

DISEÑO DE UN PROGRAMA DE CONSERVACIÓN DE UN HATO DE CRIOLLO YACUMEÑO ASISTIDO POR MARCADORES GENÉTICOS EN SANTA CRUZ – BOLIVIA

DESIGN OF A CONSERVATION PROGRAM ASSISTED BY GENETIC MARKERS IN A HERD OF YACUMEÑO CATTLE IN SANTA CRUZ – BOLIVIA

Pereira J.A.C.^{1*}, Carino M.H.², Hoyos R.¹, Rogberg-Muñoz A.², Loza A.¹, Lirón J.P.², Mamani T.¹, Ripoli M.V.², Giovambattista G.²

¹Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Facultad de Ciencias Veterinarias. Santa Cruz - Bolivia. *antonios8@hotmail.com.

²Universidad nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, IGEVET – CCT, LA Plata – CONICET, Argentina.

Keywords:

Conservation
Molecular markers
Male lines
Paternity

Palabras clave:

Conservación
Marcadores
moleculares
Linajes paternos
Paternidades

Abstract

The Faculty of Veterinary Science of the UAGRM consolidated a conservation program of the Yacumeño Creole cattle. The conservation of zoogenetic resources is performed generally in small populations, which usually has a reduced effective population size. In those cases it is important to keep high genetic variability and low levels of consanguinity by performing specific mating among the animals. The main objective of this research consisted in determine the paternity and male lines by using molecular markers. The DNA was extracted from blood sample of 149 animals and were genotyped all the individuals using 18 microsatellites and 7 markers of the Y chromosome. The results obtained allowed to identify two groups of cows and 3 male lines. This information will be useful to design a reproductive program that avoids to a certain degree the lost of genetic variability and will keep acceptable levels of consanguinity among the herd.

Resumen

La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UAGRM consolidó un programa de conservación del ganado Bovino Criollo Yacumeño a partir del año 2004. La conservación de recursos zoogenéticos generalmente se realiza en poblaciones pequeñas, las cuales tienen un tamaño poblacional efectivo muy reducido. En estos casos es importante realizar apareamientos que mantengan la variabilidad genética alta y los niveles de consanguinidad bajos. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar las paternidades y los linajes paternos mediante el uso de marcadores moleculares. El ADN se extrajo partir de muestras de sangre de los 149 animales del hato y se procedió a genotipificar todos los individuos utilizando 18 microsatélites y 7 marcadores del cromosoma Y. Los resultados obtenidos permitieron identificar dos grandes grupos de vacas y 3 linajes paternos. Esta información servirá para diseñar un programa reproductivo que evite en lo posible la pérdida de la variabilidad genética y mantenga niveles aceptables de consanguinidad en el hato a conservar.

Introducción

Durante las últimas décadas, los marcadores genéticos han sido amplia y exitosamente utilizados para establecer el origen y domesticación de las principales especies, determinar las relaciones entre las razas que componen las distintas especies domésticas, estimar el grado de estructuración poblacional y los niveles de variabilidad genética intra- e interpoblacional (Giovambattista et al., 2010). A partir de la década de los sesenta, el concepto de conservación de los recursos genéticos se generalizó en el mundo animal, existiendo hoy en numerosos países programas de conservación públicos y/o privados en pro de la conservación de las razas de especies de animales domésticos amenazadas de extinción (Delgado Bermejo et al., 2010). En este sentido, la información molecular obtenida a partir de la caracterización genética de las razas a conservar ha sido de gran importancia al momento de determinar las prioridades de los programas de conservación. Además, puede ser empleada para complementar la información genealógica, elegir los reproductores, programar los cruzamiento y planificar la estructuración de la población con el fin de conservar la mayor proporción de la diversidad genética a lo largo del tiempo (Delgado Bermejo et al., 2010). La Facultad de Ciencias veterinarias (FCV) de la Universidad

Autónoma Gabriel René Moreno de Santa Cruz – Bolivia ha consolidado un proyecto de conservación de ganado criollo Yacumeño que inicio en el año 2005 (Pereira et al., 2008). Este ganado fue seleccionado por más de 35 años bajo un plan riguroso siguiendo criterios que conservaron su rusticidad, mansedumbre y fertilidad acumulada en su genotipo en los más de 400 años de adaptación a su medio ambiente después de su llegada a territorio boliviano. Esta selección realizada por Estancias Espíritu (EE) en el subtrópico boliviano dio origen a un hato de ganado criollo que además de conservar los caracteres antes mencionados incorporó criterios de ganancia de peso bajo pastoreo en pasturas nativas. De alba (2011) cita la experiencia de EE como el mejor ejemplo de “seleccionar sin contradecir la naturaleza”. Sin embargo en el año 2004 EE toma la decisión de finalizar su trabajo con ganado criollo y toma la determinación de eliminar el hato de 600 vientres. La FCV después de intentar sin éxito diversas estrategias para que este genotipo se mantenga en su hábitat y ante la inminente venta a matadero de todo el hato toma la decisión de adquirir 120 vientres y 5 toros para iniciar el programa de conservación del ganado criollo Yacumeño. El hato adquirido es mantenido como un hato cerrado y debido a que EE utilizaba un sistema de apareamiento denominado multitoro, no existen genealogías paternas imposibilitando disgregar el hato en grupos genéticos definidos. Sin esa información de identificación individual (registro genealógico) es muy difícil realizar un manejo reproductivo eficaz en un hato que tiene un tamaño poblacional efectivo muy reducido mediante técnicas convencionales de mejoramiento genético. El objetivo del presente trabajo consistió en diseñar un programa de conservación de bovino criollo Yacumeño asistido por marcadores genéticos. Para ello, primero se determinaron los matrilineajes y linajes paternos, y segundo se determinaron mediante marcadores autosómicos las relaciones entre los individuos. Esta información servirá para sub-estructurar la población y diseñar un programa reproductivo con la finalidad de mantener la variabilidad genética del hato y evitar en lo posible el aumento de la consanguinidad dentro del mismo.

Material y métodos

Material animal y extracción de ADN

Se obtuvieron 149 muestras de sangre de criollos Yacumeños pertenecientes al hato de la FCV-UAGRM. Las muestras correspondían a las crías nacidas entre 2006 y 2008, a los toros utilizados durante esos años y a todas las hembras disponibles. El ADN genómico se obtuvo a partir de las muestras de sangre mediante los métodos de extracción orgánica.

Genotipificación

Dieciocho microsatélites autosómicos (BM1818, BM1824, BM2113, BRR, CSRM60, CSSM66, ETH3, ETH10, ETH225, HAUT27, HEL1, INRA023, RM067, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126 y TGLA227) se amplificaron mediante la técnica de PCR-multiplex, utilizando los primers previamente reportados en la bibliografía, e incluye el set de marcadores recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, www.isag.org.uk/). Además, se analizaron cinco STRs (BYM1, INRA189, UMN307, UMN103 y BM861) y dos SNPs del cromosoma Y (UTY19 y ZFY10). Los productos de amplificación de los STRs se corrieron en un secuenciador MegaBACE. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Fragment Profiler (GE Healthcare). Los dos SNPs se genotificaron mediante la técnica de pirosecuenciación descrita por Ginja et al. (2009).

Análisis estadísticos

Las frecuencias génicas se estimaron por conteo directo. Los niveles de variabilidad genética se calcularon mediante la diversidad alélica (N_a ; número total de alelos), heterocigosidad observadas (h_o) y esperada (h_e) utilizando el software GENEPOP (Raymond y Rousset, 1997). El equilibrio de Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) para cada locus se estimó mediante el estadístico F_{IS} , empleando el test exacto en dicho programa. El poder de exclusión (Q) se calculó para cada microsatélite y para el set completo para los casos de uno y dos progenitores conocidos, de acuerdo los algoritmos propuestos por Weir (1996). El parámetro Q se estimó programando dichos algoritmos en Visual Basic e implementados en el software Excel. La distancia estándar de Nei (DS) y la distancia DA (Nei et al., 1983) se calcularon a partir de los genotipos de los individuos y se utilizaron para construir los árboles mediante el método de UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean, Sneath y Sokal 1973). Las distancias genéticas y los árboles se computaron utilizando el programa POPULATIONS 1.2.28 (Langela et al., 1999) y visualizados con el software TREEVIEW (Page, 1996).

Resultados y discusión

En la población de bovinos criollos Yacumeños todos los marcadores genéticos tipificados resultaron ser polimórficos, detectándose un total de 143 alelos. El número de alelos promedio por locus fue de 8, variando entre 6 en los marcadores BM1818, ETH10, TGLA122, INRA023 y HAUT7 y 11 en el STR TGLA126. Por otra parte, la heterocigosidad esperada (h_e) varió entre 0,5 en SPS115 y 0,819 en TGLA126, resultando en una heterocigosidad promedio (H_e) de 0,722. El análisis el estadístico F_{IS} puso en evidencia que 8 de los 18 STRs se encontraban en desequilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla I).

Tabla I. Número de alelos (N_a), heterocigosidad esperada (h_e), observada (h_o) y estadístico F_{IS} estimado para cada uno de los microsatélites analizados. En negrita se resaltan los valores de P inferiores al 0,05 (*Number of alleles (N_a), heterocigosity expected (H_e), observed (H_o) and estimated F_{IS} statistic for each one of the microsatellites analyzed. In bold the values of P less than 0,05*)

| Locus | N_a | h_e | h_o | F_{IS} (P value) |
|---------|-------|-------|-------|--------------------|
| BM1818 | 6 | 0,619 | 0,382 | 0,391 (0,0012) |
| BM1824 | 9 | 0,736 | 0,636 | 0,094 (0,0123) |
| ETH10 | 6 | 0,675 | 0,706 | -0,109 (0,5105) |
| ETH225 | 10 | 0,812 | 0,764 | 0,040 (0,2141) |
| ETH3 | 7 | 0,781 | 0,705 | 0,090 (0,2514) |
| RM067 | 7 | 0,804 | 0,519 | 0,275 (0,0000) |
| SPS115 | 7 | 0,5 | 0,462 | 0,080 (0,0148) |
| TGLA122 | 6 | 0,723 | 0,623 | 0,153 (0,1328) |
| TGLA126 | 11 | 0,819 | 0,721 | 0,121 (0,0307) |
| TGLA227 | 9 | 0,642 | 0,527 | 0,157 (0,1606) |
| BM2113 | 9 | 0,758 | 0,713 | 0,061 (0,7769) |
| BRR | 8 | 0,697 | 0,574 | 0,217 (0,0737) |
| HEL1 | 7 | 0,772 | 0,531 | 0,293 (0,0044) |
| INRA023 | 6 | 0,737 | 0,486 | 0,331 (0,0037) |
| CSSM66 | 10 | 0,772 | 0,835 | -0,128 (0,7984) |
| HAUT27 | 6 | 0,667 | 0,409 | 0,465 (0,0000) |
| CSRM60 | 8 | 0,749 | 0,747 | 0,005 (0,5597) |
| TGLA53 | 11 | 0,733 | 0,759 | -0,088 (0,3587) |

Este número, superior al 5% esperado por azar, podría ser consecuencia del efecto de la consanguinidad producida por la estructura interna del apareamiento del hato, ya que todos los desvíos observados son consecuencia de un aumento significativo de animales homocigotas. Sin embargo, el análisis de diversidad genética estimada mediante el análisis de 18 marcadores autosómicos del tipo microsatélite mostró elevados niveles de diversidad genética, similares a los reportados a otras razas Criollas americanas (Ej., Lirón et al., 2006). Con el fin de evaluar el poder de resolución del juego de marcadores genéticos para asignar paternidades en la población de bovinos criollos Yacumeños, se estimó el poder de exclusión para cada marcador considerando los casos de dos progenitores conocidos y un progenitor conocido. Como se detalla en la tabla II, el poder varió entre 0,644 y 0,469 para la primera y la segunda situación en el STR TGLA126 y 0,309 y 0,140 en el SPS115. Además, se estimó el poder de exclusión acumulado para los dos casos antes mencionados considerando los criterios de uno o dos *mismatch*. En estos análisis (que en el caso más desfavorable: sólo un progenitor conocido y criterio de dos *mismatch*) se obtuvo un poder de exclusión de 0,99261. Teniendo en cuenta que en la rutina de la resolución de casos de paternidad se recomienda la utilización del criterio más estricto (dos *mismatch*), sería necesario contar con la información de las madres para disponer de un sistema de identificación genética con un poder para resolver paternidades 99,9. Utilizando las frecuencias génicas obtenidas en el bovino criollo Yacumeño, se procedió a simular análisis de paternidad utilizando el algoritmo implementado en el programa Cervus. Dicho análisis teórico puso en evidencia que sería posible asignar el 97,5 y el 97% de los padres conociendo o no el genotipo de la madre. Finalmente, se procedió a resolver casos de las paternidades de las crías de bovinos criollos Yacumeños nacidas durante los años 2006-2008 en el establecimiento Yabará.

Tabla II. Valores de poder de exclusión estimados para los casos de dos progenitores conocidos (TPK) y un progenitor conocido (OPK) para cada uno de los marcadores genéticos analizados y para el set completo (*Estimated exclusion values for two known parents (TOK) and one parent know (OPK) for each genetic marked analyzed and for the complete set of markers*)

| Locus | TPK | OPK |
|---------|----------|---------|
| TGLA126 | 0,644 | 0,469 |
| ETH225 | 0,633 | 0,457 |
| RM067 | 0,592 | 0,414 |
| ETH3 | 0,566 | 0,386 |
| CSSM66 | 0,581 | 0,400 |
| HEL1 | 0,538 | 0,361 |
| BM2113 | 0,537 | 0,359 |
| CSRM60 | 0,508 | 0,331 |
| INRA023 | 0,495 | 0,317 |
| BM1824 | 0,519 | 0,336 |
| TGLA53 | 0,530 | 0,347 |
| TGLA122 | 0,474 | 0,303 |
| BRR | 0,457 | 0,284 |
| ETH10 | 0,416 | 0,252 |
| HAUT27 | 0,418 | 0,250 |
| TGLA227 | 0,429 | 0,246 |
| BM1818 | 0,364 | 0,203 |
| SPS115 | 0,309 | 0,140 |
| Q1 | 0,999997 | 0,99927 |
| Q2 | 0,999943 | 0,99261 |

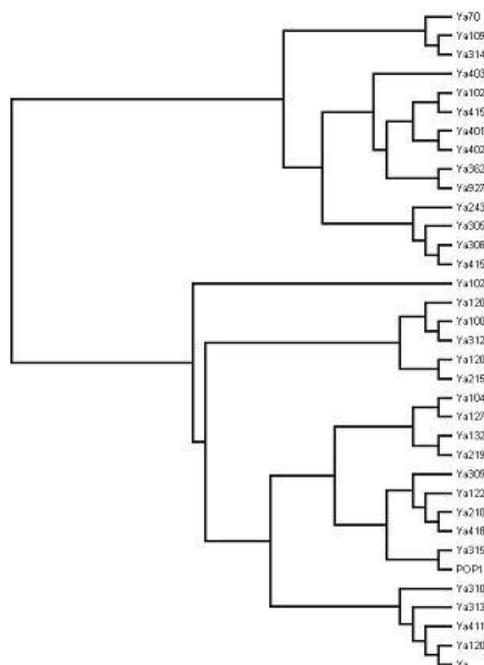


Figura 1. Árbol de individuos construido mediante la distancia estándar de Nei (DS) utilizando el método de UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) [*Tree of individuals elaborated through the Nei standard distance (DS) using the UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) method*]

Contrariamente a lo esperado por los resultados obtenidos con la simulación, sólo un número reducido de crías pudieron ser asignada a sus progenitores. Esto podría deberse a que no se disponía de todos los progenitores. Ante la ausencia de datos genealógicos, y para poder subestructurar la población base de conservación se

procedió a calcular la distancia genética entre los individuos y a construir los arboles. Los resultados obtenidos permitieron identificar dos grupos de vientres (fig. 1). Simultáneamente, los resultados obtenidos a partir de los marcadores genéticos del cromosoma Y permitieron la identificación de 3 linajes paternos. Lamentablemente, uno de estos linajes sólo se detectó en un animal, el que había muerto al momento de formar los grupos reproductivos. Con esta información se procedió a diseñar un programa reproductivo que conserve la variabilidad genética y mantenga los coeficientes de consanguinidad en niveles aceptables. Este programa se basó en la estructuración de la población en dos linajes paternos que incluía además uno de los grupos de vientres, contemplando el intercambio de animales entre ambos en las sucesivas generaciones.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron identificar dos grandes grupos de vacas y 3 linajes paternos. Utilizando estos datos se diseñaron estrategias reproductivas que permitirán conservar la variabilidad genética y mantener los coeficientes de consanguinidad en niveles aceptables. Para ello la identificación de los animales jugará un rol importante para poder distinguir a los grupos de vacas encontrados. Además, se considerará el uso de Inseminación Artificial para el uso de uno de los linajes paternos se encontró en forma minoritaria.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Argentino de Cooperación Sur-Sur y triangular (FO.AR) que auspicia el proyecto FO.AR 6005 y al Proyecto de Conservación de ganado criollo Yabaré perteneciente a la FCV-UAGRM.

Bibliografía

- De Alba J. Capítulo 8. El libro de los Bovinos Criollos de América. Editorial: Papiro Omega, S.A. de C.V., 2011. Mexico. ISBN: 978-607-7533-70-2.
- Delgado Bermejo J.V., A. Martínez Martínez, M. E. Camacho Vallejo, J. L. Vega Pla. Capítulo 6. Conservación de Razas de Especies Domésticas. En *Genética de Animales Domésticos*. Ed. Giovambattista, Guillermo y Peral-García, Editorial: Inter-Médica S.A., 2010. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina. ISBN: 978-950-555-378-5.
- Ginja C., M. C. T. Penedo, L. Melucci, J. Quiroz, O. R. Martínez López, M. A. Revidatti, A. Martínez-Martínez, J. V. Delgado, L. T. Gama. 2009. Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal Genetics*, 41, 128–141.
- Guillermo Giovambattista, Juan Pedro Lirón, Verónica It, Claudio Bravi, Alberto Prando, Pilar Peral García. Capítulo 5. El aporte de la Genética en la Elucidación de la Historia de la Domesticación y Diferenciación de las Especies Domésticas. En *Genética de Animales Domésticos*. Ed. Giovambattista, Guillermo y Peral-García, Editorial: Inter-Médica S.A., 2010. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina. ISBN: 978-950-555-378-5.
- Langella O., 1999. POPULATIONS, version 1.2.28. Population genetic software. Available from: <http://www.pge.cnrs-gif.fr>.
- Lirón J. P., P. Peral-García, G. Giovambattista. 2006. Genetic characterization of Argentine and Bolivian Creole cattle breeds assessed through with microsatellites. *Journal of Heredity* 97(4):331-9.
- Nei, M., Tajima, F., Tatenno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19:153-170.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational and Applied Biosciences Journal* 12, 357-358.
- Pereira, J. A.C., R. Hoyos, P. Rojas. 2008. Conservación ex situ de Ganado Bovino Criollo Yacumeño en el Trópico Boliviano. IX Simposio Iberoamericano y Utilización de Recursos Zoogenéticos. pp 495-499.
- Raymond, M., F. Rousset. 1997. GENEPOP version 3.2b: an updated version of GENEPOP (version 1.2); (originally published as) population genetic software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248–9.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. Numerical taxonomy. San Francisco, CA: W. H. Freeman.
- Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, MA.