se han seleccionado 12 con objeto de minimizar el precio y el tiempo empleados en realizar los controles genealógicos (Tabla 2) La Probabilidad de Exclusión Combinada *a priori* (PEC) del panel de microsatélites empleado es 0,9998 cuando se conocen los dos progenitores, disminuyendo este valor hasta 0,9928 cuando sólo se conoce uno de ellos.

El panel de microsatélites es eficaz para realizar controles de filiación en las razas de ovinos Precoces, habiéndose obtenido una Probabilidad de Exclusión Combinada *a priori* (PEC) de 0,9998. El valor que se obtiene cuando sólo se dispone de uno de los progenitores (PEC1) es inferior (0,9928) con lo que disminuye la eficacia del panel de marcadores a la hora de detectar un progenitor falsamente

Tabla 2. Panel de 12 microsatélites, número de alelos por marcador (NA), Probabilidad de Exclusión conociendo sólo uno de los progenitores (PE1) y conociendo los dos progenitores (PE2)

Microsatélite	NA	PE1	PE2
CSRD247	10	0,406	0,584
D5S2	4	0,211	0,376
HSC	11	0,563	0,723
INRA63	9	0,359	0,540
MAF209	9	0,365	0,547
MAF65	6	0,251	0,411
McM527	6	0,238	0,396
OarCP20	7	0,321	0,501
OarCP34	7	0,256	0,431
OarFCB304	9	0,143	0,272
OarFCB11	10	0,408	0,588
OarFCB48	11	0,410	0,593
Media	8,25	0,9928	0,9998

atribuido. Esto significa que se pueden resolver el 99,98% de los controles de filiación cuando se conocen los dos progenitores, y sólo el 99,28% de los controles si solo se dispone de uno de los progenitores. Sólo un reducido número de controles de filiación no podrían resolverse utilizando este panel de 12 microsatélites. Para resolver estos casos se ha diseñado un segundo panel de microsatélites adicional.

A veces se requiere hacer asignaciones de paternidades y/o maternidades, Para hacer estas asignaciones se ha probado ya la eficacia de este mismo panel de microsatélites y en las primeras pruebas realizadas ha mostrado ser eficaz, pudiéndose asignar correctamente más de un 85% de los padres y madres. En los casos en que no se puede asignar la paternidad o maternidad (dos o más padres o madres compatibles) habrá que analizar, además del panel principal, el panel de microsatélites adicional.

BIBLIOGRAFÍA

Marshall, TC, Slate, J, Kruuk, L & Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5): 639-655.



A. E. C. O. P.

Asociación Española de Criadores de Ovinos Precoces (AECOP)

Castelló, 45 - 2º Izda.

28001 Madrid

Tel.: 91 575 12 25

Fax: 91 431 83 03

E-mail: ovinosprecoces@aecop.es

www.aecop.es