



universidad euskal herriko  
del país vasco unibertsitatea

# Control de paternidades y potencial de asignación racial mediante la utilización de microsatélites en 4 razas equinas del Pirineo occidental

A. SOLIS, B. JUGO, A. ESTONBA



*Animali Biologia eta Genetika Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea/ Universidad del País Vasco*

## 1. INTRODUCCION

Los microsatélites son marcadores muy abundantes en el genoma de mamíferos, muy polimórficos y fáciles de identificar, lo que los hace marcadores preferenciales para la estimación de la variación genética, la estima de distancias genéticas y la determinación de relaciones evolutivas.

Uno de los campos en los que los microsatélites pueden también ser de gran utilidad es el control de paternidades. Su abundancia relativa en el genoma equino y la posibilidad de analizar gran cantidad de marcadores en una única reacción de PCR hace que estos marcadores sean ventajosos respecto a otros marcadores polimórficos convencionales.

Además, existe un interés creciente en el uso de marcadores moleculares aplicados a una muestra anónima para identificar la población de origen. Así, otra aplicación del análisis de marcadores altamente polimórficos podría ser la asignación de identidades poblacionales o raciales en base al genotipo de un individuo dado. El potencial de discriminación entre individuos es esencial para el manejo efectivo tanto de poblaciones naturales como de animales domésticos. Además, un test de identidad racial podría ser útil en la validación de la calidad y origen de productos ganaderos.

En este trabajo nos hemos planteado dos objetivos: evaluar un panel de microsatélites tanto en cuanto a su utilidad para el análisis de paternidades como en cuanto a su potencialidad para la asignación racial de muestras individuales en cuatro razas equinas del Pirineo occidental: Euskal Herriko mendiko zaldia (EHMZ), Pottoka (POT), Jaca Navarra (JN) y Burguete (BU), todas ellas calificadas como de protección especial.

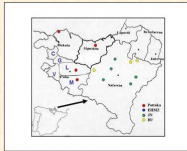


Figura 1. Puntos de muestreo en la Comunidad Autónoma Vasca (Euzkara, Guetxo y Araba) y Navarra.

Raza	Nº animales muestreados	Tamaño poblacional*	Libro genológico S (1995)
Euzkai Zaldia	163	4.500	S
Burguete	147	1.141-2.000*	S (1995)
Pottoka	89	42	No
Jaca Navarra	65	250	No
Potoka	40	20	No
JN+AL	940		

\*Estimado (1995) 14-157-163  
\*Estimado por Altonaga (1997), Carreras (1983)

Microsatélite	Conexión	Referencia
MSL1	JN	Van Halbeerg (1994)
HTG4	JN	Blagovestov (1992)
ADP1	JN+AL	Blagovestov (1995)
HTG7	JN	Galvan (1999)
HTG6	JN+AL	Blagovestov (1992)
HTG7	JN	McDonald et al. (1996)
HTG3	JN	Galvan (1999)
ADP2	JN	Blagovestov (1995)
ADP2	JN+AL	Blagovestov (1995)
HTG9	JN	McDonald et al. (1996)

## 2. MATERIALES Y METODOS

### RAZAS

Han sido analizados un total de 440 animales pertenecientes a cuatro razas nativas (Tabla 1 y Fig. 1). Estos animales fueron muestreados evitando el parentesco entre animales en la medida de lo posible. Se ha incluido una pequeña muestra de 20 individuos de pura raza (CT) a modo de referencia.

### ANÁLISIS DE MICROSATELITES

El DNA fue extraído de sangre total siguiendo protocolos standard. Los microsatélites analizados y las condiciones de PCR fueron las descritas en el protocolo de Stock Marks para caballos, Equine Paternity PCR Typing Kit (Tabla 2), todos ellos recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG). La estandarización de nuestra nomenclatura ha sido verificada en el Congreso de la ISAG en Julio de 2000.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### Control de paternidades

Las frecuencias alélicas y las probabilidades de exclusión con un parental conocido o sin el fueron calculadas para cada locus mediante el programa CERVUS (Marshall, 1998).

#### Potencial de asignación racial

\*Árbol filogenético. Se generó una matriz de distancias genéticas basadas en el estadístico de alelos compartidos utilizado por Bowcock y coles (1994) mediante el programa Microsat 1.5 (Minich y cols. 1995). A partir de esta matriz se construyó un árbol filogenético basado en el algoritmo UPGMA mediante el programa PHYLIP (Felsenstein, 1995) utilizando los genotipos individuales como unidades taxonómicas operativas. El árbol filogenético se visualizó mediante el programa Treeview (Page, 1996).

\* Test de asignación racial. Se estimó la asignación racial de los individuos y la probabilidad de esta asignación utilizando las distribuciones de frecuencias alélicas e implementación de un método de máxima verosimilitud mediante el programa WHICHRUN 3.2 (Banks y Eichert, 2000).

## 3. RESULTADOS

### CONTROL DE PATERNIDADES

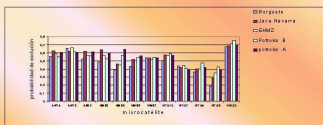


Figura 2. Probabilidad de exclusión de cada locus microsatélite en las razas analizadas.

RAZA	PE	PE <sub>u</sub>
EHMZ	0.99441	0.99919
Burguete	0.99321	0.99732
Pottoka A	0.99793	0.99983
Pottoka B	0.99734	0.99944
Jaca Navarra	0.99983	0.99994
Pura Raza	0.99983	0.99973

Las probabilidades de exclusión (PE) obtenidas para cada marcador (Fig.2) indican que los microsatélites analizados pueden ser considerados muy discriminantes en las cuatro razas analizadas (PE>40%, salvo HTG6 en la mayoría de las poblaciones).

El conjunto de marcadores utilizados presenta un poder discriminante muy elevado: la probabilidad de exclusión acumulada calculada en base al análisis conjunto de 12 microsatélites es superior al 99,9 % en las cuatro razas equinas (Tabla 3).

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y apoyo de Koldo Gotzon Pérez de la Diputación Foral de Araba, Jon Agirre de SERGAL, Inigo Agirre de la Diputación Foral de Gipuzkoa, Alberto Pérez de Muiñan de ITG-Guadalupe, e Iñaki Izantzi y Inigo Pascual de la Diputación Foral de Bizkaia. Gracias también a E. De J.L.Vega-Piá por la ayuda ofrecida en la estandarización de la nomenclatura de los microsatélites y a todos los criadores de caballos por su colaboración. Este estudio ha sido subvencionado por la UPVEHU y por el Departamento de Industria del Gobierno Vasco y las asociaciones de ganaderos Arrielandia, Lurgatza y SERGAL.

### POTENCIAL DE ASIGNACIÓN RACIAL

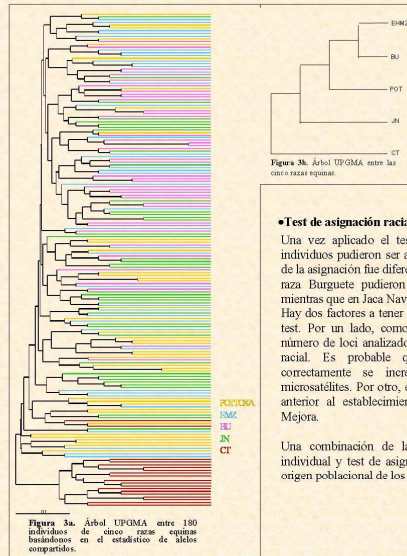


Figura 3a. Árbol UPGMA entre 150 individuos de cinco razas equinas basándose en el estadístico de alelos compartidos.

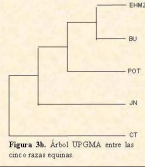


Figura 3b. Árbol UPGMA entre las cinco razas equinas.

### •Árbol filogenético (Fig. 3a y b)

El estadístico de alelos compartidos ha sido utilizado para examinar el potencial de localización racial de los animales individuales. Se han seleccionado 40 animales de cada raza al azar y se ha incluido una muestra de 20 animales de pura raza.

A grandes rasgos, se agrupan por un lado las dos razas cárnica (Euskal Herriko Mendiko Zaldia y Burguete) y por otro las dos razas de pony (Pottoka y Jaca Navarra).

Aunque las razas equinas aquí estudiadas han sido reconocidas oficialmente desde hace tiempo, los libros genealógicos han sido recientemente establecidos o están a punto de establecerse, lo que implica en algunos casos la inexistencia de poblaciones discretas. La existencia de flujo genético entre algunas de estas poblaciones, o bien la inclusión en el estudio de animales que pueden haber tenido antecesores de otra raza diferente pueden ser la causa de la dispersión de animales de una raza determinada en varios grupos.

### •Test de asignación racial (Tabla 4)

Una vez aplicado el test de asignación racial, la mayoría de los individuos pudieron ser asignados a su población de origen. El éxito de la asignación fue diferente según la raza: el 80 % de los animales de raza Burguete pudieron ser asignados a su población de origen, mientras que en Jaca Navarra la proporción fue del 63 %.

Hay dos factores a tener en cuenta a la vista de los resultados de este test. Por un lado, como ya ha sido descrito por otros autores, el número de loci analizados puede influir en el éxito de la asignación racial. Es probable que el número de animales asignados correctamente se incremente si se aumenta el número de microsatélites. Por otro, el probable intercambio genético entre razas, anterior al establecimiento de los Programas de Conservación y Mejora.

Una combinación de las dos aproximaciones, árbol filogenético individual y test de asignación racial puede contribuir a dilucidar el origen poblacional de los individuos de diferentes razas.

	JN	EHMZ	POTOKA	BURGUETE	JACA NAVARRA	PURA RAZA	%
EHMZ	149	89	7	29	12	2	65
POTOKA	191	16	61	14	10	1	76
BURGUETE	63	9	28	7	7	2	82
JACA NAVARRA	85	10	5	8	61	1	63
PURA RAZA	20				20	20	100

## 4. CONCLUSIONES

\* El panel de 12 microsatélites utilizado resulta muy adecuado para el control de paternidades en las 4 razas equinas analizadas.

\* El panel utilizado no es tan efectivo en cuanto al potencial de asignación racial en las razas analizadas, por lo que haría falta analizar un número mayor de loci en aras de incrementar dicho potencial.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bowling A.T. y col. (1997) *Animal Genetics* 28, 247-252.
- Bjornstad G. & Reed K.H. (2001) *Animal Genetics* 32, 59-65.
- Caron J. y col. (2000) *Animal Genetics* 31, 39-48.
- Marklund S. y col. (1998) *Animal Genetics* 25,19-23.