

## Evaluación en ganado Braford de los marcadores microsatélites sugeridos por FAO/ISAG para pruebas de paternidad

Arellano, W<sup>1</sup>; Sifuentes, A<sup>2</sup>; Parra, G<sup>2</sup>; Garcidueñas, R<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

<sup>2</sup>Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México.

Arellano [warellano820506@hotmail.com.mx](mailto:warellano820506@hotmail.com.mx); Parra [pabraman@hotmail.com.mx](mailto:pabraman@hotmail.com.mx); Sifuentes [asifuentes@ipn.mx](mailto:asifuentes@ipn.mx); Garcidueñas [rgarcidu@yahoo.com.mx](mailto:rgarcidu@yahoo.com.mx)

### Resumen

La industria de ganado bovino de registro se basa en la comercialización de pie de cría con registro genealógico (pedigrí), lo que indica, de cierta manera, su valor genético. Para ello es necesaria la correcta identificación de los individuos que conforman cada población sometida a evaluación y el conocimiento preciso de las relaciones de parentesco entre ellos, requisito indispensable para la estimación de parámetros y valores genéticos que permitan el diseño de estrategias objetivas de mejoramiento genético. Los marcadores moleculares son herramientas útiles para determinar el parentesco entre individuos. La eficiencia del resultado en la prueba de paternidad en sistemas de producción animal, no es dependiente del número de marcadores microsatélites utilizado, sino del nivel informativo que estos marcadores estén proporcionando. Dentro del panel de marcadores microsatélites estudiado, el marcador BM6444 mostró el menor PIC (0.6109), y por consiguiente la menor PE2 (0.2463), siendo el marcador menos polimórfico, ya que sólo fue capaz de detectar 7 alelos. El marcador que mostró mayor PIC fue INRA040 (0.9310), así como para los valores de Ho y He (0.8556 y 0.9401 respectivamente), detectando 23 alelos de los cuales el alelo 170 fue detectado en 17 individuos con una frecuencia de 0.0992, convirtiéndolo en el marcador con mayor nivel de PE2 (0.7665). Los microsatélites apropiados para la raza Braford no son quizá los adecuados para otras razas, motivo por el cual se hace necesario establecer un panel de marcadores altamente informativos de acuerdo a la raza que se desee evaluar.

**Palabras clave:** Microsatélites, Pruebas de paternidad, Braford

### Abstract

The registered beef cattle industry is based on the animals with pedigree commercialization, as an indicator of its genetic value. The correct identification of individuals conforming the population is necessary, as the correct knowledge of the relationships among them is, since this is an essential requirement for the genetic parameters and breeding value estimations and the objective genetic improvement strategies design. The molecular markers are important and useful tools in parentage testing. The efficiency of the results in the parentage testing in animal production systems is not only dependent on the molecular marker number used, but on their informative level. On the results of the marker panel analyzed, the marker BM6444 showed the lower PIC (0.6109), as a consequence it showed the minimum PE2 (0.2463), being the less polymorphic marker, it was only capable to detect 7 alleles. INRA040 was the marker showing the greatest PIC, Ho and He values (0.9310, 0.8556 and 0.9401, respectively). This marker showed 23 alleles, with allele 170 detected in 17/88 individuals with a frequency of 0.0992, logging it as the marker with major level of PE2 (0.7665). In brief, the appropriate microsatellite panel for the Braford breed parentage testing it's not the adequate for other cattle breeds or vice versa; for this reason it's necessary to establish a set of highly informative markers according to each breed to be evaluated.

**Key words:** microsatellites, parentage testing, Braford

### Introducción

Las explotaciones de ganado vacuno de carne en sistemas extensivos enfrentan dificultades básicas, provenientes de la precariedad técnica en las mismas, reflejada al momento de implementar cualesquier tipo de manejo dentro del hato; por ejemplo, el escaso uso de la inseminación artificial (IA), y la practica de la monta natural mediante empadre múltiple (Díaz *et al.*, 1995; Ramírez y Rios, 1997). En cierto sentido la industria de ganado bovino de registro se basa fundamentalmente en la comercialización de sementales y pie de cría con registro genealógico (pedigrí), lo que indica su valor genético. Para ello es necesaria la correcta identificación de los individuos que conforman cada población sometida a evaluación y el conocimiento preciso de las relaciones de parentesco entre ellos, requisito indispensable para la estimación de parámetros y

valores genéticos que permitan el diseño de estrategias objetivas de mejoramiento genético (Dentine, 1999; Ron *et al.*, 1996; Caballero y Toro, 2000; Cardoso *et al.*, 2004). En los sistemas de producción extensivos es obligado el establecimiento de pruebas de paternidad como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos (Uffo, 2003). Si la paternidad de los animales no es confiable o verificada dentro de estos sistemas de evaluación, los errores tanto de datos de producción como de pedigrí pueden afectar negativamente las tasas de mejoramiento genético. Los marcadores moleculares constituyen hoy una herramienta poderosa para el viejo arte de la selección (Cornide *et al.*, 2000). Entre sus aplicaciones inmediatas se encuentran la identificación de parentesco o de identidad y la caracterización de la diversidad genética (Kappes *et al.*, 1997; Peelman *et al.*, 1998; Vankan *et al.*, 1999; Blancou 2001; Cunningham *et al.*, 2001; Kovak, 2001; Salazar *et al.*, 2004; Uffo, 2003). Una de las ventajas de estos marcadores versus otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que (Cheng y Crittenden, 1994), son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes, son fáciles de medir y analizar, y son cien por ciento fiables, repetitivos y automatizables. Además, se han establecido como una herramienta valiosa para el diseño de pruebas de laboratorio para la identificación de individuos (Peelma *et al.*, 1998). En base a lo referido se realizó el presente estudio con el objetivo de evaluar, en una población de ganado Braford manejada bajo empadre múltiple, la pertinencia de utilizar 19 marcadores microsatélites sugeridos por FAO-ISAG para la determinación de la paternidad en ganado bovino.

### Materiales y Métodos

Se tomaron muestras de sangre a 88 bovinos de raza Braford (33 crías, 33 hembras y 22 machos), pertenecientes a un rancho productor de pie de cría ubicado en el Municipio de San Juan de Sabinas Coahuila, México. El aislamiento de ADN se realizó mediante el DNA Purification System de la compañía Promega Wizard<sup>(R)</sup>. Para el análisis genético de las muestras, se probó un panel de 19 marcadores microsatélites (BMS1987, D1S34, D2S26, MAF70, HEL5, ILSTS005, INRA23, INRA37, TGLA44, OarFCB11, TGLA53, D15, BMS1866, ETH225, TGLA126, INRA040, TGLA431, BM6444, MAF36) disponibles en el CBG y recomendados por la FAO-ISAG para llevar a cabo estudios de pruebas de paternidad en bovinos (FAO, 1998). De ellos se seleccionaron los que se consideraron adecuados, tomando como criterios de selección la heterocigosidad observada (Ho) y el contenido de información polimórfica (PIC). Los microsatélites empleados fueron marcados con fluorescencia infrarrojo (IRD800), lo que permitió su posterior análisis en un equipo semiautomático marca LI-COR (Modelo 42001G). La amplificación del ADN se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para analizar los tamaños alélicos, los productos de PCR se separaron en gel de poliacrilamida-bisacrilamida desnaturalizante al 6.5% y con el programa computacional SAGA GT se obtuvo el tamaño y número de alelos. Para el análisis estadístico de la diversidad genética se evaluaron: a) El número de alelos por locus en los loci que amplificaron y su valor medio, b) Los valores de Heterocigosidad esperada (He), y Heterocigosidad observada (Ho) en cada locus, c) El valor de contenido de información polimórfica (PIC) en cada locus y su valor medio, d) La probabilidad de exclusión de paternidad con la ausencia del genotipo de uno de los padres (PE1), la probabilidad de exclusión de paternidad (PE2) para cada locus. Todos estos parámetros se calcularon para cada marcador microsatélite con el uso del programa *CERVUS*, versión 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007), el cual evalúa la facilidad de asignar la paternidad al padre más probable mediante módulo de simulación en el que se establecen los criterios Delta; dependiendo de los valores de Delta obtenidos en la simulación, y definiendo la proporción de falsos positivos en las asignaciones (nivel de confianza 80 “estricto” y 95% “alta astringencia”), e) La probabilidad combinada de exclusión para todos los loci (PEC2), con la ecuación propuesta por Jaimenson y Taylor, (1997):  $P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \dots (1 - P_K)$ , Donde, P= probabilidad combinada de exclusión de paternidad del panel de loci utilizados, K= número total de loci dentro del panel utilizado.

### Resultados y Discusión

La eficiencia del resultado en la prueba de paternidad en sistemas de producción animal, no es dependiente del número de marcadores microsatélites utilizado, sino del nivel informativo que estos marcadores estén proporcionando. El nivel informativo de un microsatélite es determinado por el valor del PIC, He, Ho y la PE2 para cada locus, estos valores dependen del número de alelos y de la distribución de las frecuencias de estos en la población bajo estudio. Basados en estas consideraciones se seleccionaron solamente 9 de los 19 marcadores sugeridos, los restantes 10 no produjeron bandas de amplificación o arrojaban bajos niveles de heterocigosidad. El nivel informativo obtenido de los marcadores microsatélites utilizados para asignar la paternidad en este estudio se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Nivel informativo de los marcadores microsatélites utilizados en la asignación de paternidad

Marcador Microsatélite	No de alelos	Rango alélico (pb)*	Ho	He	PIC	PE2
BM6444	7	145-159	0.5604	0.6661	0.6109	0.2463
INRAO40	23	120-204	0.8556	0.9401	0.9310	0.7665
INRA23	10	195-213	0.8000	0.8534	0.8323	0.5373
D15	12	235-257	0.8022	0.8855	0.8690	0.6104
D2S26	14	114-149	0.6098	0.8245	0.7999	0.4838
TGLA126	11	114-139	0.8315	0.8324	0.8074	0.4931
TGLA53	13	149-175	0.4205	0.8399	0.8159	0.5102
INRA37	12	120-146	0.6932	0.8186	0.7939	0.4733
HEL5	11	155-179	0.6087	0.8485	0.8252	0.5252

\*pb: pares de bases, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, PIC: Contenido de Información Polimórfica, PE2: Probabilidad de exclusión.

Dentro del panel de marcadores microsatélites estudiado, el marcador BM6444 mostró el menor PIC (0.6109), y por consiguiente la menor PE2 (0.2463), siendo el marcador menos polimórfico, ya que sólo fue capaz de detectar 7 alelos, de los cuales el alelo 149 se encontró en 41 individuos con una frecuencia de 0.4615, compartiendo el fenotipo heterocigoto con el alelo 151 el cual se encontró en 31 individuos con una frecuencia de 0.2424. El marcador que mostró un mayor PIC fue el INRAO40 (0.9310), así como para los valores de Ho y He (0.8556 y 0.9401 respectivamente), detectando 23 alelos de los cuales el alelo 170 fue detectado en 17 individuos con una frecuencia de 0.0992, el alelo 172 en 16 individuos con la misma frecuencia y el 178 en 16 individuos con una frecuencia de 0.0931, convirtiéndolo en el marcador con mayor nivel de PE2 (0.7665). Los resultados obtenidos en el presente estudio no concuerdan con los obtenidos en otras razas de ganado de carne como Beefmaster (De la Rosa, 2003; Salazar, 2002), ganado Angus Rojo, Simental (Sherman *et al.*, (2004), Brahman (Riojas *et al.*, 2006) Montesco (Martínez *et al.*, 2005), Gyr (Curi y Lopes, 2002), ni en ganado Holstein (Heyen *et al.*, 1977), lo que indica que la serie de marcadores recomendada por FAO/ISAG puede ser eficiente para la asignación de paternidad en las distintas razas de ganado, aunque no todos los marcadores tienen la misma eficiencia ni todos ellos son de utilidad en cualquier raza. En el cuadro 2 muestra la Probabilidad Combinada de Exclusión de paternidad del panel de marcadores seleccionado, con la cual se estaría asignando al padre más probable con una probabilidad de 99.89%, similar o superior a las reportadas por (Ron *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2005; Curi y Lopes, 2002; Riojas *et al.*, 2006), entre otros.

Cuadro 2. Probabilidad Combinada de Exclusión del panel de microsatélites utilizado para la asignación de paternidad en ganado Braford.

Marcador Microsatélite	1M*	2M*	3M*	4M*	5M*	6M*	7M*	8M*	9M*
BM6444	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463
INRAO40		0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665
INRA23			0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373
D15				0.6104	0.6104	0.6104	0.6104	0.6104	0.6104
D2S26					0.4838	0.4838	0.4838	0.4838	0.4838
TGLA126						0.4931	0.4931	0.4931	0.4931
TGLA53							0.5102	0.5102	0.5102
INRA37								0.4733	0.4733
HEL5									0.5252
PEC2**	0.2463	0.8240	0.9185	0.9682	0.9836	0.9916	0.9959	0.9978	0.9989

M\*: Número de marcadores microsatélites, PEC2 \*\*: Probabilidad de Exclusión Combinada.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se asume que con el panel de 9 marcadores microsatélites es posible determinar con una alta precisión las relaciones de parentesco en una población de ganado Braford manejada bajo empadre múltiple. Los marcadores INRAO40, D15 y TGLA53 mostraron los mayores PIC y PE2, a diferencia del marcador BM6444 el cual fue el menos informativo para esta raza. Los

microsatélites apropiados para la raza Braford no son quizá los adecuados para otras razas, motivo por el cual se hace necesario establecer un panel de marcadores altamente informativos de acuerdo a la raza que se deseé evaluar, los marcadores seleccionados deberán ser utilizados en trabajos subsecuentes para la verificación de maternidad y asignación de paternidad, permitiendo estructurar las familias de cada hato.

### Literatura Citada

- Blancou J. 2001. A history of the traceability of animals and animal products. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics* 20: 420-425.
- Caballero A, Toro MA. 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetical Research*. 75: 331-343.
- Cardoso FF, Tempelman RJ. 2004. Genetic evaluation of beef cattle accounting for uncertain paternity. *Livestock Production Science*. 89: 109-120.
- Cheng HH, Crittenden LB. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.
- Cornide MT, y colectivo de autores. 2002. Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. (en línea) [http://www.cnic.edu.cu/pub\\_biot.htm](http://www.cnic.edu.cu/pub_biot.htm) [consulta octubre del 2006]
- Cunningham EP, Meghen CM. 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics*. 20: 491-499.
- Curi RA, Lopes CR. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines. *Animal Science* 39: 129-135.
- De la Rosa, RFX. 2003. Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Reynosa Tamaulipas México. 28-32 p.
- Dentine MR. 1999. Marker-assisted selection. In: *The genetics of cattle*. Fries R. and Ruvinsky A. (eds). CABI Publishing London, England 497-511 p.
- Díaz C, Carabaño JM, Hernandez D. 1995. Connectedness in genetic parameters estimation and BV prediction. In: 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Prague, 4-8 Sept.
- FAO. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: Management of small population at risk, FAO. Rome.
- Heyen WD, Becver EJ, Da Y, Evert ER, Green C, Bates ERS, Ziegler SJ, Lewin ATL. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellites markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Animal Genetics* 28: 21-27.
- Jaimenson A, Taylor STCS. 1997. Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400
- Kalinowski TS, Toper LM, Marshall CT. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw R.A, Sonstegard TS, Smith TPL. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7: 235-249.
- Kovak J. 2001. Bovine microsatellite multiplexing for herd evaluation and parentage with LI-COR IR2 and SAGA GTTM. (en línea) <http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8734.html> [consulta octubre del 2006]
- Martínez MA, Calderón J, Camacho E, Rico C, Vega-Pla LJ, Delgado VJ. 2005. Caracterización genética de la raza Bovina Mostrenca con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 54: 357-361.
- Peelman LJ, Mortiaux F, Van Zeveren A, Dansercoer A, Mommns G, Coopman F, Bouquet Y. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics* 29: 161-167.
- Ramirez GAJ, Rios RGJ. 1997. Tecnologías reproductivas de vanguardia aplicadas a la ganadería bovina. En *Memorias: Primer Foro de los Análisis de los Recursos Genéticos de la ganadería Bovina*. 17 al 19 de Noviembre. Cd. de México D.F. p. 49-69.
- Riojas VVM, Gomez FJC, Salinas MJA, Montes De Oca LR, Wong GA. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *CIENCIA UANL*, 9: 41-50.
- Ron M, Blanc Y, Band M, Ezra E, Weller J. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science* 79: 676-681.
- Salazar MEL. 2002. Evaluación de nueve marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamaulipas.

- Salazar MEL, Gonzales PM, Del Bosque GA, Resendez PD, Barrera SHA, Sifuentes RAM. 2004. Evaluación de marcadores microsatelitales para la identificación de individuo, en dos razas de ganado bovino de carne de la región noreste de México. *Técnica Pecuaria México* 42: 429-453.
- Sherman BG, Kachman S, Hungerford LL, Rupp PG, Fox PC, Brown DM, Feuz MB, Halm RT. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Animal Genetics* 35: 220-226.
- Uffo RO. 2003. Aplicación de los marcadores al estudio de la biodiversidad del ganado bovino cubano. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias veterinarias, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, La Habana, Cuba. p. 20-23-28.
- Vankan DM, Faddy MJ. 1999. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. *Animal Genetics* 30: 355-361.