

USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD INTRA-GANADERÍA EN LA RAZA BOVINA NEGRA ANDALUZA

USE OF MOLECULAR MARKER FOR THE MANAGEMENT OF INTRA FARM BIODIVERSITY IN NEGRA ANDALUZA CATTLE BREED

Estudio asistido por marcadores del pedigree animal

Landi, V^{1,2*}, de la Haba, M², Martínez, A^{1,2}, D. Albaronedo³, Delgado, J V², Camacho, M E⁴

¹Animal Breeding Consulting S.L. - Parque científico tecnológico de Córdoba -Rabanales21. ²landivincenzo@yahoo.it

²Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria – Universidad de Córdoba. Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3. 14071 Córdoba, España.

³Asociación Nacional de Criadores de Vacuno Negro Andaluz.

⁴IFAPA - Alameda del Obispo. Consejería de Agricultura y Pesca. Avda. Menéndez Pidal s/n. Córdoba (España). Apdo. Correos 3092.

Abstract

The ability to infer genealogical relationships among individuals in a population has been used in many research areas from biology to evolution and animal conservation. Zootechnical field applications include estimation of heritability, the reduction of inbreeding and the proper management of endangered breeding populations where there are known relationships between individuals and it is important to safeguard the family and different effective population. The Black Andalusian cattle breed is one of the most endangered in Spain due to the existence of few individuals and not a complete definition of the racial characteristics by the lack of a previous study of the production and genetic characterization. The shortage of players and no genetic connection can be and start a serious decline of the race as we have tested the reconstruction of pedigree livestock within-race while maintaining acceptable overall genetic diversity.

Palabras clave:

Pedigrí
Microsatélites
Variabilidad
genética

Keywords:

Pedigree
Microsatellites
Genetic
variability

Resumen

La capacidad de inferir relaciones genealógicas entre individuos de una población se han utilizado en muchas áreas de la investigación, desde la biología a la evolución, como también en la conservación animal. Las aplicaciones en el campo zootécnico incluyen la estimación de la heredabilidad, la reducción de la endogamia y la correcta gestión de los reproductores en poblaciones amenazadas, debido a que no se conozcan las relaciones entre los individuos y sea importante salvaguardar las diferentes familias y los efectivos de la población. La raza bovina Negra Andaluza es una de las más amenazadas en España debido a la existencia de pocos individuos y a una definición incompleta de las características raciales, ocasionado por la falta de un estudio previo de la producción y de la caracterización genética. La escasez de reproductores y la ausencia de la conexión genética entre ganaderías puede ser el inicio de un grave declinar de la raza como hemos podido comprobar con la reconstrucción del pedigrí de distintas ganaderías, aun manteniendo la raza una diversidad genética global aceptable.

Introducción

La raza bovina Negra Andaluza es un animal derivado del Tronco Ibérico que se utilizaba en el pasado para las labores de labranza. La mecanización del campo hizo descender enormemente sus censos y la raza quedó relegada a zonas de sierra donde escaseaban los recursos forrajeros, pero siempre haciendo gala de una gran rusticidad y adaptación (Nogales *et al.* 2010). En un estudio anterior, se ha reportado cómo la Negra Andaluza, aun siendo una raza con una clara situación de riesgo de erosión genética, presenta una situación de alarma media y una contribución a la diversidad genética de la especie considerable (Cañon *et al.* 2011). La disminución del censo es el principal problema; se hace difícil encontrar un número adecuado de sementales para garantizar el remplazo en las ganaderías y esto ha facilitado el uso de machos de otras razas, sobre todo Avileña, provocando fenómenos de erosión genética. La cría tradicional de la raza junto con la ausencia de un

plan de selección moderno, nos ha llevado a que falten completamente informaciones genealógicas, hasta la reciente puesta en marcha del programa de gestión genética.

El objetivo del presente trabajo es aplicar herramientas estadísticas a los datos de marcadores moleculares para reconstruir los datos genealógicos. Esto puede ser de gran ayuda para gestionar los reproductores y aplicar planes adecuados de selección genética (Doerksen & Herbinger 2010). Se puede recuperar información genealógica en razas que estén en proceso de recuperación o que simplemente tengan estratos de la población de los cuales no se dispone de información (Koch *et al.* 2008).

Material y métodos

Se han utilizado muestras de sangre y pelo de 86 individuos (5 machos y 81 hembras) para la extracción de ADN, animales procedentes de 10 ganaderías bajo un estudio en el marco del proyecto INIA-RZ-2008-00008-00-00 y con fondos de la Unión Europea. Se han muestreado todos los animales de las ganaderías de raza Negra Andaluza según los datos de asignación molecular efectuado con microsatélites obtenidos en el citado proyecto. Estos animales en estado crítico en su programa de conservación no dispone de datos de filiación oficiales ni de documentos que acierten la descendencias, como de un registros de los movimientos de reproductores. Se han amplificado 27 microsatélites mediante la técnica de PCR seguida de una electroforesis en un secuenciador automático ABI 377XL. La tipificación alélica se ha realizado mediante el programa Genotyper[®] 3.7. Se calculó la probabilidad de exclusión, el desvío del equilibrio de Hardy Weinberg y la probabilidad de encontrar alelos nulos con el programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007). Estos cálculos han sido utilizados para escoger un panel de 15 marcadores (con valores de exclusión más altos) para la reconstrucción del pedigrí. Se ha aplicado un algoritmo exacto para encontrar el árbol genealógico (pedigrí) de máxima verosimilitud para conjuntos de datos confrontando los genotipos multilocus utilizando el programa FRANz (Riester *et al.* 2009) y se ha representado la jerarquía a través del programa gráfico Graphviz 3.0 (<http://www.graphviz.org/>).

Resultados y discusión

Se ha obtenido un número medio de alelos por marcador de 8,64 (Tabla 2) con el máximo obtenido por los marcadores Tgla122 y Tgla126 (14) y el valor mínimo en INRA35 y SPS115 (5). La probabilidad de no exclusión (NE-1P) más alta se ha observado en los marcadores Bm1824 y Tgla126 mientras las más baja en el Tgla227. Solo tres marcadores presentaron una desviación significativa del equilibrio de Hardy Weinberg (BM1314, BM1818 e INRA35). Dentro de cada ganadería (Tabla 1), se ha encontrado el valor más alto de heterocigosidad observada en la ganadería “a” aun que este dato no se puede considerar razonable debido al bajo número de individuos en el análisis (1) y el más bajo en la ganadería “i” (0,51). Basándonos sobre los valores más altos de probabilidad de exclusión de un progenitor padre o madre candidato y eliminando los marcadores con una desviación significativa del equilibrio de Hardy Weinberg, se ha seleccionado una batería de 15 marcadores (indicados a continuación en base a los valores de probabilidad de exclusión decreciente): Bm1824, Tgla126, Hel9, Cm66, Bm2113, Hel1, Tgla122, Sts11, Mm12, Sts6, Haut24, Eth3, Bm1314, Inra23, Crm60, Eth185, que han servido para las siguientes simulaciones. En este panel de 15 marcadores se encontró un PIC medio de 0,79 y una probabilidad combinada de exclusión de padre y madre de 99,99%. Durante la simulación con el programa Franz, se asigna los individuos según las relaciones de parentesco directo progenitor-descendiente clasificadas según el valor de LOD. El principal desafío en el uso de esta información para la asignación de la paternidad y la reconstrucción del pedigrí es el desarrollo de estrategias de cómputo eficientes que permitan a un animal candidato ser asignado su padre y su madre. En la Figura 1, se puede apreciar cómo se agrupan gráficamente todos los individuos (en la imagen se muestra solo 5 ganaderías de las 10 analizadas) según sus relaciones genealógicas reconstruidas. La significancia en esta simulación es muy alta (99,99%) a pesar de la falta de información sobre las fechas de nacimiento y de cualquier relación de parentesco, algunos individuos pueden encontrarse en una posición errónea dado que su posición en el árbol genealógico sólo se basa en su coeficiente de parentesco: un animal tiene el mismo grado de parentesco con su abuelo que con su medio hermano, así que en el caso de que falte información genealógica de la abuela, la distinción se hace posible solo en base a la fecha de nacimiento. Se observa que hay muchos animales de la misma ganadería que pertenecen al mismo pedigrí (ganadería “i”) evidenciando uno de los problemas principales de la raza, la falta de reproductores no consanguíneos. Los animales representados en forma de cuadro son machos. Los individuos m35865 y g39992 (ambas hembras) tienen un mismo descendiente de primera generación, g39984, lo mismo ocurre con g39996, g39992, g40000 y g39996, g39985, g40002. Estas inconsistencias se deben básicamente a la falta de algunos animales en el muestreo, animales que hacen parte de

estos pedigree (básicamente se trata de novillos que se han vendido) y el problema se agrava más por la falta de las fechas de nacimiento que impiden al programa de distinguir entre descendientes con el mismo coeficiente de parentesco pero de diferentes generaciones.

Tabla II. K, número de alelo; N, número de muestras analizadas; H obs, heterocigosidad observada, H exp, heterocigosidad esperada; PIC, contenido de información polimórfica; NE-1P, el promedio de la probabilidad de no-exclusión para un padre candidato ; NE-2P, el promedio de probabilidad de no exclusión para los padres candidatos; NE-PP, el promedio de probabilidad de no-exclusión de un dos padres candidatos; NE-I, el promedio de la de probabilidad de no-exclusión de dos individuos no relacionados ; NE-SI, el promedio de probabilidad no-exclusión de dos hermanos, HW, valor de significancia de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg; ns, no significativo, * significativo $p < 0,05$ (*K, number of alleles; N, number of samples analyzed; H obs, heterozygosity observed; H exp, heterozygosity expected; PIC, polymorphic information content; NE-1P, average non-exclusion probability for one candidate parent; NE-2P, average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; NE-PP, average non-exclusion probability for a candidate parent pair; NE-I, average non-exclusion probability for identity of 2 unrelated individuals; NE-SI, average non-exclusion probability for identity of 2 siblings; HW, significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; ns, not significant; * $p < 0,05$*)

Locus	k	N	H obs	H exp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
bm8125	6	85	0,64	0,71	0,65	0,71	0,54	0,36	0,14	0,43	NS	0,0493
bm1314	10	86	0,61	0,78	0,74	0,61	0,43	0,24	0,09	0,39	**	0,1314
bm1818	6	85	0,44	0,62	0,55	0,79	0,65	0,49	0,22	0,50	*	0,1869
cm66	13	77	0,83	0,87	0,84	0,44	0,28	0,12	0,04	0,33	NS	0,0167
eth10	8	84	0,70	0,73	0,68	0,68	0,50	0,31	0,12	0,42	NS	0,0192
inra32	7	80	0,54	0,65	0,60	0,76	0,59	0,40	0,17	0,47	NS	0,0904
mm12	12	86	0,79	0,83	0,80	0,52	0,35	0,17	0,05	0,35	NS	0,018
tgla122	14	78	0,68	0,84	0,81	0,50	0,33	0,15	0,05	0,35	NS	0,1059
bm2113	9	83	0,76	0,85	0,82	0,48	0,32	0,14	0,04	0,34	NS	0,0535
crm60	7	82	0,68	0,75	0,71	0,65	0,47	0,27	0,10	0,40	NS	0,0465
eth185	10	77	0,62	0,75	0,70	0,66	0,48	0,29	0,11	0,41	NS	0,0787
haut27	6	78	0,63	0,65	0,60	0,76	0,60	0,42	0,18	0,47	NS	0,0072
hel13	9	77	0,55	0,72	0,68	0,69	0,51	0,32	0,12	0,42	NS	0,1363
hel9	9	79	0,66	0,87	0,85	0,43	0,27	0,11	0,03	0,33	NS	0,1361
sts6	8	66	0,58	0,80	0,77	0,56	0,39	0,20	0,07	0,37	NS	0,1626
inra23	9	75	0,61	0,78	0,74	0,61	0,43	0,23	0,08	0,39	NS	0,11
inra63	9	84	0,64	0,71	0,67	0,70	0,52	0,33	0,13	0,43	NS	0,0398
sps115	5	82	0,71	0,62	0,55	0,80	0,66	0,50	0,22	0,50	NS	-0,0754
tgla227	7	73	0,44	0,52	0,48	0,85	0,70	0,52	0,27	0,56	NS	0,0752
bm1824	12	82	0,71	0,89	0,87	0,38	0,24	0,08	0,03	0,32	NS	0,1115
eth225	6	81	0,65	0,70	0,65	0,72	0,55	0,36	0,14	0,44	NS	0,0078
eth3	6	82	0,71	0,79	0,75	0,60	0,43	0,24	0,08	0,38	NS	0,0486
haut24	9	81	0,75	0,80	0,77	0,57	0,39	0,20	0,07	0,37	NS	0,0328
sts11	10	84	0,75	0,83	0,81	0,50	0,33	0,15	0,05	0,35	NS	0,0522
inra35	5	77	0,48	0,67	0,60	0,77	0,62	0,46	0,18	0,46	*	0,1617
tgla53	7	83,00	0,43	0,58	0,50	0,82	0,70	0,55	0,26	0,52	NS	0,1523
tgla126	14	82	0,73	0,888	0,872	0,38	0,234	0,083	0,024	0,315	NS	0,0958
hell	9	53	0,60	0,843	0,815	0,498	0,328	0,154	0,048	0,344	NS	0,1604
	8,64	79,36	0,64	0,75	0,71	0,62	0,46	0,28	0,11	0,40	NS	0,08

En este caso la reconstrucción estadística del pedigrí pone de manifiesto que el reducido número de sementales analizados forman parte de la misma línea genealógica.

Con la falta de información (genealogía, edad, fecha de nacimiento y registro de movimientos), las conclusiones que podemos sacar son muy inconsistentes, estos datos nos pone de manifiesto el trabajo pendiente que hay en

esta raza, comprobar la poca información disponible con los datos moleculares y estadísticos, para poder iniciar una recogida sistemática de datos genealógicos en la raza. Con estos resultados podemos recomendar apareamientos dirigidos de los reproductores, realizar una conexión genética de las ganaderías sin correr el riesgo de aumentar la consanguinidad.

Aunque los parámetros de diversidad genética no son alarmantes, es necesario realizar una adecuada gestión de los apareamientos y así maximizar la diversidad genética de esta raza.

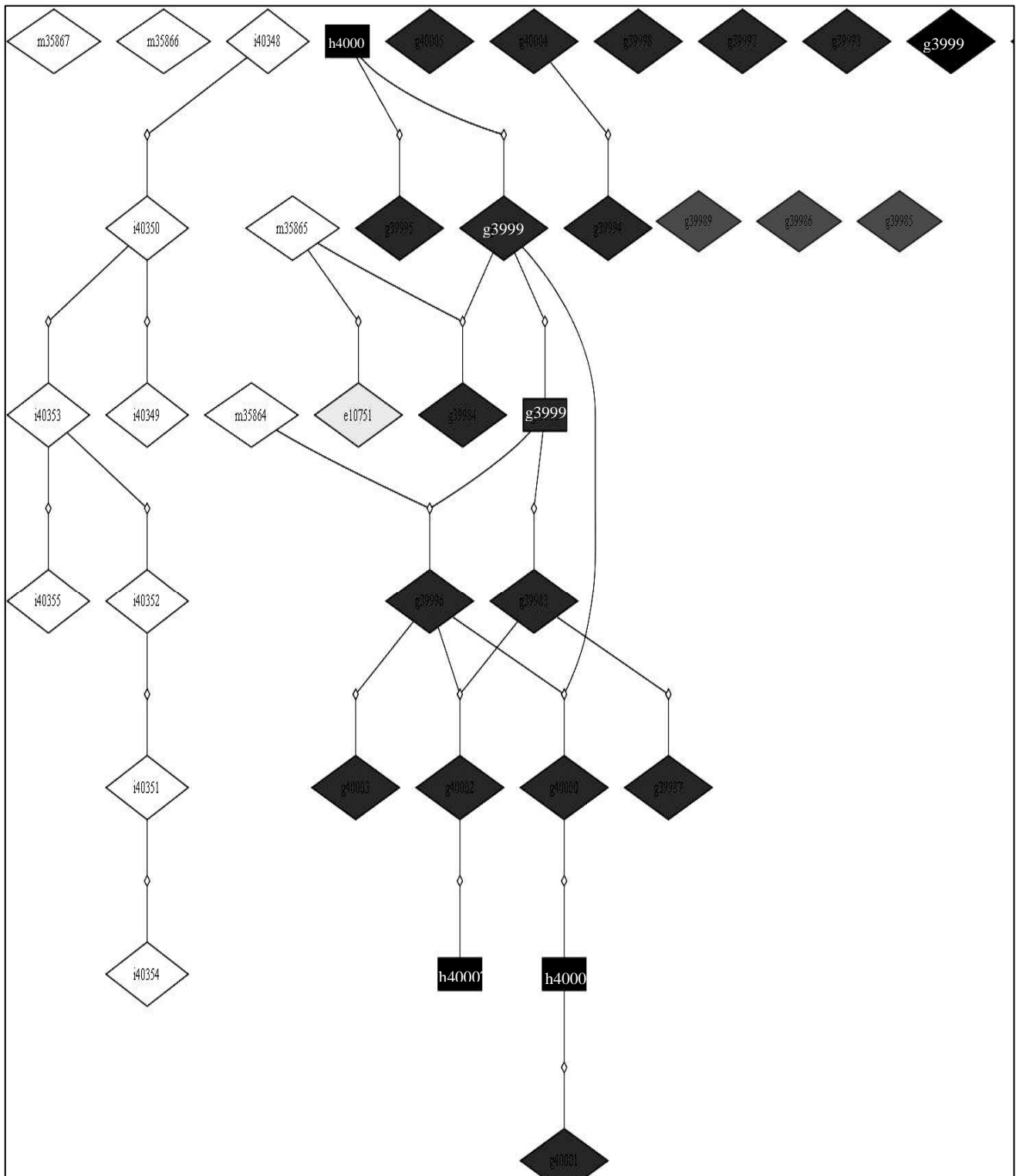


Figura 1. Representación gráfica del pedigrí reconstruido con el software FRANz de algunos de los animales analizados. Los colores diferentes indican ganaderías diferentes. Los rectángulos representan animales de sexo masculino (*Graphic representation of reconstructed pedigree by Package software FRANz of part of samples analyzed. Different farm are indicated by different colours. Rectangular boxes are male individuals*).

Bibliografía

- Cañon J., García D., Delgado J.V., Dunner S., Telo da Gama L., Landi V., Martín-Burriel I., Martínez A., Penedo C.T., Rodellar C., Zaragoza P. & Ginja C. (2011) Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle. *Animal* on line.
- Doerksen T. & Herbinger C. (2010) Impact of reconstructed pedigrees on progeny-test breeding values in red spruce. *Tree Genetics & Genomes* 6, 591-600.
- Kalinowski S.T., Taper M.L. & Marshall T.C. (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-106.
- Koch M., Hadfield J.D., Sefc K.M. & Sturmbauer C. (2008) Pedigree reconstruction in wild cichlid fish populations. *Mol Ecol* 17, 4500-11.
- Nogales S., Martínez A., Landi V., Camacho Vallejo E., Delgado J.V. & Biobovis C. (2010) Relación Genética de la raza Negra Andaluza y estudio de su estructura poblacional. In: *Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de los recursos Zoogenicos* (eds. by Germano Costa R, Leandro Rocha L & De madeiros GR), pp. 151-3, Joao Pessoa, Paraíba. Brazil.
- Riester M., Stadler P.F. & Klemm K. (2009) FRANz: reconstruction of wild multi-generation pedigrees. *Bioinformatics* 25, 2134-9.