

Evaluación de un panel de microsatélites para el control de filiación en razas caprinas españolas de aptitud cárnica

P.J. Azor*, M. Luque**, M. Valera***, M. Herrera****, A. Membrillo*, E. Rodero****, A. Molina*

* Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Edif. Mendel, Pl. Baja. Campus de Rabanales. Ctra. N-IV Km 396a. 14071. Córdoba. España. E-mail: ge2azorp@uco.es

** Departamento de Agricultura. Dirección de Producción y Sanidad Animal. FAO. Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma. Italia.

*** Departamento de Ciencias Agroforestales. EUITA Universidad de Sevilla. España.

**** Departamento de Producción Animal. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Ctra. N-IV Km. 396a. 14071. Córdoba. España

Resumen

Hemos evaluado el potencial de 20 microsatélites para la realización de los controles de filiación (paternidad y/o maternidad) de las razas caprinas españolas de aptitud cárnica. En base a sus condiciones técnicas hemos seleccionado nueve para este fin para poder compatibilizar la eficiencia con el coste económico. La mayor parte de los marcadores son de origen bovino. De los marcadores seleccionados se han calculado los valores del Contenido de Información Polimórfica (PIC), y las probabilidades de exclusión (PE), por marcador y conjuntas, de un progenitor falso dado como verdadero a partir de las frecuencias alélicas de 30 individuos no emparentados de cada una de las 6 razas caprinas españolas de aptitud cárnica estudiadas (un total de 180 individuos): Moncaína, Blanca Andaluza, Negra Serrana, Blanca Celtibérica, Pirenaica y Azpi Gorri. Todos los marcadores seleccionados han sido informativos en estas razas. La probabilidad de exclusión conjunta cuando solo un progenitor es conocido ha oscilado entre el 96,4 % en la raza Moncaína y 98,9 % en la raza Blanca Celtibérica siendo en todas las razas superior al 99% cuando se conocen los dos progenitores y queremos testar si la descendencia está asignada correctamente.

Palabras clave: Prueba de paternidad, probabilidades de exclusión, microsatélite, *C. hircus*

Summary

Assessment of a microsatellite marker set for parentage testing in six Spanish goat breeds

We have analysed 20 microsatellite markers on six Spanish goat populations bred for meat production. Nine loci were selected for parentage testing due to technical reasons. Polymorphic Informative Content (PIC) and parentage exclusion probabilities per marker and for the whole marker set were computed on allele frequencies from a total of 180 unrelated individuals (30 per breed) belonging to six Spanish goat breeds: Moncaína, Blanca Andaluza, Negra Serrana, Blanca Celtibérica, Pirenaica and Azpi Gorri. The nine markers selected were informative. In order to quantify the usefulness of the microsatellite set for parentage testing, we calculated exclusion probabilities for the two most likely scenarios: a) combined probability of exclusion of a parent when the other is known; and b) combined probability of exclusion when both parent are known and one of them is false. The exclusion probability for the scenario a) varied from 96.4 % (Moncaína breed) to 98.9 % (Blanca Celtibérica breed); the exclusion probabilities for the scenario b) were always higher than 99%.

Key words: paternity testing, exclusion probabilities, microsatellites, *C. hircus*

Introducción

La cría en sistemas de explotación extensivos de las razas caprinas de carne constituye una opción de aprovechamiento de las zonas de producción más marginales, principalmente zonas de montaña, no aptas para cultivos o el aprovechamiento por otras ganaderías. Este tipo de explotación está dirigido a la obtención de un cabrito paschal o lechal en función de factores no dependientes del productor. Todas las razas de aptitud cárnica que se explotan en España están catalogadas como razas de protección especial y sus censos siguen en franca regresión a pesar de representar unos recursos genéticos de gran relevancia por su especial adaptación al medio en que se desenvuelven y constituyen una base para la fijación de población en el territorio. En la cabaña actual existe una preocupante tasa de cruzamiento entre ellas y con razas de aptitud lechera. La realización del Proyecto de Investigación "Caracterización y evaluación de razas caprinas autóctonas españolas de orientación cárnica" (RZ01-010-C3), INIA, Ministerio de Educación y Ciencia, ha permitido constatar el estado actual de estas razas en estos tres últimos años (Azor et al., 2005).

En los últimos tiempos se asiste a una reorganización del sector en el que la Administración está jugando un papel muy importante. Se han formado las Asociaciones de Ganaderos de cada una de las razas para la llevanza de los respectivos Libros Genealógicos así como establecer unos planes de conservación y mejora de las mismas. La reorganización de los agentes implicados en la conservación y la recuperación de las razas adaptadas a hábitat de especiales características, configuran un punto de partida prometedor si se perfilan objetivos de selección compatibles con las condiciones del medio en que se mantienen y apuestan

por la obtención de un producto de calidad, la canal de un cabrito diferenciada.

Para ello se hace imprescindible la valoración y calificación de los animales para su reconocimiento de pertenencia a una raza determinada y poder ser inscritos en el correspondiente Libro Genealógico. Por todo ello y siendo la integridad del pedigrí, esencial en cualquier plan de cría que se lleve a cabo, hemos estudiado un panel de marcadores moleculares de tipo microsatélite común a seis razas caprinas españolas de aptitud cárnica (Negra Serrana, Blanca Celtibérica, Azpi Gorri, Blanca Andaluza, Moncaína y Pirenaica) con el fin de asegurar y verificar la correcta asignación de paternidades y maternidades de los animales que se inscriban en los libros genealógicos.

Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multi/locus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones, siendo especialmente estos estudios los referidos a: análisis de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza, planificación de apareamientos y otros aspectos de índole reproductiva (Jones et al., 1986). Todos ellos deben reunir una serie de características que maximizen su utilidad (Cheng y Crittenden, 1994).

El número de microsatélites que deberían ser usados en los controles de filiación es todavía objeto de discusión y depende de las características de cada locus y de la variabilidad de la raza objeto de estudio (Double et al., 1997).

El objetivo de este trabajo es proponer un panel de microsatélites para su uso rutinario de una forma fiable, fácil y barata en los controles de filiación de la cabaña caprina española de aptitud cárnica.

Material y métodos

Toma de muestras

Hemos utilizado 30 animales no emparentados y pertenecientes a diferentes ganaderías de cada una de las seis razas estudiadas. En total se han muestreado 180 animales. La raza Negra Serrana (NS) fue muestreada en las provincias de Albacete y Jaén, la Blanca Celtibérica (BC) en Albacete y Murcia, de la raza Blanca Andaluza (BA) se tomaron muestras en varias provincias de Andalucía, de las razas Pirenaica (PI) y Moncaína (MO) los animales muestreados fueron de Aragón y los animales muestreados de la raza Azpi Gorri (AG) fueron del País Vasco.

A estos animales se les tomó una muestra de sangre mediante punción de la vena yugular utilizando tubos Vacutainer de 5 ml con EDTA_{K₂}. Las muestras fueron almacenadas congeladas hasta la extracción del ADN.

Extracción de ADN y amplificación de los microsatélites

El DNA se extrajo de sangre utilizando el método "salting out" (Miller *et al.*, 1988) o utilizando Chelex 100 Resin, según describió Walsh *et al.* (1991) añadiéndole proteinasa K.

Se han amplificado 20 microsatélites: BM2504, BMS2626, BMS356, BMS522, BMS975, CSSRM60, CSSM008, CSSM015, CSSM43, CSSRM66, ETH225, HMH1R, ILSTS011, INRA026, LSCV29, MCM527, OARCP23, RBP3, TGLA126 y TGLA53. Casi todos ellos son de origen bovino y han sido amplificados en ganado ovino (Azor *et al.*, 2004; Bragança *et al.*, 1999; Valle *et al.*, 2004).

Las reacciones de amplificación *in Vitro* de los fragmentos de ADN se llevaron a cabo en tubos de 0,2 mL en un termociclador de gradiente Mastercycler® eppendorf utilizando 30 ciclos de desnaturalización a 95° C

(5 min), hibridación a una temperatura entre 55 y 60° C durante 30 segundos y un paso de extensión a 72° C durante 30 segundos. El primer paso de desnaturalización se llevó a cabo a 95° C durante 5 min y el último paso de extensión se prolongó durante 1 hora a 72° C.

La mezcla de PRC de volumen final de 10 µL contenía buffer de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mezcla de dNTPs, de 0,2 a 2 pmol de cebadores marcados con fluorocromos y cebadores sin marcar y 1U de *Taq* Polimerasa (Biotools®). Las amplificaciones se llevaron a cabo en seis reacciones múltiples de PCR. Los fragmentos fueron separados en un secuenciador automático capilar ABI 3100 y posteriormente tratados con el programa informático Genotyper 3.7.

Análisis estadístico

Con el objeto de evaluar la capacidad de los 20 microsatélites y elegir un panel reducido de ellos, pero lo suficientemente poderoso para su uso en los controles de filiación de las razas caprinas españolas de aptitud cárnica, hemos calculado las probabilidades de exclusión para dos situaciones que se presentan de forma común en esta especie. En el primer caso hemos calculado la probabilidad de exclusión cuando un progenitor es conocido, que casi siempre suele ser la madre, y tenemos que testar si el padre es el padre biológico (PE_A). Para ello hemos utilizado la fórmula 1a de Jameison y Taylor (1997). En el segundo caso hemos calculado la probabilidad de exclusión cuando ambos padres son conocidos y queremos testar si la descendencia está falsamente asignada (PE_B). En este caso hemos utilizado la fórmula de Chakravarti y Li (1983). Los cálculos de las probabilidades de exclusión se han realizado para cada marcador en cada una de las razas, así como de forma conjunta (PE_C) para el panel de marcadores en cada

una de las razas. Para ello hemos utilizado el programa informático Cervus 2.0 (Marshall et al., 1998).

El contenido de información polimórfica (PIC) ha sido calculado mediante el método descrito por Botstein et al. (1980) utilizando el programa informático Molkin (Gutiérrez et al., 2005).

Resultados

De todos los datos obtenidos de los 20 microsatélites utilizados, hemos seleccionado un panel de nueve con el que se consigue un poder suficiente para su utilización de forma sistemática en los controles de filiación en esta especie. Los resultados obtenidos indican que todos los marcadores utilizados han sido polimórficos. La diversidad alélica de los marcadores seleccionados ha oscilado entre 6,67 en la raza Blanca Andaluza y 9,11 en la raza Azpi Gorri. Los valores del PIC oscilaron entre 0,381 del marcador TGLA53 en la raza Moncaína y 0,875 del marcador CSSRM66

en la raza Azpi Gorri. Todos los marcadores han sido altamente informativos salvo el marcador BMS975 en la raza Blanca Celtibérica y el marcador TGLA53 en las razas Moncaína, Negra serrana, Pirenaica y Azpi Gorri en las que ha manifestado ser medianamente informativo (Botstein et al., 1980). En las razas Blanca Andaluza y Blanca Celtibérica todos los marcadores fueron altamente informativos (tabla 1). Los valores de probabilidad de exclusión conjunta cuando se desconoce uno de los progenitores (PE_c) han oscilado entre 96,4 % la raza Moncaína y 98,9 % en la raza Blanca Celtibérica. Los valores inferiores de PE_c se corresponden con las razas que presentan los valores de heterocigosidad esperada más bajos (datos no mostrados). Lo mismo ocurre con los valores de PE_c cuando los dos progenitores son conocidos. En todas las razas analizadas los valores de probabilidad de exclusión conjunta cuando se conocen el padre y la madre han sido superiores al 99 %.

Todos los valores de las probabilidades de exclusión individuales y conjuntas se presentan en la tabla 2.

Tabla 1. Número de alelos (K) y Contenido de Información Polimórfica (PIC) por locus en cada una de las razas

Table 1. Number of alleles (K) and Polymorphic Information Content per locus in each goat breed

Microsatélite	CMO		CBA		CNS		CBC		CPI		CAG	
	k	PIC										
BMS356	4	0,668	5	0,699	6	0,726	6	0,676	4	0,680	6	0,622
BMS975	7	0,624	5	0,539	6	0,647	5	0,479	8	0,700	10	0,689
HMH1R	9	0,674	9	0,629	8	0,645	10	0,751	8	0,673	11	0,767
ILSTS011	8	0,596	6	0,591	6	0,541	6	0,612	7	0,691	7	0,711
INRA026	9	0,658	8	0,840	9	0,805	10	0,840	11	0,811	8	0,750
MCM527	6	0,680	7	0,701	6	0,615	7	0,723	7	0,705	11	0,837
TGLA53	3	0,381	6	0,558	8	0,477	10	0,579	6	0,429	8	0,422
CSRM60	6	0,745	7	0,733	9	0,776	7	0,815	6	0,715	8	0,579
CSSRM66	12	0,810	7	0,775	9	0,732	14	0,880	14	0,844	13	0,875

Tabla 2. Probabilidad de exclusión a priori cuando se conoce un parental (PE_A) y cuando se conocen ambos (PE_B) y probabilidades de exclusión conjuntas (PE_C) para cada locus en cada una de las razas estudiadas

Table 2. Exclusion probability when a parent is unknown (PE_A) and when both parents are known (PE_B) and combined probabilities of exclusion (PE_C) for each locus in each breed

Microsatélite	CMO		CBA		CNS		CBC		CPI		CAG	
	PE_A	PE_B										
BMS356	0,295	0,467	0,328	0,503	0,365	0,543	0,308	0,481	0,306	0,479	0,260	0,433
BMS975	0,268	0,433	0,195	0,346	0,283	0,452	0,144	0,304	0,342	0,526	0,332	0,515
HMH1R	0,316	0,500	0,270	0,448	0,283	0,457	0,411	0,589	0,314	0,489	0,433	0,611
ILSTS011	0,236	0,416	0,239	0,397	0,194	0,354	0,249	0,423	0,330	0,508	0,356	0,537
INRA026	0,299	0,490	0,546	0,710	0,492	0,664	0,551	0,713	0,503	0,672	0,405	0,584
MCM527	0,314	0,488	0,341	0,519	0,254	0,425	0,371	0,551	0,347	0,530	0,547	0,709
TGLA53	0,099	0,211	0,202	0,371	0,143	0,316	0,222	0,412	0,112	0,273	0,109	0,271
CSRM60	0,389	0,568	0,384	0,565	0,441	0,618	0,500	0,671	0,354	0,531	0,222	0,397
CSSRM66	0,503	0,673	0,433	0,611	0,380	0,558	0,638	0,779	0,568	0,725	0,628	0,772
PE_C	0,964	0,997	0,975	0,998	0,970	0,998	0,989	0,999	0,983	0,999	0,987	0,999

Discusión

El presente estudio describe la utilidad de nueve marcadores microsatélites para la utilización en los controles de filiación de seis razas de cabras españolas de aptitud cárnica con la finalidad de asegurar la veracidad de los registros incluidos en los correspondientes Libros Genealógicos. Para ello es de suma importancia el cálculo de la probabilidad de exclusión en cada una de las diferentes razas (Marklund et al., 1994).

Una probabilidad de exclusión conjunta del 99 % es estadísticamente potente pero para poder alcanzarla, sobre todo cuando sólo se conoce uno de los progenitores, se requiere un mayor número de marcadores. Hemos calculado las probabilidades de exclusión para dos situaciones comunes en los controles de filiación de las razas caprinas de aptitud cárnica y hemos obtenido unos valores superiores para aquellos casos en los que se conocían los dos progenitores que para los casos en los que solo se conocía un parental en todas las razas analizadas. En otros trabajos se ha evaluado la utilidad de marca-

dores microsatélites para la realización de los controles de filiación en otras razas caprinas (Luikart et al., 1999), ovinas (Tomasco et al., 2002) y equinas (Marklund et al., 1994; Luis et al., 2002; Binns et al., 1995). Las probabilidades de exclusión actúan, sin embargo, sólo como referencia para orientarnos acerca del poder de las pruebas de filiación bajo situaciones dadas de progenitores candidatos y disponibilidad de muestras. La prueba será menos fiable o poderosa si los padres candidatos están emparentados o si estamos ante una situación en la que el padre no se conoce. A pesar de todo, estos nueve marcadores son útiles para verificar un padre imputado o excluirlos a todos los falsamente imputados con una probabilidad alta. Incluso en la mayoría de las situaciones más usuales, en las que sólo hay un pequeño número de machos candidatos y en algunas ocasiones estos machos candidatos están emparentados entre ellos.

Por lo tanto, los nueve microsatélites permitirán un rápido y eficiente screening, espe-

cialmente por poder ser amplificados en reacciones de PCR múltiple y subsecuentemente se pueden someter a electroforesis juntos en un secuenciador automático. La asignación de la filiación de los cabritos usando microsatélites es una herramienta útil para el manejo de los Libros Genealógicos, esencial para la conservación de estas razas y para futuros planes de mejora genética que se puedan plantear.

En este trabajo hemos dado sugerencias en cuanto a al número y cuáles son los marcadores a usar. Ahora habría que sopesar el poder de exclusión con el esfuerzo y el coste económico requerido para su utilización de forma rutinaria, aspecto muy importante en estas razas.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto de investigación "Caracterización y evaluación de razas caprinas autóctonas españolas de orientación cárnica" (RZ01-010-C3), INIA, Ministerio de Educación y Ciencia.

Bibliografía

- Azor PJ, Molina A, Barajas F, Arranz JJ, Valera M, Rodero A, Miguélez JJ, 2004. Estimación del nivel de diferenciación genética de la raza merina mediante ADN Microsatélite. *FEAGAS*. Vol. 25, pp: 92-98.
- Azor PJ, Monteagudo LV, Luque M, Tejedor MT, Rodero E, Sierra I, Herrera M, Rodero A, Arruga MV, 2005. Phylogenetic relationships among Spanish goats breeds. *Animal Genetics* 36 (5), 423-425.
- Binns MM, Holmes NG, Holliman A, Scott AM, 1995. Identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in Thoroughbred parentage testing. *Br. Vet. J.* 151: 9-15.
- Botstein D, White RL, Skolnick MH, Davies RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-31.
- Bragança P, Arranz JJ, San Primitivo F, 1999. Diseño de un sistema "Multiplex" para el control de parentesco en rumiantes domésticos. VIII Jornadas sobre Producción Animal. AIDA. Zaragoza. España.
- Chakravarti A, Li CC, 1983. The effect of linkage on paternity calculations. In Inclusion Probabilities in Parentage Testing, ed. RH Walker. *American Association of Blood Banks: Arlington, Virginia*.
- Cheng HH, LB Crittenden, 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.
- Double MC, Cockburn A, Barry SC, Smouse PE, 1997. Exclusion probabilities for single-locus paternity analysis when related males compete for matings. *Mol. Ecol.* 6: 1155-1166.
- Gutiérrez JP, Royo LJ, 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.
- Jamieson A, Taylor SCS, 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400.
- Jones NH, ML Clabby, DP Dialynas, HJS Huang, LA Herzenberg, JL Strominger, 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323: 346-349.
- Luikart G, Biju-Duval MP, Ertugrul O, Zagdsuren J, Mandet C, Taberlet P, 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes of parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics*. 30, 431-438.
- Luis C, Cothran EG, Oom MM, 2002. Microsatellites in portuguese autochthonous horse breed: usefulness for parentage testing. *Genet Molec Biol* 25(2): 131-134.

- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L, 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25: 19-23.
- 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.
- Miller SA, DD Dikes, HF Polesky, 1988. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 215.
- Tomasco I, Wlasiuk G, Lessa EP, 2002. Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genet. Mol. Biol.*, vol.25, no.1, p. 37-41.
- Valle J, Azor PJ, Valera M, Arranz JJ, Molina A, 2004. Análisis de la variabilidad genética de la raza montesina mediante marcadores de ADN. *FEAGAS*. Vol. 25, pp: 99-105.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10 (4): 506-13.
- (Aceptado para publicación el 2 de mayo de 2006)