

Amparo Martínez Martínez¹, José Antonio Puntas², José Luis Vega-Pla³, Vincenzo Landi⁴, Gregorio García² y Juan Vicente Delgado Bermejo¹

¹ Departamento de Genética Universidad de Córdoba.

² Asociación Nacional de Criadores de Ovino Segureño.

³ Laboratorio de Genética Molecular. Servicio de Cría Caballar y Remonta. Córdoba

⁴ Universidad de Perugia (Italia)



Resultados del control de filiación en la raza ovina Segureña

INTRODUCCION

Utilización de los microsatélites en control de filiación

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.

Los microsatélites se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, son muy abundantes, exhiben gran polimorfismo y son fáciles de identificar, estas circunstancias hacen que se utilicen como marcadores genéticos y son los que han despertado más interés para realizar pruebas identificación individual, control de paternidad y para la caracterización de poblaciones.

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.** El individuo es compatible con la madre y el padre propuestos. El genotipo del individuo es fruto de la combinación de los alelos presentes en los genotipos de ambos progenitores.

- **No padre ni madre.** El individuo es incompatible con la madre y con el padre propuestos. El genotipo del individuo no puede de ninguna manera surgir de la combinación alélica de los genotipos de los progenitores.

- **No padre.** El individuo es compatible con la madre propuesta pero incompatible con el padre propuesto. El



padre no comparte ningún alelo con el individuo, sin embargo la madre sí lo hace.

- **No madre.** El individuo es compatible con el padre propuesto pero incompatible con la madre propuesta. La madre no comparte ningún alelo con el individuo, sin embargo el padre sí lo hace.

- **No padre o madre.** Uno de los dos progenitores propuestos es incompatible con el individuo, pero no se puede determinar cual de ellos es el incompatible. En este caso uno de los alelos del genotipo del individuo está presente en ambos progenitores pero el otro no está en ninguno de ellos. No se puede saber cuál de ellos aportó dicho alelo.

- **Compatible sin tener en cuenta la madre.** El individuo es compatible con el padre pero se ha realizado el control de filiación sin tener en cuenta la madre por diversos motivos (madre muerta, desconocida, etc.).

- **Compatible sin tener en cuenta el padre.** El individuo es compatible con la madre pero se ha realizado el control de filiación sin tener en cuenta el padre por diversos motivos (padre muerto, desconocido, etc.).

Ejemplo:

Casos posibles de dictamen

| | Genotipos | | | | |
|-----------|------------|----------|----------|-------------------|------------------|
| Padre | N Q | N P | N O | I R | M P |
| Madre | K P | M M | L L | M R | L P |
| Hijo | K N | M O | J N | N P | O P |
| Resultado | Compatible | No padre | No madre | No padre ni madre | No padre o madre |

Caso de un cordero compatible con sus padres con siete microsátélites

| microsátélite | CRSD247 | HSC | MAF65 | MAF209 | BM8125 | TGLA122 | ILSTS11 |
|---------------|---------|-----|-------|--------|--------|---------|---------|
| Padre | NQ | NO | NO | IR | MP | JS | KN |
| Madre | KP | MM | LL | MR | LO | SU | NR |
| Hijo | KN | MO | LN | MR | LP | SU | NN |

Caso de exclusión de un padre y una madre con ocho microsátélites

| Marcador | Potro | Padre 1 | Padre 2 | Madre 1 | Madre 2 | Exclusiones |
|----------|-------|---------|---------|---------|---------|-----------------------|
| CRSD247 | IR | MQ | QR | NN | IN | No padre1 ni madre 1 |
| HSC | MN | NN | NN | KM | LM | |
| MAF65 | MO | NO | NO | LO | MO | No padres o madre 1 |
| MAF209 | MM | MQ | MQ | LQ | MM | No madre 1 |
| BM8125 | OP | OP | OP | OP | PQ | |
| TGLA122 | II | IU | IU | KT | IJ | No madre 1 |
| ILSTS11 | MO | MO | MO | MR | OR | |
| TGLA122 | NO | PR | OP | PQ | NP | No padre 1 ni madre 1 |

Dictamen: El cordero es compatible con el padre 2 y la madre 2. Se excluyen el padre 1 y la madre 1.

Las pruebas de verificación de la paternidad tienen enfoques distintos en el hombre y los animales, a pesar de usar la misma metodología. En ambos casos 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.

Se podría dar el caso de la necesidad de demostrar la fiabilidad del dictamen de compatibilidad. Se trata de algo habitual en los casos de pruebas de paternidad en el hombre en los que la compatibilidad de un padre debe ir acompañada por una probabilidad de paternidad *a posteriori*. Es un cálculo complejo que no suele ser empleado en mundo animal y que se suple con una estrategia que consiste en la selección de una batería de marcadores con una probabi-

lidad de exclusión *a priori* alta en la población a la que pertenecen los progenitores y el individuo en cuestión.

Probabilidad de exclusión

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 combinación de la probabilidad de exclusión de varios marcadores permite escoger los más indicados para llegar fácilmente a valores del 0,999.

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.

La raza ovina Segureña cuenta con una Asociación de Criadores (ANCOS) con sede en Huéscar (Granada) y desde 1999 se viene desarrollando un esquema de selección. Dentro de las actividades que se desarrollan en dicho esquema, se encuentra el control de filiación de los animales del núcleo selectivo de la raza. El objetivo de realizar tales controles de filiación es obtener una información genealógica precisa con la que se podrán realizar valoraciones genéticas más fiables de los animales que garanticen un mayor progreso genético de la raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 1.000 animales de la raza ovina Segureña inscritos en el Libro Genealógico y pertenecientes al núcleo selectivo. El ADN se ha extraído de muestras de sangre mediante el Kit BLOODCLEAN de Purificación de ADN (BIOTOOLS – Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Madrid, España), siguiendo las indicaciones del fabricante para este kit.

Para realizar los controles se ha utilizado un panel de 10 marcadores microsatélites (Tabla 1). Los microsatélites se han amplificado en 2 reacciones múltiplex 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 Analysis 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). El control de filiación se ha realizado comparando la fórmula genética del cordero con la del padre y la de la madre propuestos.

RESULTADOS

Se han analizado todos los machos utilizados para Inseminación Artificial y se ha comprobado su filiación siempre que ha sido posible. Se han realizado controles en 18 ganaderías. En total se han realizado 480 controles de filiación.

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 utilizado ha resultado eficaz para resolver prácticamente todos los controles de filiación realizados. Solamente en un caso se ha obtenido un dictamen de «No Padre o Madre» y este caso se ha resuelto introduciendo un segundo panel de microsatélites adicional.

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) y conociendo los dos progenitores (PE2)

| Microsatélite | NA | Ho | He | PIC | PE1 | PE2 |
|-----------------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| CSRD247 | 13 | 0.768 | 0.801 | 0.771 | 0.438 | 0.613 |
| HSC | 14 | 0.893 | 0.889 | 0.875 | 0.626 | 0.771 |
| MAF209 | 11 | 0.652 | 0.650 | 0.610 | 0.250 | 0.428 |
| MAF65 | 6 | 0.688 | 0.713 | 0.662 | 0.293 | 0.466 |
| SPS115 | 7 | 0.685 | 0.772 | 0.734 | 0.381 | 0.559 |
| BM8125 | 6 | 0.820 | 0.762 | 0.725 | 0.367 | 0.548 |
| BM1824 | 6 | 0.676 | 0.705 | 0.657 | 0.289 | 0.464 |
| CSSM66 | 14 | 0.838 | 0.856 | 0.835 | 0.540 | 0.703 |
| ILSTS011 | 7 | 0.568 | 0.599 | 0.570 | 0.213 | 0.396 |
| TGLA122 | 10 | 0.598 | 0.744 | 0.713 | 0.361 | 0.545 |
| <i>Media</i> | 9.40 | 0.719 | 0.749 | 0.715 | 0.9928 | 0.9998 |

Los resultados obtenidos en las 18 ganaderías analizadas se observan en la Tabla 2. El 82,2% de los corderos han resultado compatibles bien con los dos progenitores propuestos o bien con sólo uno de ellos (padre o madre). Se han encontrado un 17,8 % de incompatibilidades, tanto con ambos progenitores como con sólo uno de ellos (padre o madre).

En la tabla 3 pueden observarse los resultados de los controles de filiación por ganaderías. En algunas ganaderías no pudo comprobarse la filiación registrada en el Libro Genealógico (columna SC) por no disponerse de las muestras de los progenitores.

Tabla 2: Resultados de los controles de filiación

| | |
|---|-------------|
| Dictamen | |
| Compatible (C) | 311 (64,9%) |
| Compatible sin tener en cuenta la madre (CSM) | 46 (9,6%) |
| Compatible sin tener en cuenta el padre (CSP) | 37 (7,7%) |
| No Padre (NP) | 41 (8,5%) |
| No Madre (NM) | 17 (3,5%) |
| No Padre ni Madre (NPNM) | 28 (5,8%) |

Tabla 3: Resultados de los controles de filiación por ganaderías

| GANADERÍA | NCF | C (%) | CSM (%) | CSP (%) | NP (%) | NM (%) | NPNM (%) | SC (%) |
|-----------|-----|-------|---------|---------|--------|--------|----------|--------|
| 1 | 28 | 35,7 | 14,3 | — | — | — | 3,6 | 46,4 |
| 2 | 40 | 62,5 | 10 | — | 10 | 7,5 | 10 | — |
| 3 | 60 | 66,7 | 10 | 6,7 | 3,3 | 8,3 | 5 | — |
| 4 | 17 | 76,4 | — | 5,9 | 5,9 | 5,9 | 5,9 | — |
| 5 | 44 | 50 | 6,8 | 29,6 | — | 4,5 | 6,8 | 2,3 |
| 6 | 7 | 57,1 | — | 28,6 | — | — | — | 14,3 |
| 7 | 33 | 33,3 | 6,1 | 6,1 | 45,4 | — | 9,1 | — |
| 8 | 1 | — | — | — | — | — | 100 | — |
| 9 | 23 | 30,4 | 17,4 | 26,1 | 4,3 | — | 4,3 | 17,4 |
| 10 | 19 | 63,2 | 5,3 | 10,5 | 10,5 | — | 5,3 | 5,3 |
| 11 | 17 | 88,2 | 5,9 | — | 5,9 | — | — | — |
| 12 | 7 | 100 | — | — | — | — | — | — |
| 13 | 37 | 62,2 | 2,7 | 2,7 | 13,5 | 5,4 | 13,5 | — |
| 14 | 43 | 74,4 | 20,9 | 4,7 | — | — | — | — |
| 15 | 39 | 79,4 | 10,3 | — | 2,6 | 2,6 | 5,1 | — |
| 16 | 48 | 68,7 | 12,5 | 4,2 | 6,2 | — | 4,2 | 4,2 |
| 17 | 35 | 65,6 | 5,7 | 8,6 | 8,6 | 2,9 | 2,9 | 5,7 |
| 18 | 7 | 57,1 | 14,3 | — | 28,6 | — | — | — |

NCF: Número de controles de Filiación realizados en cada ganadería; C: Compatible; CSM: Compatible sin tener en cuenta la madre; CSP: Compatible sin tener en cuenta el padre; NP: No padre; NM: No madre; NPNM: No padre ni madre; SC: no se realiza el control de filiación.

DISCUSIÓN

El panel de microsatélites es eficaz para realizar controles de filiación en la raza ovina Segureña, 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 atribuido.

Se han resuelto todos los controles de filiación realizados excepto uno, en el que se obtuvo un dictamen de «No padre o madre». Para resolver este control ha sido necesario analizar un panel de microsatélites adicional.

En 7 ganaderías no se ha podido realizar el control de filiación por diversas razones como son que la madre y el padre propuestos ya habían muerto cuando se realizó la toma de muestras o bien habían sido vendidos a otra ganadería o se desconocía la identidad del padre, de la madre o de ambos. Este último caso es el más frecuente en el caso de los machos del centro de Inseminación Artificial (Ganadería 1).

En el 82,2% de los casos, los corderos han resultado compatibles con los progenitores propuestos, mientras que en un 17,8% de los casos, el cordero es incompatible con los dos progenitores propuestos o con uno de ellos. Este resultado global es esperanzador pues indica que en las ganaderías analizadas hasta el momento, el registro de las genealogías por parte de los ganaderos es acertado, aunque cuando se analizan los resultados por ganadería se observan discrepancias (Tabla 3). Llama la atención el alto porcentaje de incompatibilidades con el padre encontrado en las ganaderías 7 y 18. En el caso de la ganadería 7, además hay un 9,1% de incompatibilidades con el padre y con la madre. Todos los animales a los que se les ha realizado control de filiación son de Inseminación Artificial, por lo que se podría pensar en un error en el registro de la Inseminación Artificial. En el caso concreto de la ganadería 7, se

emplearon varios machos para inseminar y todos ellos tienen hijos compatibles e incompatibles, con lo que se descartaría un posible error en la inseminación. El hecho de que en esta misma ganadería se encuentre un 9,1% de los casos incompatibles con el padre y con la madre hace pensar más bien en un registro de genealogías deficiente. En cualquier caso, los resultados aconsejan un registro más estricto de las ovejas inseminadas para disminuir estos casos de incompatibilidades.

El porcentaje de incompatibilidades con la madre detectadas es un 3,5% (Tabla 2), lo que en principio no es un mal resultado e indica que en general, el registro de las maternidades es más eficaz que en el caso de las paternidades (8,5% de incompatibilidades). Se ha encontrado un 5,8 % de casos de incompatibilidad de padre y madre, que podría ser debido a un cambio de corderos al nacimiento.

Durante este año se seguirán analizando más ganaderías pertenecientes al núcleo selectivo y se analizarán también animales en monta natural, para lo que será necesario 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de Raza Segureña



***Pol. de la Encantada, s/n
18830 Huéscar (Granada)
Tel. 958 74 13 16 • Fax: 958 74 05 03
Email: ancosh@terra.es***