

LOS AVANCES DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS GENÉTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA SELECCIÓN ANIMAL

GENÉTICA MOLECULAR Y SELECCIÓN

Advances in genetic technologies and their application in animal selection

Landi, V^{1,2*}, Quiroz Valiente J.³

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

²Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria – Universidad de Córdoba. 14071 Córdoba, España.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Tabasco

Palabras clave:

Selección genómica
SNPs
Nuevas tecnologías genómicas

Keywords:

Genomic selection
SNPs
New genomic selection

Abstract

Genetic science has made great progress in the last twenty years ; especially from the time that developed the so-called Polymerase chain reaction (PCR). Since the '80s, numerous types of markers have been proposed and the techniques and effectiveness of them for various purposes has been growing. The long era of microsatellites markers, widely used in research and genealogical control, is coming to an end with the introduction of the deep genotyping platform of SNPs markers (Bead Chips). This technology promises to automate the process of genotyping and use genomics tools to introduce a new challenge of animal breeding : the genomic selection (GS). This is based on the infinitesimal associative effect of thousands of SNPs for a phenotype. However, when the technology is ready to completely sequence the genome of an organism at affordable prices, much work remains in the measurement and characterization of local breeds, for the corresponding association studies. The problem of the future, in implementing new technologies, will be the proper recording of phenotypes.

Resumen

La ciencia genética ha experimentado grandes avances en los últimos veinte años; sobre todo a partir del momento en que se desarrolló la llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Desde los años 80^o, se han ido proponiendo numerosos tipos de marcadores, y las técnicas y su eficacia, para diferentes propósitos, han ido creciendo. La larga época de los marcadores microsatélites, ampliamente usados en la investigación y los controles genealógicos, está llegando a su término con la introducción de las plataformas de genotipado masivo de polimorfismos de una sola base (SNPs). Este tipo de tecnología permite automatizar el proceso de genotipado y utilizar las herramientas genómicas para introducir un nuevo reto en la selección animal: la selección genómica. Esta se basa en el efecto asociativo infinitesimal de millares de SNPs sobre un fenotipo. Sin embargo, y cuando esté lista la tecnología necesaria para poder secuenciar completamente el genoma de un organismo a precios accesibles, todavía quedará mucho trabajo en la medición y la caracterización de las razas locales, para realizar sus correspondientes estudios de asociación. El problema del futuro, en la aplicación de las nuevas tecnologías, será el correcto *registro* de los fenotipos.

Las herramientas biotecnológicas en genética molecular; evolución y perspectivas

Desde los marcadores fenotípicos a los moleculares: los inicios de la biotecnología aplicada

Normalmente, se suelen clasificar a los individuos que pertenecen a especies diferentes, o incluso a la misma especie, basándose en sus características morfológicas, es decir, se basa en un modelo que resume todas las características más destacadas de la población a la cual se asigna. En el pasado, este enfoque había sido utilizado en muchos estudios de caracterización de las especies animales, sobre todo en los estudios naturalistas, aunque también en las clasificaciones de las poblaciones humanas (Barbujani 2006). La diversidad morfológica está directamente influenciada por la estructura geográfica del medio ambiente en que vive una población (Ochman *et al.* 1983; Bamshad *et al.* 2004). Incluso en los animales domésticos, bajo la influencia de la selección humana, existe una fuerte influencia ambiental que también puede entenderse como el entorno socio-económico

(Roosen *et al.* 2005; Gizaw *et al.* 2007). Así se deriva que, la caracterización morfológica no siempre es capaz de analizar la estructura genética de un grupo real de individuos, por la sencilla razón de que la forma y la apariencia de un ser viviente depende de numerosas variables: medioambientales y geográficas (Hintum 1994; Gizaw *et al.* 2007); de comportamiento (Petit *et al.* 2001); así como, de las condiciones ambientales en su sentido más estricto, como son las técnicas de cría de los animales domésticos e incluso de las escalas sociales y jerárquicas (Foster & Sharp 2002). Resultados mucho más interesantes e informativos se logran cuando se combina esta información con datos moleculares, o de otros campos de investigación, como ya se ha demostrado en el ganado ovino por Gizaw *et al.* (2007), en un estudio comparativo entre mediciones biométricas y marcadores genéticos; o también como se ha visto en los numerosos estudios en los cuales se ha utilizado la información geográfica (GIS) conjuntamente con datos de marcadores moleculares, sobre todo microsátélites (Roosen *et al.* 2005; Joost *et al.* 2007). Los primeros estudios *in vitro*, que pretendían estudiar las poblaciones, se llevaron a cabo con los marcadores bioquímicos y el estudio de la variabilidad fenotípica de polimorfismos, utilizando esencialmente las proteínas antigénicas expresadas por los glóbulos rojos: el sistema AOB (Calafell *et al.* 2008). Posteriormente se difundieron los marcadores enzimáticos y proteicos que prometían ser el avance final para el estudio molecular, por su abundancia y polimorfismo (Hunter & Market 1957). Obviamente, todas estas técnicas tenían los días contados, porque pocos años después Karis Mullis desarrolló la reacción de PCR (Mullis *et al.* 1986). Desde principios de la década de los 80's la técnica de PCR puso al mundo científico en una carrera exponencial sobre la invención y utilización de herramientas más eficaces para entender la variación biológica de los seres vivos. Siendo el código genético universal, los avances en las diferentes disciplinas se han ido entrelazando. Sobre todo, la cantidad de inversión tecnológica y económica en el campo de la genética humana ha beneficiado también al sector agro zootécnico, que ha podido utilizar una gran cantidad de información depositada en los bancos de datos. Durante los últimos años se asiste a un fenómeno particular: la salida de un nuevo tipo de marcador, o de una tecnología más potente para estudiarlo, la cual promete ser golpe final que nos otorgará la varita mágica para descubrir toda la información escondida en el código genético. Así, los RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) remplazaron a los aloenzimas, que a su vez fueron remplazados por los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), y estos últimos por los microsátélites, etc. A continuación describimos cuales han sido los principales marcadores usados en los últimos 20 años.

Marcadores con el uso de PCR inespecífica.

Este primer tipo de marcadores no estaban basados en la amplificación de una secuencia específica de ADN (el sitio de enganche de la polimerasa, o de corte de una endonucleasa, era al azar en el genoma) y fueron los primeros en ser utilizados. Los llamados RFLP se basaban en la restricción al azar de ADN genómico total, y se obtenía un patrón de bandas de restricción para construir lo que se definía como *finger-printing* genético. La gran ventaja era que las técnicas podían ser utilizadas en cualquier especie, y todavía hoy se vienen utilizando cuando no existe una información más precisa sobre el genoma del animal (Sønstebø *et al.* 2007). Los marcadores más difundidos fueron los RAPDs (random amplification of polymorphic DNA). La amplificación RAPD consiste en (Williams *et al.* 1990) la ampliación con secuencias de inicio bastante cortas (típicamente 10-12 pares de bases) que se aparejan al genoma en posiciones casuales. En 1992 se introdujo una innovadora técnica de RFLP y RAPD combinada, llamada polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Estos marcadores se definen como dominantes porque el genotipo heterocigoto es indistinguible. Ambos marcadores no necesitan de información previa sobre el AFLP. También han sido ampliamente utilizados en genómica, y esto ha sido una gran ventaja, especialmente en el campo animal, donde la inversión en la secuenciación de los genomas no ha sido tan elevada en años anteriores. Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la biodiversidad y la filogenia de diferentes especies domésticas con este tipo de marcadores, como la porcina (SanCristobal *et al.* 2006), bovina (Ajmone-Marsan *et al.* 2002) o caprina (Ajmone-Marsan *et al.* 2001), por ejemplo.

Marcadores con uso de PCR específica: la era de los microsátélites

Con el abaratamiento de las técnicas de producción de oligonucleótidos de inicio (*primer* o cebadores) y con la salida al mercado de equipos de electroforesis automatizados, los marcadores moleculares con secuencia conocida dentro del genoma empezaron a utilizarse masivamente. Esto se debió, en parte, a los grandes avances de las técnicas de mapeo genómico, que se desarrollaron en casi todas las especies domesticas. Varias técnicas se desarrollaron usando diferentes tecnologías. Las primeras fueron los TGGE (*Thermal Gradient Gel Electrophoresis*), la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). También fueron muy utilizadas las

técnicas de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) y HP (*Heteroduplex Polymorphisms*), pero sobre todo los usadísimos PCR-RFLP, que utilizan enzimas de restricción sobre fragmentos amplificados de PCR. Sin embargo, un nuevo marcador entró de rutina en todo los laboratorios de genómica, por lo económico y su gran eficacia para diferentes propósitos: los microsatélites o *Short Tandem Repeat* (Edwards *et al.* 1991). Estos marcadores son repeticiones de secuencias simples (Jacob *et al.* 1991) y se sitúan en el ADN denominado extragenómico, que representa cerca del 70% de todo el genoma de los mamíferos. Las secuencias repetidas pueden tener diferentes patrones, con una longitud media de entre diez y treinta unidades, y tener, asimismo, diferente número de nucleótidos repetidos: dinucleótido, trinucleótido, tetranucleótido, etc. (Schlotterer 2000). Los microsatélites se han utilizado de manera eficaz en el estudio del genoma animal y en el mapeo de regiones cromosómicas, tanto en animales domésticos como en el hombre (Maddox *et al.* 2001; Antoniou *et al.* 2002). Sin embargo, donde tuvieron una utilización fundamental fue en la verificación y control de las paternidades de los individuos, tanto en el caso de reproductores animales como en casos de genética forense policial (Glowatzki-Mullis *et al.* 2007). El uso de los secuenciadores automáticos (toda la familia ABI – *Applied Biosystem*) de ADN y la introducción de métodos de marcadores relativamente económicos (se pasó, por ejemplo, de la tinción en plata a los fluorocromos), hizo que el uso de dichos marcadores se volviera la herramienta principal para los estudios de biodiversidad animal y vegetal, con el apoyo financiero de diferentes países a varios proyectos internacionales sobre las principales especies ganaderas (<http://www.globaldiv.eu/>, www.econogene.eu; www.biobovis.jimdo.com, etc.). Estos marcadores tienen, de todas formas, algunos puntos negativos, debido a los errores de tipificación que obligan a un continuo proceso de estandarización entre laboratorios (Angier 2001; Wiparati 2003). A pesar de esto, y aunque el genotipado con marcadores SNPs está reemplazando progresivamente a los microsatélites –sobre todo en la investigación–, debemos señalar que, en las verificaciones de paternidad todavía son los marcadores de elección. Esto se debe, fundamentalmente, al elevado costo de los modernos chips de DNA, que obliga, entre otras cosas, a reanalizar enormes bases de datos genealógicas. En la ciencia forense humana el cambio todavía se ralentiza más, por la dificultad jurídica de reanalizar bases de datos de ADN humano, y por el gran tamaño de éstas.

Los SNPs: el marcador molecular del futuro...o no?

El polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) es una mutación que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Esta mutación puede ser el cambio de una única base por otra, definiéndose como transición si corresponde al cambio de una base del mismo tipo (purinas o pirimidínicas) por otra (A>G o T>C) o como transversión si una base se sustituye por otra de diferente tipo (A>T o G>C). Pero, también, pueden ser inserciones o deleciones de una base en medio de una secuencia (Brown 1999). Los SNP constituyen casi el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen en una de cada 1,300 bases como promedio a lo largo del genoma humano. Esto significa que en un genoma animal hay un promedio de cerca de 2.300.000 SNPs (Brown 1999). El notable cambio operado con respecto a los microsatélites es que, la automatización que este marcador puede permitir, facilita la lectura de centenares de millares de marcadores por cada análisis. Además, estando los SNPs situados en zonas del genoma que presiden la codificación de los RNAs y el control de la replicación (promotores y zona blanco –targets de microRNAs–), pueden ser utilizados de forma simultánea como marcadores de población, para verificar las filiaciones y el pedigrí, y también para realizar estudios filogenéticos (Rohrer *et al.* 2007). Se utilizan, asimismo, como marcadores de genes candidatos en estudios de selección asistida por marcadores de pocos genes (Di Stasio & Rolando 2005), o en grandes *array* de varios genes a la vez (Williams *et al.* 2009). En recientes trabajos, se ha descubierto la ventaja de estudiar las variaciones del genoma de un animal en el conjunto, tomando en cuenta el desequilibrio de ligamento de los marcadores con los fenotipos del mismo (Heyen *et al.* 1999; Hayes *et al.* 2006), o analizando las relaciones de todos los genes con una determinada característica fenotípica (García-Gómez *et al.* 2011). El número de SNPs analizables por cada análisis ha ido creciendo, pasando de los 15-20 marcadores por ensayo/día de la técnica de *primer extension*, hasta los 50.000 SNPs simultáneos con las plataformas de *Deep Genotyping* de Illumina y AffimetryX. Para los estudios de asociación o GWAS (Genome Wide Association Studies), o sea, el estudio de asociación entre fenotipos y alto número de marcadores SNPs, los investigadores disponían, por ejemplo, en la especie bovina (siendo la primera especie de uso comercial en la que se secuenció el genoma entero y se dispuso de una herramienta de genotipado masivo desde los primeros años), de un chip de 30.000 SNPs en el año 2000, de uno de 50.000 en el 2005, y hoy día, se dispone ya, de uno de 100.000 marcadores. Los avances tecnológicos están permitiendo que en periodos de tiempo muy cortos salgan equipos de genotipado con más capacidad de trabajo, entendido como

número de marcadores SNPs analizables por muestra o número de muestras procesable por día/operador, pero también se multiplican las aplicaciones que pueden ofrecer (genotipado masivo, estudio de metilación de ADN, estudio de proteínas y perfiles de ARN). Esto va junto a una continua reducción de coste de una parte de los equipos mismos y de otra de las análisis por muestra. En efecto, en la raza bovina Frisona ya se utiliza de forma rutinaria en muchos países para determinaciones de paternidad y por su aplicación en la selección genómica (Bendixen *et al.* 2005). Sin embargo, la ciencia y las técnicas genéticas van a una velocidad superior con respecto a otras áreas del saber humano: la invención del primer automóvil con motor autónomo fue en 1769, y desde entonces, en 250 años no ha habido avances significativos que cambiasen totalmente su industria; el primer cambio importante de rumbo se está empezando a dar actualmente, con los primeros automóviles que funcionarán con hidrógeno. En la genética molecular, la aplicación de la PCR, la base de todas las metodologías, es apenas del año 1993 (Mullis *et al.* 1986), y durante esa época el mayor reto era cómo extraer ADN de los tejidos. Hoy, sin embargo, a 18 años de distancia, ya conocemos la secuencia completa del genoma de casi todos los principales seres vivos. En este escenario, el chip de ADN ya no es la única herramienta moderna para el estudio de los genomas, y como les ha sucedido a modernos ordenadores, ya es obsoleto antes de que su uso se haya vuelto masivo en todos los laboratorios.

La breve vida del chip de SNPs: rumbo hacia la secuenciación masiva

Desde hace un par de años está disponible una nueva técnica, la Next Generation Sequencing (NGS) que permite la secuenciación completa de pequeños fragmentos (30-400 bp) en centenares de copias simultáneas. Las plataformas GS FLX 454 de Roche y Genome Analyzer IIX de Illumina son unas de las más conocidas, aunque cada una de las casas productoras de equipos están entrando en la carrera de esta nueva tecnología. Ambas plataformas son bastante distintas, tanto desde un punto de vista metodológico como de cantidad y longitud de las secuencias analizadas. En este sentido, el método 454 de Roche permite obtener secuencias de mucha mayor longitud (>400 pb) que el sistema Solexa de Illumina (30-100 pb); sin embargo, cantidad total de secuencias generadas es menor, y el precio considerablemente mayor (Nowrousian 2010). Los costes de los procesos de secuenciación del ADN se están reduciendo mucho, y con interés creciente se espera la etapa final, cuando será posible secuenciar “un genoma a 1.000 dólares” (Wolinsky 2007). Esta reducción de costes y la gran cantidad de datos moleculares generados (el aparato de Roche, en la versión de pequeña capacidad, puede secuenciar actualmente a un ritmo de 100.000 secuencias por día) está provocando que el uso del chip de SNPs ya no sea tan caro, por lo menos en los grandes proyectos de investigación. Las previsiones más probables son que cada vez será más fácil y económico disponer del genoma completo del animal y relacionarlo con el problema principal motivo del estudio. Después de esto, los mayores retos serán la gestión y los análisis informáticos y estadísticos de la gran cantidad de datos moleculares generados: esto nos hace prever que, a partir de ahora, en los laboratorios serán más necesarios buenos bioestadísticos que biólogos moleculares.

La nueva generación de la genómica: la genómica funcional

La genómica funcional es un campo de la genética que se propone utilizar la vasta base de datos genómicos producida por los proyectos de secuenciación genómica (Proyectos Hapmap: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> - humanos; <http://www.sheepmap.org/hapmap.php> - ovinos) para describir las funciones e interacciones entre genes y proteínas. A diferencia de la genómica y la proteómica, la genómica funcional se centrará en los aspectos dinámicos de los genes, como su transcripción, la traducción, y las interacciones proteína-proteína. Se irá perdiendo el concepto de “estaticidad” del genoma, y tendremos que enfrentarnos a una nueva genética, donde las secuencias del ADN sólo serán la base del complejo mecanismo de la herencia y del control de las funciones biológicas. En conclusión, con el conocimiento completo de la secuencia del ADN de los organismos vigentes, sólo hemos empezado a exteriorizar la superficie de un mundo inmenso; en efecto, a pesar de que ya conozcamos los genomas de la especie humana y la de los animales de fomento, todavía desconocemos muchas de las funciones que tienen la mayor parte de los genes. Otra complicación añadida, en el entendimiento de los mecanismos genéticos, es todo lo referente al mecanismo de la transcripción (el proceso de tránsito del ADN a ARN). Hoy día sabemos que el ARN está sujeto a modificaciones considerables antes de ser traducido en la proteína que codifica: este mecanismo se conoce como *Alternative Splicing* (expresión alternativa) del ARN. La expresión del ADN en ARN, y posteriormente en proteína, ya no es el proceso lineal que conocemos desde hace años, sino un proceso complicado que está influenciado, además, por las condiciones ambientales, fisiológicas etc. En particular, los efectos del ambiente (como la alimentación) sobre los mecanismos de herencia están

siendo estudiados minuciosamente, y se engloban en una nueva rama llamada Epigenética, que estudia cómo los efectos ambientales pueden iniciar mecanismos de herencia permanente en el genoma animal.

La aplicación de las biotecnologías en las razas domésticas: el difícil camino entre la selección asistida por marcadores y la conservación.

Uso de las tecnologías en razas locales

Quizá, el argumento más importante para la conservación de las razas domésticas locales radica en que son una fuente de variación genética, donde la selección natural ha desarrollado diversos genotipos que muestran una amplia gama de adaptación a diversos ecosistemas, que pueden ser determinantes en algunas regiones. Sin embargo, una de las carencias en Latinoamérica, es la falta de caracterización de estos recursos genéticos y, en consecuencia, no se les ha otorgado la consideración necesaria para conseguir medios que garanticen su propia preservación.

Uno de los principales obstáculos para conseguir recursos económicos, en algunos países latinoamericanos, se ha debido al hecho de que la mayoría de los animales domésticos no son nativos del continente Americano, y por lo tanto se piensa, de forma errónea, que no poseen ninguna característica diferencial que sea relevante para su conservación. Esta actitud se manifiesta aún más cuando se observa, todavía, la ingente cantidad de dinero que se destina en sustituir a los recursos genéticos locales por recursos foráneos, teóricamente más productivos. Se denota que existe un gran desconocimiento acerca de la importancia que representan estos recursos locales, no sólo para los países de América, sino también para la humanidad en su conjunto. Después de más de 500 años de adaptación a las condiciones locales, las poblaciones de animales autóctonos se han ido diferenciado, y la mayoría de ellas continúan estando asociadas a etnias o ecosistemas particulares. Esta situación, en primera instancia, convierte a estas poblaciones o razas en indispensables para algunas zonas, siendo por otra parte, una fuente importante de variabilidad cada vez más trascendente, pues la alta especialización que han alcanzado algunas razas cosmopolitas, las vuelve más vulnerables a cualquier cambio en los sistemas de producción, o a posibles cambios en el medio ambiente, así como, a cambios en el gusto de las demandas de los consumidores. Bajo la premisa de que la utilidad de una raza asegura su permanencia, se da por hecho que las razas de elevada producción no requieren de programas de conservación. Sin embargo, esto, no es una verdad absoluta, cuando se observa el elevado grado de similitud entre las poblaciones altamente especializadas. Para secundar este desarrollo se hace necesario mantener las razas locales que ofrecen la diversidad, la cual podría ser empleada en un futuro para apoyar la producción comercial.

Aunque la conservación de los recursos genéticos debería aplicarse a todas las poblaciones animales domésticas, la prioridad actual recaería en las razas nativas o locales, por lo que sería urgente realizar una caracterización, lo más completa posible, de estos recursos zoogenéticos. En este sentido, la importancia de conservar las poblaciones “*in situ*” debería ser una estrategia básica, acompañada, asimismo, de la conservación “*ex situ*” de estas razas locales, utilizando las técnicas de conservación “*in vitro*” y creando colecciones de germoplasma de las razas, con el objetivo primordial de preservar la mayor cantidad de variabilidad genética posible, en el menor número de individuos.

La decisión de conservar poblaciones, con cualquiera de las estrategias mencionadas anteriormente (*in situ*, *ex situ* e *in vitro*), hacen necesaria la detección de los individuos óptimos que requieren ser conservados para cada caso en particular. Esto se logra, únicamente, habiendo realizado previamente una caracterización exhaustiva de dichas poblaciones.

El uso de las biotecnologías en las razas locales podría definirse con cuatro aspectos básicos:

- La caracterización genética.
- La detección de genes que puedan ser de importancia para la conservación de la raza.
- El fomento productivo de alguna característica, o producto, de la raza, que permita su comercialización y la preservación por sí misma.
- Valores genéticos genómicos.

- a) **Caracterización genética.** En este aspecto es probablemente donde, actualmente, se puede utilizar mejor la biotecnología. Con el uso de las secuencias de ADN y de la bioinformática, es posible diferenciar, de forma objetiva, las poblaciones, y dentro de éstas a los individuos. De esta manera se podrían priorizar las poblaciones que merecen ser conservadas con urgencia, escogiendo, además, los individuos más representativos. Por otro lado, la caracterización fenotípica debe utilizarse en su

conjunto para ayudarnos a tomar la decisión más adecuada. Aquí es donde se vuelven más indispensables los marcadores moleculares, tales como los microsatélites y los SNP's, para ayudarnos a diferenciar las poblaciones, adecuadamente. Podemos dar algunos ejemplos en los que, utilizando únicamente características fenotípicas como el uso de los colores o las medidas zoométricas, no se ha podido diferenciar convenientemente las poblaciones. Podría ser el caso de la cabra Serpentina de Portugal, que fenotípicamente es muy parecida a la cabra Repartida de Brasil, o los bovinos de la raza Marismeña de España con el ganado criollo de Chiapas, México, que poseen una gama de colores y de forma de cuernos muy similares. Cuando los recursos económicos son escasos, y se requiere la toma de decisiones importantes en cuanto a qué poblaciones conservar, los marcadores microsatélites se convierten en una poderosa herramienta para hacer más objetiva la decisión.

- b) **La detección de genes de importancia para la preservación de la raza.** La tarea de localizar genes es complicada y muy costosa, sobre todo por el tamaño de las bases de datos implicados y por la dificultad añadida de distinguir la señal, del ruido acumulado en los genomas. En los eucariotas, se complica todavía más por los enormes genomas que poseen, por la gran cantidad de secuencias basura que aparentemente no tienen una función biológica específica, y por la presencia de intrones. La variabilidad genética de la gran mayoría de caracteres de interés económico viene determinada, generalmente, por varios *loci* (herencia poligénica). Sin embargo, la teoría del modelo infinitesimal, en el que se supone que las características cuantitativas están determinadas por muchos genes con poco efecto, ha mostrado algunas excepciones, y ha sido posible detectar algunos genes que poseen efectos de una mayor magnitud, a los que se les ha denominado como genes mayores (QTL's). Estos genes, denominados mayores, tienen un efecto aditivo sobre la expresión fenotípica de los caracteres, mayor a 0,5 desviaciones estándar. Se han detectado varios de estos genes en poblaciones de animales domésticos. Uno de los más conocidos es el gen Booroola en ovinos, que incrementa el tamaño de la camada de 1,4 crías hasta 2,5 en ovejas homocigóticas. Se detectó inicialmente tras la observación de diferencias importantes entre familias, y posteriormente se localizó su posición en el genoma, mediante marcadores moleculares (Montgomery *et al.* 1993). Como el ejemplo anterior, que surgió al poder disponer de una base de datos de una población determinada, las razas locales son reservorios importantes de la biodiversidad. En muchas poblaciones locales se ha documentado la existencia de ejemplares que poseen características interesantes: como la resistencia a enfermedades, elevadas prolificidades, buen desempeño y productividad en ambientes difíciles, etc., que son características que están determinadas genéticamente y que serían de gran importancia en otras poblaciones. La capacidad de adaptación de las especies locales a periodos de escasez se debe, en general, a varios mecanismos, como: desarrollo de bajos requerimientos metabólicos, eficiencia digestiva, capacidad para utilizar alimentos muy fibrosos, y deposición de nutrientes como alimentos de reserva (Mirkena *et al.* 2010). La tendencia universal del mejoramiento genético, a enfocar la selección únicamente hacia un producto concreto, como puede ser la carne o la leche, conduce generalmente al fracaso de la sustitución de las razas locales por razas exóticas. Por esta razón, las razas locales se consideran improductivas cuando sólo se considera un producto a la vez, y dejan de lado otros aspectos, como los sanitarios, de supervivencia o longevidad, o de características reproductivas.
- c) **El fomento productivo de alguna característica, o producto, de la raza, que permita su comercialización y la preservación por sí misma.** En este sentido es necesario realizar la caracterización de algunos aspectos productivos que permitan revalorizar las razas locales. La oportunidad de poder ofertar productos artesanales animales, como la lana de ovejas nativas o bien quesos preparados de manera artesanal, y que, con ayuda de las técnicas moleculares se puedan establecer mecanismos de trazabilidad de esta riqueza local, es muy importante. Se entiende por trazabilidad la posibilidad de mantener la identificación del animal, o de productos animales, a lo largo de toda la cadena productiva. En este sentido, mantener la certeza, en toda la cadena, de los productos obtenidos a partir de las razas locales, salvaguardando la salud pública y la salud animal, revalorizará los sistemas de producción tradicionales. La implementación de sistemas de trazabilidad, a partir de la identificación del ADN de los productos, es una herramienta biotecnológica importante en apoyo a los productos tradicionales. Ejemplos como éste ya están funcionando en España con los productos del cerdo Ibérico, que debido a su elevado precio son blanco preferente de fraudes nacionales e

internacionales. Estos sistemas de trazabilidad ayudan a proteger tanto a los productos individuales como a los de razas o poblaciones determinadas (Dalvit *et al.* 2007).

- d) **Valores genéticos genómicos.** Históricamente, la selección basada en la genética estadística ha demostrado su eficiencia para responder a los cambios de mercado, tanto por parte de los criadores de razas puras como por los hatos comerciales. Sin embargo, la tasa de cambio genético es lenta, debido a los largos intervalos generacionales y a que los métodos de selección han tenido unas, relativamente, bajas precisiones. La tecnología basada en el ADN, abre ahora la posibilidad para resolver este problema, incrementando las precisiones de los valores de estimación de los EPD's (valores genéticos o mejorantes), y mejorando la eficiencia de la selección. El descubrimiento de los QTL's motivó a la investigación sobre la selección asistida por marcadores (MAS), siendo uno de los casos más exitosos en la industria cárnica, el polimorfismo detectado para explicar la terneza de la carne.

La secuenciación del genoma bovino, basado en la raza Hereford, ha producido un *pool* de 300.000 SNP, lo que llevó a confeccionar una plataforma de genotipado de más de 50.000 SNP's. Esta tecnología ha permitido poder empezar a explorar el genoma completo con mayor detalle. La selección basada en el genoma (selección genómica) se ha ido desarrollando a una gran velocidad.

El mejoramiento de características productivas que son difíciles de medir, es un proceso costoso y lento; sin embargo, la tecnología genómica ofrece alternativas para estas características, así como, para otras que tienen que ver con la productividad y la salud animal. Actualmente, en el sector lechero, esta tecnología está teniendo un fuerte impacto.

Las predicciones genómicas combinan los datos genéticos, fenotípicos y de pedigrí, para incrementar la precisión del mérito genético estimado, y por tanto, decrece el intervalo generacional. En cambio las evaluaciones genéticas tradicionales combinan sólo los datos fenotípicos y la probabilidad de que los genes sean idénticos por descendencia a partir del pedigrí, en lugar de seguir la trazabilidad de los genes individuales. Los genotipos, con miles de *loci* marcadores, pueden cuantificar la similitud genética de manera mucho más efectiva.

El éxito de la genómica se basa en detectar algún efecto genético y la porción responsable del cromosoma, de alguna característica heredable. La selección asistida con marcadores (MAS) tuvo poca efectividad con los genes mayores en poblaciones reales. Actualmente, podrían utilizarse ensayos con alta densidad de marcadores tipo SNP, para detectar efectos genéticos más pequeños y, hoy en día, es teóricamente posible, realizar evaluaciones genómicas si un gran número de animales son genotipados con marcadores, y nos basamos para ello en miles de registros productivos (VanRaden *et al.* 2009).

Uso de marcadores moleculares de alta densidad.

Una nueva tecnología denominada selección genómica está revolucionando el mejoramiento de la industria lechera. La selección genómica se refiere a las decisiones tomadas en base a los valores genéticos genómicos (GEBV, por sus siglas en inglés). Los GEBV se calculan como la suma de los efectos medios de un grupo de marcadores, distribuidos densamente en el genoma o en las regiones que se presume están relacionadas con alguna característica de interés, y potencialmente capturan a todos los QTL que contribuyen a la variación de esa característica. Los efectos de los QTL se infieren, previamente, a partir de los haplotipos o polimorfismos de los marcadores SNP, que se estiman a partir de grandes poblaciones con mucha información fenotípica de referencia. En las generaciones subsiguientes, sólo se requiere la información de los marcadores para calcular los GEBV. La fiabilidad de los GEBV, estimados de esta forma, ya ha sido evaluada en poblaciones experimentales de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y Holanda. Dichas poblaciones de referencia utilizaron entre 650 y 4.500 sementales con pruebas de progenie, y se genotiparon los animales para, aproximadamente, 50.000 marcadores, distribuidos por todo el genoma. La fiabilidad de los GEBV, en sementales jóvenes, osciló entre el 20% y el 67%, dependiendo de la heredabilidad de la característica, del número de sementales utilizados en la población de referencia, y de los métodos de estimación utilizados (Hayes *et al.* 2009). El incremento de fiabilidad fue lo suficientemente importante como para que algunas compañías, que comercializan semen de bovinos lecheros, estén ya ofertando grupos de sementales para uso comercial basados únicamente en su GEBV, a los dos años de edad.

La revolución en la selección genómica empezó con el desarrollo de dos aspectos básicos: el primero fue la secuenciación del genoma bovino, en el cual se descubrieron varios miles de marcadores de ADN de tipo SNP. Este descubrimiento redujo drásticamente el costo del genotipado. El segundo aspecto, fue la demostración de

que es posible hacer una selección precisa cuando los valores genéticos se predicen a partir de una densa cantidad de marcadores distribuidos en el genoma. Las implicaciones derivadas de aumentar las fiabilidades de valoración para los animales al nacimiento, son muy importantes. En diversos estudios de simulación se sugiere que, la confianza obtenida en las estimaciones de los GEBV en los becerros al nacimiento, puede ser tan alta como las precisiones obtenidas de los EPD's después de una prueba de progenie. Potencialmente, la selección genómica podría conducir a duplicar la tasa de ganancia genética obtenida por la selección y el mejoramiento, a los dos años de edad del animal, en lugar de a los cinco o más años (Schaeffer, 2006).

Durante muchas décadas ha habido un clamor de que la genética cuantitativa ya murió, o que está muriendo, pero el caso es, que siempre resucita. Los estudios realizados han revelado la existencia de casi 50 QTL's, pero aun, y tratándose de características importantes, éstos sólo explican el 5% de la variación genética. Por esta razón, parece que la genética cuantitativa sigue presente, a pesar de la generación de miles de marcadores, esto porque todavía no se conocen las complicadas funciones de regulación de los genes y la interacción entre ambiente y expresión génica (epigenética). En poblaciones de animales de razas locales, que dispongan de datos genealógicos, de registros productivos (fenotipos) y análisis de marcadores moleculares, permitirá el uso de esta gran y novedosa herramienta.

Medición de Fenotipos en las Razas Locales.

Según datos de la FAO, respecto a la diversidad de los animales domésticos (DAD-IS), existen 10.500 razas registradas de especies de mamíferos y 3.500 de especies avícolas, en 182 países participantes. El término que agrupa esta clasificación es el de "Raza" y en varios países de América aún existen poblaciones que no están consideradas en esta base de datos debido a que falta un libro genealógico (Cardellino & Boyazoglu, 2009). Para la aplicación de la biotecnología en aspectos de producción, se hace necesario contar con la genealogía de los animales y la caracterización de los genotipos. Los avances de la genética molecular, la biotecnología y la genómica ya están mostrando logros impresionantes en las ganaderías ovinas, caprinas, bovinas, porcinas, etc., generando nuevos criterios racionales (genes, marcadores y mapas genéticos) para su mejora genética, por medio de la identificación de genes y *loci* que, como QTLs, tienen efectos importantes en los fenotipos productivos. La parte más relevante de la mejora animal estriba en la medición de caracteres que son, o pueden ser, de interés zootécnico. Implementar programas de conservación y de mejora en las razas locales, que generalmente son mantenidas por productores a pequeña escala, implica un gran desafío. El registro de datos de comportamiento y de pedigrí, en condiciones de subsistencia, es una labor extremadamente difícil, y en algunas situaciones imposible. Esto implica que las evaluaciones genéticas, como se desarrolla de manera estándar, planificando los apareamientos y midiendo las características deseables, deberán realizarse de manera muy diferente.

Esta situación no es nueva, pues ya se ha intentado abordar desde hace más de 50 años. Sin embargo, ahora, existen las herramientas biotecnológicas adecuadas, y en las que será necesario apoyarse. Otro aspecto importante es la relación de las personas con los animales (comunidades y razas locales). Existen ejemplos de que esa relación puede ser exitosa y llevar a cabo programas de mejoramiento bajo estas circunstancias; como es el caso del borrego de Chiapas, donde el grupo de investigadores de la Universidad de Chiapas lleva más de 25 años trabajando con las comunidades indígenas, y gestionando, actualmente, un programa de mejoramiento genético utilizando para ello herramientas tradicionales y biotecnológicas.

El valor inherente de los recursos locales depende, básicamente, de tres aspectos: el uso directo del recurso, el uso indirecto y el valor por existir (Gollin & Evenson 2003). En el caso de los recursos que tienen algún interés económico sería necesario caracterizar sus fenotipos para obtener fondos para su conservación. Aun, cuando los recursos genéticos locales son utilizados, la caracterización de la calidad no está siempre bien documentada.

El advenimiento de las nuevas biotecnologías genómicas producirá mayores oportunidades de desarrollo en los recursos genéticos locales, en función de la caracterización fenotípica. La posibilidad de que, por medio de la biotecnología, se facilite el conocimiento de los fenotipos y se facilite la selección de los animales idóneos para cada situación, es todavía una posibilidad remota. Por lo tanto, se deben dedicar los mayores esfuerzos a la caracterización fenotípica, y relacionarla posteriormente con el genoma. Por otra parte, las herramientas por la caracterización genética seguirá basándose en estereotipos y esquemas socio-económico planteados por la ganadería comercial, y las ventajas de los recursos locales seguirán siendo no valorado suficientemente en un entorno económico votado a la eficiencia económica y productiva propiamente dicha. La verdadera investigación sobre los recursos genéticos locales deberá enfocarse hacia la detección de las ventajas

comparativas con respecto a la producción comercial, contando para ello con las metodologías apropiadas para optimizar los escasos recursos económicos destinados a este fin.

El paso más importante hacia la obtención de registro de fenotipos que son importantes dentro de cada raza local, deberá ser la formación de una asociación que capture el inventario y la información genealógica para obtener una base de datos. Esto implica la concientización de las personas poseedoras del recurso y que serán los más aptos en trabajar por la protección de su patrimonio. Sólo se puede mejorar lo que se puede medir.

Tabla 1. Algunas de las principales y más utilizadas tecnologías para el genotipado de SNPs

Tecnología	SNPs/ensayo	multiplex	automatización	Muestra por día	Plataformas	\$/muestra
PCR-RFLP	1-2	no	no	Menos de 20	-	10-30 ^D
Real Time	1-3	si ^A	si	>360	Varias	5-15
Real Time	1-3	si ^B	si	>5000 ^C	Roche ⁵	0,5-1
SNAPSHOT	10-36	si	si	De 50 a 96	ABI ¹	5-10
Mass-Array	40	si	si	25.000	Sequenom ²	2
Open Array	256	si	si	76.000	ABI ³	20
Bead CHiP	>50-80.000	si	si	>100	Illumina ⁴	150

A: por modelo con multicolores

B: Modelos de High Resolution Melting Analysis (HRM)

C: depende del uso y estaciones de pipeteo automáticas y de la técnica de PCR (clásica o rapid amplification)

D: depende del precio del enzima de restricción

1: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600762>

2: <http://www.sequenom.com/home/products---services/genetic-analysis/applications/snp-genotyping-with-plex-gold/>

3: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=605784&tab=DetailInfo>

4: <http://www.illumina.com/applications/agriculture.ilmn>

5: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/htc/index.jsp>

Bibliografía

- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanese E., Gorni C., Valentini A. & Cicogna M. (2001) Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Animal Genetics* 32, 281-8.
- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Milanese E., Bozzi R., Nijman I.J., Buntjer J.B., Valentini A. & Lenstra J.A. (2002) Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics* 33, 280-6.
- Angier N. (2001) A fresh look at the straying ways of the female chimp. In: *The New York Times*, New York.
- Antoniou E., Gallagher D., Jr., Taylor J., Davis S., Womack J. & Grosz M. (2002) A comparative map of bovine chromosome 25 with human chromosomes 7 and 16. *Cytogenet Genome Res* 97, 128-32.
- Bamshad M., Wooding S., Salisbury B.A. & Stephens C. (2004) Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nature Reviews Genetics* 5, 598-609.
- Barbujani G. (2006) *L'invenzione delle razze*. Bompiani, Milano.
- Bendixen C., Hedegaard J. & Horn P. (2005) Functional genomics in farm animals – Microarray analysis. *Meat Science* 71, 128-37.
- Brown T.A. (1999) *Genomes*. Bios Scientific Publisher, Manchester.
- Calafell F., Roubinet F., Ramírez-Soriano A., Saitou N., Bertranpetit J. & Blancher A. (2008) Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Human Genetics* 124, 123-35.
- Cardellino R.A. & Boyazoglu J. (2009) Research opportunities in the field of animal genetic resources. *Livestock Science* 120, 166-73.
- Dalvit C., De Marchi M. & Cassandro M. (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* 77, 437-49.
- Di Stasio L. & Rolando A. (2005) A PCR-RFLP method for genotyping the myostatin locus in Piemontese cattle. *Animal Genetics* 36, 521-.
- Edwards A., Civitello A., Hammond H.A. & Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 49, 746-56.
- Foster M.W. & Sharp R.R. (2002) Race, Ethnicity, and Genomics: Social Classifications as Proxies of Biological Heterogeneity. *Genome Research*. 12, 844-50.

- García-Gámez E., Reverter A., Whan V., McWilliam S.M., Arranz J.J., Kijas J. & International Sheep Genomics C. (2011) Using Regulatory and Epistatic Networks to Extend the Findings of a Genome Scan: Identifying the Gene Drivers of Pigmentation in Merino Sheep. *PLoS One* 6, e21158.
- Gizaw S., Van Arendonk J.A.M., Komen H., Windig J.J. & Hanotte O. (2007) Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Animal Genetics* 38, 621-8.
- Glowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J. & Gaillard C. (2007) Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Animal Genetics* 38, 86-8.
- Gollin D. & Evenson R. (2003) Valuing animal genetic resources: lessons from plant genetic resources. *Ecological Economics* 45, 353-63.
- Hayes B., Hagesaether N., Adnoy T., Pellerud G., Berg P.R. & Lien S. (2006) Effects on Production Traits of Haplotypes Among Casein Genes in Norwegian Goats and Evidence for a Site of Preferential Recombination. *Genetics* 174, 455-64.
- Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J. & Goddard M.E. (2009) Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science* 92, 433-43.
- Heyen D.W., Weller J.I., Ron M., Band M., Beever J.E., Feldmesser E., Da Y., Wiggans G.R., VanRaden P.M. & Lewin H.A. (1999) A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics* 1, 165-75.
- Hintum T.J.L.v. (1994) Drowning in the genepool: managing genetic diversity in genebank collections. In: *Dept. Plant Breeding Research*. Univ. Agric. Sciences, Ultuna.
- Hunter R.L. & Market C.L. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel. *Science* 125, 1294-5.
- Jacob H.J., Lindpaintner K., Lincoln S.E., Kusumi K., Bunker R.K., Mao Y.P., Ganten D., Dzau V.J. & Lander E.S. (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67, 213-24.
- Joost S., Bonin A., Bruford M.W., Despres L., Conord C., Erhardt G. & Taberlet P. (2007) A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology* 16, 3955-69.
- Maddox J.F., Davies K.P., Crawford A.M., Hulme D.J., Vaiman D., Cribiu E.P., Freking B.A., Beh K.J., Cockett N.E., Kang N., Riffkin C.D., Drinkwater R., Moore S.S., Dodds K.G., Lumsden J.M., van Stijn T.C., Phua S.H., Adelson D.L., Burkin H.R., Broom J.E., Buitkamp J., Cambridge L., Cushwa W.T., Gerard E., Galloway S.M., Harrison B., Hawken R.J., Hiendleder S., Henry H.M., Medrano J.F., Paterson K.A., Schibler L., Stone R.T. & van Hest B. (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Resources* 11, 1275-89.
- Mirkena T., Duguma G., Haile A., Tibbo M., Okeyo A.M., Wurzinger M. & Sölkner J. (2010) Genetics of adaptation in domestic farm animals: A review. *Livestock Science* 132, 1-12.
- Montgomery G.W., Crawford A.M., Penty J.M., Dodds K.G., Ede A.J., Henry H.M., Pierson C.A., Lord E.A., Galloway S.M., Schmack A.E., Sise J.A., Swarbrick P.A., Hanrahan V., Buchanan F.C. & Hill D.F. (1993) The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genetics* 4, 410-4.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Snikl R., Horn G.T. & Erlich H. (1986) Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51, 263-73.
- Nowrousian M. (2010) Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot Cell* 9, 1300-10.
- Ochman H., Jones J.S. & Selander R.K. (1983) Molecular area effects in *Cepaea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4189-93.
- Petit E., Balloux F. & Goudet J. (2001) Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* 55, 635-40.
- Rohrer G.A., Freking B.A. & Nonneman D. (2007) Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Animal Genetics* 38, 253-8.
- Roosen J., Fadlaoui A. & Bertaglia M. (2005) Economic evaluation for conservation of farm animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 217-28.
- SanCristobal M., Chevalet C., Haley C.S., Joosten R., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A., Amigues Y., Boscher M.Y., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., Desautels C., Alderson L., Fimland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla J.L., Martinez A.M., Ramos M., Glodek P., Meyer J.N., Gandini G.C.,

- Matassino D., Plastow G.S., Siggens K.W., Laval G., Archibald A.L., Milan D., Hammond K. & Cardellino R. (2006) Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Anim Genet* 37, 189-98.
- Schaeffer L.R. (2006) Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 218-23.
- Schlotterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-71.
- Sønsteby J.H., Borgstrøm R. & Heun M. (2007) A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. *Molecular Ecology* 16, 1427-38.
- VanRaden P.M., Van Tassell C.P., Wiggans G.R., Sonstegard T.S., Schnabel R.D., Taylor J.F. & Schenkel F.S. (2009) Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Science*. 92, 16-24.
- Williams G.J.K., Kubelik A.R., Livak J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18, 6531-5.
- Williams J.L., Dunner S., Valentini A., Mazza R., Amarger V., Checa M.L., Crisa A., Razzaq N., Delourme D., Grandjean F., Marchitelli C., Garcia D., Gomez R.P., Negrini R., Marsan P.A. & Leveziel H. (2009) Discovery, characterization and validation of single nucleotide polymorphisms within 206 bovine genes that may be considered as candidate genes for beef production and quality. *Anim Genet* 40, 486-91.
- Wiparati P.J. (2003) An automated allele-calling system for high-throughput microsatellite genotyping. In: *Department of medical Biology*. University of Melbourne, Melbourne.
- Wolinsky H. (2007) The thousand-dollar genome. *EMBO Rep* 8, 900-3.