ASIGNACION INDIVIDUAL CON UN METODO DE GENOTIPOS MULTILOCUS EN BOVINOS

Quiroz Valiente J[1] , Martínez Martínez A.[2],Martínez R. D. [3], Armstrong E.[4] , Calderón J[5] . Delgado Bermejo J.V.[2]. [1] INIFAP-México. [2] Depto. de Genética, Universidad de Córdoba. España. [3] Universidad Nacional de Lomas De Zamora. Argentina. [4] Universidad de la República, Uruguay. [5] Estación Biológica Doñana. España

INTRODUCCION

Uno de los factores que contribuye a la pérdida de diversidad es el económico. Recientemente, los sistemas de producción basados en explotación intensiva y razas de rápido crecimiento, son controvertidos por diversas razones, como el impacto ecológico de la producción, salud animal y sistemas sostenibles. Todo ello ha potencializado el interés en la conservación genética y el uso de razas autóctonas en los círculos ambientalistas, por estar ligadas a lo denominado en los últimos años, como desarrollo sostenible, lo cual, va relacionado con la adaptación de estas razas a su lugar de origen y con una mayor calidad de los productos y trabajos que ofrecen al hombre. La conservación de estas razas de ganado destacan que por su resistencia a enfermedades, gran fertilidad, buenas cualidades maternas, longevidad y adaptación a situaciones difíciles y a alimentos de baja calidad; características todas ellas deseables para una agricultura sostenible, con bajos insumos y para el logro de la seguridad alimentaria. Cada día va aumentando la necesidad de introducir razas domésticas en pastoreo, para preservar la riqueza ambiental, florística y faunística. La raza Marismeña, se mantiene asilvestrada en los municipios de Almonte e Hinojosa de Huelva, principalmente dentro del Parque Nacional de Doñana. Habita esta zona desde hace siglos, donde es explotada con los mismos métodos tradicionales (sin uso de insumos). Este núcleo ha servido como una población piloto que ha permanecido en aislamiento desde principios del siglo XIX, y hasta la fecha su explotación tiene un carácter ecológico. La característica de los sistemas de producción extensivos es que los controles de rendimiento y genealógicos son menos estrictos, por lo que podrían generar dudas sobre su procedencia. La necesidad de detectar la procedencia de los animales para el matadero puede ser importante para la protección y conservación de la raza, debido a que en la región empieza a tener un valor agregado la oferta de esta carne en los restaurantes de la zona. El análisis molecular puede usarse para determinar el origen de los animales y sus productos. El objetivo del trabajo fue desarrollar una evaluación preliminar de la asignación de los individuos de razas bovinas y determinar la especificidad intra e Inter-raza con el fin de poder realizar la trazabilidad de sus productos.

MATERIAL Y METODOS

Se colectó sangre o pelo de 251 animales, 52 de la raza Marismeña y como razas de referencia Berrenda en Negro (32), Criollo Patagónico (36), Criollo Uruguayo (56), Frison (29) y Vaca Palmera (46). Se obtuvo el ADN siguiendo el protocolo de Kawasaki (1990) y se usó un panel de 21 microsatélites utilizados en el proyecto europeo de Biodiversidad Bovina (http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html): BM1314 BM1818 BM1824 BM2113 BM8125 CSRM60 CSSM66 ETH10 ETH225 HAUT27 HEL13 HEL9 ILSTS11 ILSTS6 INRA32 INRA35 INRA63 MM12 TGLA122

TGLA227 y TGLA53. La amplificación se realizó por PCR y la electroforesis se realizó en un secuenciador automático ABI 377 XL. La tipificación alélica se realizó con los paquetes informáticos Genescan v3.2.3 y Genotyper v2.5. Las características de estos microsatélites en la raza ya fueron evaluados y descritos por Quiroz y col. (2004).

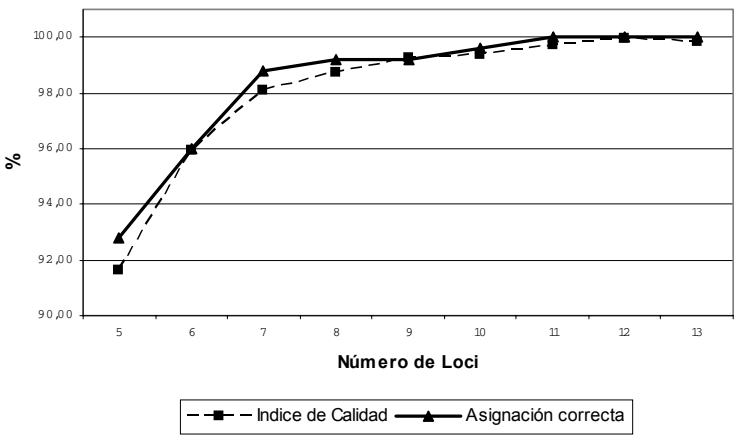
La asignación de los animales a su raza se hizo con el paquete informático Geneclass versión 2.0 (Cornuet y col., 1999). Se utilizó el método de asignación *a posteriori* Bayesiano (Rannala y Mountain, 1995) a un nivel de probabilidad de 0.05, que parte del supuesto de que la población verdadera de origen fue muestreada. La puntuación para la asignación de cada individuo se calculó como la proporción de la verosimilitud calculada para cada raza y la calidad del índice como el promedio de la asignación correcta a la población de cada individuo. Primero se realizó la asignación con el panel de microsatélites mencionados y posteriormente, eliminando microsatélites se ejecutaron corridas comenzando con cinco microsatélites hasta obtener el número mínimo necesario para obtener la asignación correcta del 100% de los animales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La asignación de cada animal a la raza correspondiente se realizó correctamente en el 100% de los animales utilizando los 21 microsatélites.

En la figura 1 se presentan los resultados de la asignación con probabilidad de error de 0.05 utilizando de 5 a 13 microsatélites.

figura 1. Porcentaje de asignación correcta utilizando e Indice de Calidad utilizando microsatélites



Se logró la asignación correcta de todos los individuos con 11 microsatélites. En la figura se aprecia que utilizando entre 5 y 7 tanto la asignación correcta como el índice de calidad aumentan en forma lineal de 92 a 98.4%. Posteriormente, utilizando de 8 a 11 el aumento es menor pero se alcanza el 100%. Cornuet y col

(1999), comentan que para obtener una correcta asignación se requiere utilizar microsatélites polimórficos y con alta heterocigosidad y contar con un mínimo de 15 individuos por población, para obtener porcentajes superiores al 90%.

El porcentaje de asignación correcta fue superior al obtenido por Arranz y col (2001) en ovinos españoles (95%). En bovinos Simmental Suizos MacHugh (1998) reporta una asignación correcta del 99%. En Portugal, Brito y col. (2003) obtuvieron 100% de asignación correcta en las razas Cachena y Frisia y 91 % en Barrosa, utilizando 19 marcadores. Por otra parte, Manel y col. (2002) concluyen que casi todos los individuos pueden ser asignados con un alto nivel de certeza estadística (99.9%) a dos poblaciones altamente diferenciadas (F_{st}=0.15 -0.20) utilizando cuando se emplean 10 loci con heterocigocidades de entre 0.55 y 0.60 y muestras de 30 a 50 individuos por población. Los microsatélites utilizados en este trabajo mostraron unos valores de Heterocigosidad entre .55 y 0.65 y se obtuvo un F_{st} de 0.18 entre las razas incluidas en el mismo. En nuestro estudio se utilizaron razas en peligro de extinción, y se han mantenido aisladas durante muchos años y son genéticamente distintas (Quiroz y col. 2004). El modelo aquí presentado podría utilizarse en otras razas cuya trazabilidad sea de interés. La utilización entre 9 y 11 microsatélites para obtener una asignación poblacional correcta implica un costo similar al que se utiliza en las pruebas de exclusión de paternidad, por lo que se podrían utilizar las mismas bases de datos. Con este panel de microsatélites se podría garantizar la trazabilidad de los productos y animales provenientes de explotaciones que se manejan en extensivo apoyando los programas de recuperación de sistemas tradicionales.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.

Arranz, J.J. Bayón, Y. y San Primitivo, F. (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. Genet. Sel. Evol. 33, 529-542.

Brito, N.V., Arranz, J.J., Bayón, Y., Colaco, J. y San Primitivo, F. (2003). The inclusion method based on multilocus genotypes, in the individual assignment of several indigenous cattle breeds of north Portugal. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias. 98, 47-49.

Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics, 153,1989-2000.

Kawasaki, E. (1990). Sample preparation from blood, cells and other fluids. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 146-152. Academic Press Inc., New York.

Machugh, D.E., Loftus, R.T., Cunningham, P. y Bradley, D.G., (1998). Genetic Structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellites markers. Anim. Genet., 29, 330-340.

Manel, S., Berthier, P. y Luikart, G. (2002). Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment test and multilocus genotypes. Conservation Biology. 16, 650-659.

Quiroz, V.J. Martínez M. A.[2], Martínez R. D. [3], Armstrong E.[4] , Calderón J[5] . Delgado J.V. Relaciones genéticas de la raza mostrenca con otras razas bovinas. IV Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. 15-17 de septiembre del 2004. Ponte de Lima, Portugal.

Rannala, B., J. L. Mountain (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9197-9221.