

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA BOVINA MOSTRENCA CON MICROSATÉLITES

GENETIC CHARACTERISATION OF THE MOSTRENCA CATTLE WITH MICROSATELLITES

Martínez, A.M.¹, J. Calderón², E. Camacho³, C. Rico², J.L. Vega-Pla⁴ y J.V. Delgado¹

¹Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Edificio Gregor Mendel. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba. España. E-mail: ib2mamaa@uco.es

²Estación Biológica de Doñana. Edificio Perú. Sevilla. España.

³Centro de Investigación y Formación Agraria. Hinojosa del Duque. Córdoba. España.

⁴Laboratorio de Genética Molecular. Servicio de Cría Caballar. Carretera Madrid-Cádiz km 397. 14071 Córdoba. España. E-mail: jvegpla@oc.mde.es

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Doñana. Vaca Marismeña. Control de filiación.

ADDITIONAL KEYWORDS

Doñana. Marismeña Cattle. Parentage control.

RESUMEN

En este trabajo se caracteriza la población bovina Mostrenca de la Estación Biológica de Doñana (340 muestras) con 26 microsatélites de ADN recomendados por la FAO para estudios de biodiversidad bovina, entre los que se encuentran los 9 marcadores del panel internacional para pruebas de paternidad en bovino. Los microsatélites se han amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos amplificados se han separado mediante electroforesis en un secuenciador automático ABI 377XL. Todos los microsatélites utilizados han resultado polimórficos y se han encontrado entre 3 alelos para el BM8125 y 10 para el ETH225, con un número medio de alelos de 6,7. La heterocigosidad media esperada ha sido 0,6244 y la observada 0,6115. Se ha llevado a cabo la comprobación de paternidades y maternidades con estos microsatélites, lo que ha servido para establecer una batería de 10-12 microsatélites con una probabilidad de exclusión

a priori superior al 99,9 p.100 que puede resultar muy útil para realizar controles de filiación en esta raza bovina con unas peculiaridades de manejo muy especiales dada su condición de raza en estado asilvestrado dentro de una reserva biológica protegida en la que no está permitida la ganadería como tal.

SUMMARY

In this work the Mostrenca bovine population that lives in the Estación Biológica de Doñana (340 animals) has been studied with 26 microsatellites recommended by FAO for bovine biodiversity studies. The 9 microsatellites of the international panel for parentage control are included in this study. These markers were amplified by mean of the polymerase chain reaction (PCR) technique and to get the size separation of the obtained fragments we have developed

Arch. Zootec. 54: 357-361. 2005.

electrophoresis in polyacrylamide gel in an automatic sequencer ABI377XL. All the microsatellites have been polymorphic and between 3 (BM8125) and 10 (ETH225) alleles have been found with an average value of 6,7. The expected heterozygosity has been 0.6244 and the observed heterozygosity 0.6115. The paternity and maternity have been checked with these microsatellites and this has been used to make a paternity panel with 10-12 markers and an a priori exclusion probability higher than 99.9 percent. This panel is useful to check paternity in this bovine breed that have a very special management: it is a feral breed that lives inside a restricted biologic reserve where the livestock is not allowed.

INTRODUCCIÓN

La raza Mostrenca o Marismeña es un fenómeno destacado dentro de la producción animal española ya que es la única entidad racial que se explota en régimen de asilvestramiento. Esta peculiaridad, por un lado la hace un exponente de la producción natural y ecológica de carne de bovino, y por otro le confiere un lugar en el extraordinario ecosistema del Parque Nacional de Doñana y su periferia, donde ha demostrado desde hace muchos siglos una completa sostenibilidad. La Estación Biológica de Doñana (EBD) es un instituto de investigación y, como tal, utiliza el ganado que gestiona como objeto de investigación, y es considerado como un animal salvaje más de Doñana, no un animal doméstico.

Según Sánchez Belda (2000), puede tratarse de una raza descendiente directa de *Bos taurus macroceros* o su descendiente directo *Bos taurus tartesus*, con los que guardaría una gran relación filogenética debido al

peculiar sistema de explotación de la raza y su aislamiento secular en las marismas de Guadalquivir. Por esta razón la raza Mostrenca constituiría una joya zootécnica de incalculable valor. Además, por su localización cercana a los puertos de Palos y Sevilla, los cuales mantuvieron el monopolio para la exportación a las Indias tras el descubrimiento de América (Rodero *et al.*, 1992), se presupone que esta raza influyó de una manera destacada en la formación de los bovinos criollos latinoamericanos.

La caracterización genética por medio de una batería de 26 microsatélites homologada a nivel internacional nos permitirá en primer lugar establecer el perfil genético de la población y en segundo lugar dejar armada la metodología necesaria para el control genealógico sistemático y rutinario de los animales, basada en la aplicación de una batería mínima de microsatélites escogidos de los 26 anteriores, en función de su contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de exclusión combinada *a priori* (PEC) mostrado, así como por su posibilidades de análisis en MULTIPLEX. Debido al sistema de explotación aplicado es ésta la única vía para conocer las relaciones familiares de los animales, algo imprescindible para la correcta gestión de los programas genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha analizado la población bovina Mostrenca de la Estación Biológica de Doñana (340 muestras). Se ha extraído sangre de todos los animales en

CARACTERIZACIÓN CON MICROSATÉLITES DE LA RAZA BOVINA MOSTRENCA

tubos con EDTA K₃ como anticoagulante y utilizando el sistema Vacutainer® para realizar las extracciones. El ADN de las muestras se ha extraído mediante el Kit BLOODCLEAN de purificación de ADN (BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Madrid, España) siguiendo las indicaciones del fabricante para este kit.

Se han estudiado los 26 microsatélites siguientes: BM1314, ILSTS6, TGLA53, ETH10, ETH225, MM12, CSSM66, TGLA122, CRSRM60, HEL13, INRA63, HEL9, BM2113, TGLA227, INRA35, ETH3, HAUT24, ILSTS011, BM1824, ETH185, HAUT27, INRA32, INRA37, BM1818, BM8125, SPS115. Los microsatélites se amplifican mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según la metodología de Martínez *et al.* (2000). Se diseñan varias reacciones múltiplex para reducir el número de reacciones y los costes de los experimentos. Para realizar la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos mediante la PCR se someten estos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador automático ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realiza mediante los programas informáticos Genescan Analysis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente.

Con objeto de conocer el perfil genético de la raza se han calculado las frecuencias alélicas y las heterocigosidades mediante el programa informático Genetix versión 4.01 (Belkhir, 1999). Se ha realizado una prueba de equilibrio según Guo y Thompson (1992) con el algoritmo en

cadena de Monte Carlo Markov, mediante el programa informático GENEPOP versión 3.1c (Raymond y Rousset, 1995). Se ha calculado el contenido de información polimórfica (PIC) con la fórmula propuesta por Botstein *et al.* (1980).

El control de filiación se realizará en aquellos individuos de los que se conozcan sus padres comparando las fórmulas genéticas de éstos con la del animal en cuestión. En el caso de que no se sepa cual es el progenitor se cruzará la información de cada uno de ellos con los más probables, empleando el programa RELATEDNESS v5.0.8 (Quellery Goodnight 1989), para completar al máximo los datos genealógicos del registro. Para evaluar la utilidad de estos microsatélites para realizar controles de filiación en esta raza, se ha calculado la probabilidad de exclusión *a priori* (PE) de cada uno de ellos mediante la fórmula de Jamieson (1994), y la probabilidad de exclusión combinada *a priori* (PEC) para un conjunto de sistemas mediante la fórmula de Huguet (1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se reflejan los valores de PIC que indican qué marcadores son más informativos en esta raza (valores superiores a 0,5), cuáles son medianamente informativos (valores entre 0,25 y 0,5) y cuáles son poco informativos (valores inferiores a 0,25). Exceptuando el SPS115, el resto de los marcadores son muy informativos y por tanto son útiles para valorar la variabilidad genética de la vaca Mostrenca.

Tabla I. *Microsatélites analizados, número de alelos obtenido, valores de PIC (contenido de información polimórfica), Heterocigosidad y de PE (probabilidad de exclusión a priori) de cada uno de ellos.* (Microsatellites analysed, alleles obtained number (NA), PIC values (Polymorphic information content), heterozygosity and a priori exclusion probability (PE) of each microsatellite).

| Microsatélites | Número de alelos | PIC | Heterocigosidad | PE |
|----------------|------------------|------|-----------------|------|
| BM1314 | 9 | 0,73 | 0,77 | 0,55 |
| ILSTS6 | 9 | 0,73 | 0,76 | 0,55 |
| TGLA53 | 9 | 0,72 | 0,75 | 0,55 |
| ETH10 | 6 | 0,71 | 0,75 | 0,53 |
| ETH225 | 10 | 0,68 | 0,72 | 0,51 |
| MM12 | 6 | 0,68 | 0,73 | 0,49 |
| CSSM66 | 9 | 0,67 | 0,71 | 0,48 |
| TGLA122 | 8 | 0,67 | 0,71 | 0,48 |
| CRSRM60 | 6 | 0,65 | 0,70 | 0,46 |
| HEL13 | 5 | 0,65 | 0,70 | 0,45 |
| INRA63 | 4 | 0,65 | 0,70 | 0,44 |
| HEL9 | 8 | 0,62 | 0,68 | 0,43 |
| BM2113 | 7 | 0,60 | 0,63 | 0,42 |
| TGLA227 | 7 | 0,58 | 0,62 | 0,40 |
| INRA35 | 7 | 0,57 | 0,62 | 0,39 |
| ETH3 | 8 | 0,56 | 0,63 | 0,37 |
| HAUT24 | 6 | 0,56 | 0,63 | 0,35 |
| ILSTS011 | 8 | 0,54 | 0,62 | 0,34 |
| BM1824 | 6 | 0,53 | 0,59 | 0,34 |
| ETH185 | 5 | 0,49 | 0,54 | 0,31 |
| HAUT27 | 7 | 0,46 | 0,49 | 0,29 |
| INRA32 | 5 | 0,43 | 0,53 | 0,24 |
| INRA37 | 7 | 0,42 | 0,44 | 0,25 |
| BM1818 | 4 | 0,40 | 0,44 | 0,23 |
| BM8125 | 3 | 0,40 | 0,50 | 0,22 |
| SPS115 | 5 | 0,28 | 0,29 | 0,15 |

Todos los microsatélites utilizados han resultado polimórficos y se han encontrado entre 3 alelos para el BM8125 y 10 para el ETH225 (**tabla I**), con un número medio de alelos de

6,7. La heterocigosidad media esperada ha sido 0,6244 y la observada 0,6115. Los valores de las heterocigosidades son semejantes a los encontrados por otros autores en diversas razas bovinas españolas (Matín-Burriel *et al.*, 1999) y europeas, pero el número medio de alelos encontrado en la vaca Mostrenca es ligeramente superior al hallado por estos autores (Kantanen *et al.*, 2000; Hanslik *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2000). Estos resultados nos indican que la vaca Mostrenca tiene una elevada variabilidad genética a pesar de tratarse de una raza en peligro de extinción, que además no muestra desequilibrio Hardy-Weinberg.

En la **tabla I** se detallan los valores de PE para cada marcador. A partir de estos datos se ha diseñado un panel básico de 13 microsatélites cuya probabilidad de exclusión combinada *a priori* (PEC) es 0,9998. Se prepara otro panel adicional de otros 7 microsatélites para casos de control de filiación que no puedan resolverse con el panel básico. La PEC de los dos paneles es 0,9999.

El control de filiación se ha realizado en aquellos individuos de los que se conozcan sus padres comparando las fórmulas genéticas de éstos con la del animal en cuestión. En los casos en que no se conocía cuales eran los progenitores se ha cruzado la información de cada uno de ellos con los más probables, empleando el programa RELATEDNESS v.5.0.8 para completar al máximo los datos genealógicos del registro. En la mayoría de los casos, se comprobó la maternidad según la información que se tenía de campo. Para hacer la asignación de padres se

CARACTERIZACIÓN CON MICROSATÉLITES DE LA RAZA BOVINA MOSTRENCA

ha empleado el programa antes mencionado.

Esto constituye una poderosa herramienta para controlar la genealogía de los animales, que a su vez es fundamental para organizar un esquema rotatorio de apareamientos que conlleve

la menor consanguinidad posible dentro del plan de recuperación y conservación de la raza. Una vez recuperada la raza, se podría afrontar el proceso de mejora genética, para lo cual también el control de la genealogía es fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

- Belkhir, K. 1999. Genetix: Logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRSUPR 9060.
- Botstein, D., R.L. White, H. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Edwards, C.J., G. Dolf, R.T. Looft, R.T. Loftus and D.G. Bradley. 2000. Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzer and three related European cattle breeds as analysed with 20 microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 329-332.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Hanslik, S., B. Harr, G. Brem and C. Schlötterer. 2000. Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Animal Genetics*, 31: 31-38.
- Huguet, E., A. Carracedo y M. Gené. 1988. Capítulo 14. Valoración médico-legal de la paternidad. En: Introducción a la investigación biológica de la paternidad. Ed. Huguet, E., Carracedo, A. y Gené, M. y Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A. Barcelona.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*, 25: 37-44.
- Kantanen J., I. Olsaker, L.E. Holm, S. Lien, J. Vilkkilä, K. Brusgaard, E. Eythorsdottir, B. Danell and S. Adalsteinsson. 2000. Genetic diversity and population structure of 20 North European Cattle Breeds. *The American Genetic Association*, 91: 446-457.
- Martín-Burriel, I., E. García-Muro and P. Zaragoza. 1999. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, 30: 177-182.
- Martínez, A.M., J.V. Delgado, A. Rodero and J.L. Vega-Pla. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 295-301.
- Queller, D.C. and K.F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258-275.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. Genepop: populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86: 248-249.
- Rodero, A., J. Delgado and E. Rodero. 1992. Primitive Andalusian Livestock and their implications in the discovery of America. *Arch. Zootec.*, 41: 383-406.
- Sánchez Belda, A. 2000. Paralelismo entre razas autóctonas españolas muy diferentes: Albera y Marismeña. *FEAGAS*, 17: 19-36.

Archivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 361.

