



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



## **FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SISTEMAS DE  
PRODUCCIÓN ANIMAL**

### **ASIGNACIÓN DE PATERNIDAD EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BOVINOS DE CARNE MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES**

#### **Tesis**

Que como requisito parcial para obtener el grado de

#### **Maestro en Ciencias**

Presenta:

**WILLIAMS ARELLANO VERA**

ASESORES

Dr. Rogelio Garcidueñas Piña  
Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte  
Dra. Ana María Sifuentes Rincón

FMVZ-UMSNH  
CBG-IPN  
CBG-IPN

Morelia, Michoacán. Febrero de 2008

## *Agradecimientos*

*A mis padres José Alfredo e Isabel por brindarme de nueva cuenta la oportunidad de superarme profesionalmente y como persona, a pesar de haber tenido tantos tropiezos ellos nunca dejaron de confiar en mí, aún sin escatimar los esfuerzos que tuvieron que pasar. A mis hermanos Yunuen y José Alfredo, compañeros de toda mi vida, por todos los apoyos que me brindaron durante mi formación profesional y fuera de ella, que por su apoyo y aliento nunca dude en seguir adelante.*

*A Susana del Rosario Alvarado Quiroga, por brindarme su apoyo incondicional durante esta etapa tan importante en mi vida.*

*A mis asesores el más sincero agradecimiento, Dr. Rogelio Garcidueñas Piña, Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte, Dra. Ana María Sifuentes Rincón, por su atención y dedicación para la elaboración de esta tesis.*

*Un agradecimiento especial al Dr. José Herrera Camacho, parte fundamental en la realización de este proyecto, ya que, sin su ayuda, el presente no habría sido posible. Así como al Dr. Aureliano Juárez Caratachea, por su valioso apoyo e innumerables consejos. Al Dr. Hugo Álvarez, un sincero agradecimiento por su apoyo en esta parte profesional de mi vida.*

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice de cuadros</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Revisión de literatura</b> .....	<b>5</b>
1.1 Importancia de la genealogía en el mejoramiento genético del ganado de carne.....	<b>5</b>
1.2 Organización del genoma en los mamíferos.....	<b>8</b>
1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	<b>10</b>
1.4 Marcadores moleculares para la determinación de la variabilidad genética.....	<b>12</b>
1.4.1 Marcadores basados en <i>loci</i> hipervariables de minisatélites (VNTRs).....	<b>13</b>
1.4.2 Marcadores basados en la amplificación de microsatélites o (Sequence Tandem Repeat "STR").....	<b>14</b>
1.4.3 Importancia del uso de los marcadores microsatélites en la ganadería de pie de cría.....	<b>17</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivo general.....	<b>20</b>
3.2 Objetivos específicos.....	<b>20</b>
<b>3. Material y Métodos</b> .....	<b>21</b>
4.1 Aislamiento de ADN.....	<b>21</b>
4.2 Cuantificación del ADN.....	<b>23</b>
4.3 Selección de los <i>loci</i> microsatélites utilizados.....	<b>23</b>
4.4 Análisis de productos de PCR.....	<b>25</b>
4.5 Análisis de la diversidad genética.....	<b>26</b>
4.6 Asignación y simulación de Paternidad/Maternidad.....	<b>28</b>
4.7 Análisis del efecto de la asignación de paternidad sobre los parámetros y valores genéticos.....	<b>28</b>
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	<b>31</b>
5.1 Análisis de la diversidad genética.....	<b>31</b>
5.2 Verificación de Maternidad.....	<b>35</b>
5.3 Asignación de Paternidad.....	<b>36</b>
5.4 Estimación de las diferencias esperadas de la progenie (DEPs).....	<b>38</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>42</b>
<b>6. Literatura citada</b> .....	<b>43</b>

## Índice de cuadros

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Secuencias de primers para amplificar los 19 <i>loci</i> microsatélites a probar en la raza Braford.....	<b>25</b>
<b>Cuadro 2.</b> Mezclas para la amplificación de cada marcador microsatélite seleccionado.....	<b>26</b>
<b>Cuadro 3.</b> Programas de amplificación por PCR incluidos en el programa Touchdown del termociclador Perkin Elmer (PT 9700).....	<b>25</b>
<b>Cuadro 4.</b> Nivel informativo de los marcadores microsatélites utilizados en la asignación de paternidad.....	<b>31</b>
<b>Cuadro 5.</b> Probabilidad de exclusión combinada del panel de <i>locus</i> utilizado para la asignación de paternidad.....	<b>35</b>
<b>Cuadro 6.</b> Asignación de paternidad a las crías del grupo 1 y 2.....	<b>37</b>
<b>Cuadro 7.</b> Estructuración de las familias completas dentro del hato de raza Braford bajo estudio.....	<b>38</b>
<b>Cuadro 8.</b> Diferencias en la predicción de los valores genéticos (DEPs) y su exactitud dada la paternidad simulada (PS) y real (PR) para peso al nacimiento.....	<b>40</b>

## RESUMEN

La industria del ganado bovino de registro se basa en la comercialización de pie de cría con registro genealógico (pedigrí), lo que indica de cierta manera, su valor genético, requisito indispensable para la estimación de parámetros y valores genéticos que permitan el diseño de estrategias objetivas de mejoramiento genético. Un programa exitoso de mejoramiento genético, depende de la correcta identificación de los individuos que conforman la población a ser evaluada, así como del conocimiento preciso de las relaciones de parentesco entre ellos. Los marcadores moleculares, entre ellos los llamados microsatélites, son una herramienta precisa para determinar el parentesco entre individuos. Cada marcador microsatélite posee una probabilidad de exclusión cuando son empleados en pruebas de asignación o verificación de paternidad que se incrementa en relación al número y nivel de información de los *loci* microsatélites utilizados, pudiendo llegar a valores de hasta 99.99% de confianza en el análisis. Con base a ello, el objetivo general del presente trabajo de investigación, fue estructurar la genealogía de una población de ganado Braford manejada bajo empadre múltiple y evaluar las implicaciones de la correcta o incorrecta estructuración en su mejoramiento genético. De 19 *loci* evaluados se encontró que sólo 9 de ellos eran informativos en la raza bajo estudio. El *locus* BM6444 mostró el menor contenido de información polimórfica "PIC" (0.6109), y por consiguiente la menor probabilidad de exclusión de paternidad por *locus* "PE2" (0.2463). Por el contrario, el *locus* INRA040 mostró mayor PIC, heterocigocidad observada y esperada "Ho, He" con valores de 0.9310, 0.8556 y 0.9401, respectivamente; de los 23 alelos que se encontraron para este *locus*, el alelo 170 fue identificado en 17 individuos con una frecuencia de 0.0992, convirtiéndolo en el *locus* con mayor nivel de PE2 (0.7665). Se calculó la probabilidad combinada de exclusión (PEC2) para los 9 *loci* seleccionados la cual fue de 0.9989, con dicho panel de *loci* se realizó la verificación de maternidad y asignación de paternidad. Para la asignación de paternidad se logró la asignación en el 100% de las crías (n=33), pero sólo el 9.09% de las maternidades estaban asignadas correctamente (3 de 33 madres), lo que permitió la estructuración de tres familias (madre, cría y padre). Se realizó el cálculo de las diferencias esperadas de la progenie (DEPs), simulando la paternidad de las crías, la cual fue comparada posteriormente con la paternidad real de las mismas, evidenciando que en la paternidad simulada se muestran valores de DEPs negativos y positivos para diferentes sementales, las cuales comparadas con las DEPs obtenidas de las paternidades reales sugieren que se estaría sobreestimando el valor genético, trayendo consigo un retroceso en la mejora genética del hato al que se fuese a introducir los sementales evaluados, ya que estarían aportando DEPs negativas.

## **INTRODUCCIÓN**

La ganadería bovina, en específico la destinada a la producción de carne, es la actividad productiva más diseminada en el medio rural en México, se realiza sin excepción en todas las regiones fisiográficas del país y aún en condiciones adversas de clima, que no permiten la práctica de otras actividades productivas (Lastra y Peralta, 2000).

Se estima que la actividad ganadera en México ocupa 110 millones de hectáreas, representando aproximadamente el 60% del territorio nacional y contribuye con el 40% del producto interno bruto (PIB) de la industria pecuaria (Ruíz, 2004). Algunas cifras reportadas en el 2005 por la FAS/USDA, indicaron que en México se produjeron 2.13 millones de toneladas métricas (Tm) de carne de bovino; sin embargo, se consumieron 2.42 millones de Tm, por lo que el déficit condujo a la importación de 320 mil Tm. Mientras que en el 2006 se produjeron 2.175 millones de Tm y se consumieron 2.505 millones de Tm y se importaron 330 mil Tm de carne de bovino (USDA, 2006).

Históricamente la ganadería bovina para carne, es concebida como un negocio familiar, administrado por decisiones transmitidas en el legado de generaciones, donde en la mayoría de los casos no son las adecuadas para el mejoramiento de la misma. Esta industria básicamente se rige por procedimientos que ofrecen a sus manipuladores los "mejores" resultados empíricos, más que por métodos adecuados de manejo y selección, aptos para el entorno genético y ambiental de sus explotaciones (Parra, 2006).

Tosh y Wilton (1994), han destacado la importancia que tiene la estructura de los datos en las evaluaciones genéticas cuando existe una cantidad importante de paternidades inciertas, lo que es muy común cuando se realizan "empadres múltiples", ya que se disminuye la cantidad de conexiones directas entre individuos y se incrementa la varianza de predicción del error, reduciendo por lo tanto, la precisión de los valores genéticos (Tosh y Wilton, 1994).

Se sabe que la paternidad incierta y la incorrecta asignación de paternidad, son un problema que está presente aún en países con sistemas de identificación más completos y complejos que los que se han venido desarrollando en México, debido a que sus sistemas productivos de carne están basados principalmente en la cría extensiva de ganado bovino (Cunningham y Meghen, 2001; Sifuentes *et al.*, 2006).

Este problema se ve además influenciado por prácticas reproductivas comunes en los sistemas extensivos de producción de ganado bovino, como el "empadre múltiple" (Holroyd *et al.*, 2002; Laeflet *et al.*, 2003), ya que los animales generados con este sistema de apareamiento, para ser incluidos dentro de las evaluaciones genéticas, deben someterse a pruebas de identificación para obtener mejores predicciones sobre su valor genético y su efecto sobre el mejoramiento genético del hato (Cunningham y Meghen, 2001; Holroyd *et al.*, 2002; Laeflet *et al.*, 2003). Una de las desventajas que enfrenta el uso de "empadre múltiple" es que aunque el productor seleccione aquellos sementales que considera como los de mayor valor genético, existe la posibilidad de que sólo alguno de ellos sea el que verdaderamente represente la calidad genética que se desea, aunque no tenga el mayor éxito reproductivo en el hato durante el empadre (Sifuentes *et al.*, 2006).

Las pruebas de paternidad son necesarias en los programas de mejoramiento genético; particularmente, para la verificación de la información proporcionada por el productor de pie de cría y sementales, así como para identificar la paternidad de los animales producto de empadre múltiple (Vankan y Fadd, 1999; Cunningham y Meghen, 2001; Visscher *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2004).

Para poder estimar parámetros genéticos y diseñar un esquema de selección, es fundamental contar con suficiente información productiva-reproductiva de los animales evaluados, así como de las relaciones de parentesco entre ellos; esta información debe ser lo más exacta posible ya que de lo contrario se puede caer en la ineficiencia del programa de selección.

La medición objetiva de la producción de los animales es también necesaria para hacer evaluaciones de los mismos con la finalidad de realizar una selección precisa, evaluar las razas y los sistemas de cruzamientos, estimar los parámetros genéticos requeridos para los programas de mejora genética, medir aspectos económicos y optimizar el proceso de cría del animal. El registro genealógico de los animales es una condición indispensable para llevar a cabo estos programas de mejora. Puesto que, por un lado, se caería en un error de estar seleccionando animales que no son hijos de los sementales identificados como presuntos padres, y por otro, se estarían estimando parámetros genéticos sobre una base incierta (Montaldo y Barria, 1998).

Con lo anterior se concluye, que el conocimiento de la genealogía es fundamental para la evaluación genética de los reproductores bovinos seleccionados y debería considerarse como un requisito para su registro en los libros genealógicos. Si la paternidad de los animales no es confiable o verificada dentro de estos sistemas

de evaluación, los errores tanto de datos de producción como de pedigrí pueden afectar negativamente las tasas de avance genético.

En el caso de ganado bovino y a nivel mundial, se considera que la identificación biológica basada en el uso de marcadores moleculares del tipo de los microsatélites, es una técnica precisa para la identificación y establecimiento de las relaciones genealógicas entre individuos, por lo tanto su implementación como prueba de rutina es fundamental para iniciar un programa de mejoramiento genético (Weber y May, 1989; Cheng y Crittenden, 1994; Velmala *et al.*, 1999; Georges *et al.*, 1995; Aranguren *et al.*, 2005).

## **1. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1.1 Importancia de la Genealogía en el Mejoramiento Genético del Ganado de Carne.**

La variabilidad fisiográfica del territorio mexicano no permite que la ganadería sea homogénea; así mismo, la tecnología aplicada es variable, existiendo desde las explotaciones tradicionales hasta las que utilizan tecnologías de punta. En términos generales, las condiciones bajo las que se desarrolla la ganadería son extensivas, aunque existe la finalización en corral de engorda, ésta se realiza de manera limitada por los altos costos de alimentación, y se estima que aproximadamente el 35% de la producción nacional de carne de bovino, procede de corrales de engorda (Lastra y Peralta, 2000; Ruíz, 2004). El 65% del ganado producido en México se finaliza en pastoreo (USDA, 2003; Ruíz, 2004).

Las explotaciones de ganado vacuno de carne en sistemas extensivos enfrentan dificultades básicas, provenientes de su precariedad técnica, reflejada al momento de implementar cualquier tipo de manejo dentro del hato; por ejemplo, el escaso uso de la inseminación artificial (IA) contrastando con la práctica común de la monta natural mediante empadre múltiple (Díaz *et al.*, 1995; Ramírez y Rios, 1997).

En los últimos años, la presión que ha ejercido la constante y creciente competencia internacional sobre el mercado nacional, ha empezado a despertar la inquietud de los ganaderos para fomentar su productividad a través del mejoramiento genético (Parra, 2006).

El mejoramiento animal comprende el uso de principios biológicos, económicos y matemáticos para encontrar estrategias de aprovechamiento de la varianza genética en alguna especie en particular. Básicamente, un programa de mejoramiento genético debe considerar aspectos como el objetivo del sistema de producción, procesos de evaluación genética, criterios de selección, y difusión del material genético seleccionado (Montaldo y Barria, 1998).

Los caracteres productivos están determinados por un gran número de genes y el mejoramiento genético sería consecuencia de la suma de los efectos totales de dichos genes, que se manifiestan como efectos de dominancia, epistáticos o de aditividad, estos últimos son verdaderamente importantes cuando confieren al individuo características productivas deseables, que lo sitúan como grupo privilegiado de la población, susceptible de ser seleccionado para transmitir esas características a la siguiente generación, sustentando así los principios del avance genético (Carmona *et al.*, 2000).

Un progenitor no puede contribuir con los efectos de dominancia sobre su proge, tales efectos dependen de pares particulares de genes en un *locus*, y un progenitor sólo aporta un gen del par particular. Por otro lado, los efectos epistáticos dependen de combinaciones de genes en diferentes *loci*, los cuales por lo común no permanecen de una generación a otra como resultado de la segregación independiente (Carmona *et al.*, 2000).

En general, puede considerarse que el establecimiento de un programa de mejoramiento genético es un proceso compuesto por varias etapas que abarcan la definición de los objetivos del programa, el establecimiento de un control de rendimientos, el control de la genealogía, la evaluación genética para la obtención

de criterios de selección y la difusión del material genético seleccionado (Díaz y Quintanilla, 2002).

Para la predicción de los valores genéticos, se requiere necesariamente de la estimación de componentes de varianza y de parámetros genéticos que indiquen la contribución de la variación genética y ambiental en la expresión de los caracteres de la población, que sirvan para definir los reproductores potenciales a utilizar como progenitores de la siguiente generación (Cadena-Maneses y Morales–Castillo, 2002).

En este sentido, la industria de ganado bovino de registro se basa fundamentalmente en la comercialización de sementales y pie de cría con registro genealógico (pedigrí). Pero para garantizar su valor genético, es necesaria la correcta identificación de los individuos que conforman cada población (Dentine, 1999; Ron *et al.*, 1996; Caballero y Toro, 2000; Cardoso y Tempelman, 2004) e incluso, la aplicación de pruebas de paternidad.

En países de alto desarrollo ganadero, la identificación genética y el obligado establecimiento de pruebas de paternidad, queda lejos de cualquier duda como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos en las distintas razas. El control de parentesco se ha realizado de forma rutinaria mediante la identificación de marcadores inmunológicos como son los grupos sanguíneos y algunos polimorfismos bioquímicos (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

La magnitud del efecto del error de registro de pedigrí sobre el progreso genético, se ha reportado ampliamente (Kingham *et al.*, 1993). Por ejemplo, en un estudio de simulación en ganado lechero, se estimó que con un error del 10% de los registros genealógicos se produce una reducción de 4.3% en la ganancia genética

sobre características de producción lechera; además de que los valores genéticos son estimados con sesgos (Israel y Weller, 2002.

Geldermann *et al.* (1986), sugirieron que con una frecuencia de identificación errónea del 15% se presenta una disminución anual de entre 8.7% y 16.9% en el cambio genético del ganado, evidenciando la importancia del registro adecuado de la progenie de cada individuo dentro del hato.

En general, puede afirmarse que en los sistemas de producción pecuaria, en especial los dedicados a la crianza de ganado de registro, la paternidad incierta y la incorrecta asignación de paternidad, son un problema que limita la realización de una evaluación genética y la aplicación de programas de mejoramiento genético precisos.

## **1.2 Organización del Genoma en los Mamíferos.**

Las características físicas (morfológicas, anatómicas) y bioquímicas (fisiológicas y metabólicas), así como el comportamiento productivo y reproductivo de los animales se deben a un efecto combinado, con diverso grado de contribución, entre su composición genética y el medio ambiente en el cual se desarrollan.

Desde el punto de vista molecular, un gen es una secuencia lineal de nucleótidos en la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica. Por ejemplo: proteínas, ácido ribonucleico mensajero ARNm, ARNr ribosómico (ARNr), ARNt de transferencia (ARNt), ARNi de interferencia (ARNi). Esta función está vinculada al desarrollo o funcionamiento de una actividad fisiológica normal. Los genes se disponen a lo largo de cada uno de los cromosomas donde cada gen

ocupa una posición determinada llamada *locus*, siendo un alelo una de las formas variantes de un gen en un organismo diploide (Nicholas, 1996; Snustad y Simmons, 2006).

El genoma es, por tanto, todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular. Por lo general, al hablar de genoma en los seres eucarióticos se hace referencia sólo al ADN contenido en el núcleo, organizado en cromosomas (Snustad y Simmons, 2006).

La descripción de la organización del genoma en una especie se determina mediante la construcción de los llamados mapas genómicos. El primer mapa del bovino fue el cariotipo (Basrur y Moon, 1967; Casas, 2006), en el que se estableció que el genoma bovino está organizado en 29 cromosomas autosómicos más un par de cromosomas sexuales ( $2n = 60$ ).

A pesar de la evidente importancia de los genes, no todo el genoma de los individuos está formado de ellos. Dentro de las células de los mamíferos el ADN está organizado en diferentes tipos de secuencias y sólo una pequeña parte (del 1% al 10%), son genes (Nicholas, 1996).

El tipo más común de secuencias de ADN es el formado por secuencias de copia única, que supone aproximadamente el 57% del ADN total en el ganado vacuno. Estas secuencias de copia única están dispersas por todo el genoma, encontrándose en forma de secuencias de tamaño variable. Una pequeña proporción de este ADN de copia única contiene la mayoría de los genes (Nicholas, 1996).

El ADN repetitivo-disperso consta de un pequeño número de secuencias de un tamaño medio de alrededor de 300 pb, cada una de las cuales se encuentra repetida hasta  $10^4$  ó  $10^5$  veces en el genoma. Las secuencias que se repiten se denominan unidades de repetición (repeat units), estas unidades de repetición se encuentran dispersas por todo el genoma. El ADN repetitivo-disperso supone aproximadamente el 20% del ADN bovino (Nicholas, 1996).

Las secuencias restantes de ADN (23%) se denominan ADN satélite, debido a que su densidad es lo suficientemente diferente de la del resto del ADN como para dar lugar a un pico separado o satélite. El ADN satélite es altamente repetitivo, lo que quiere decir que consta de una o unas cuantas unidades de repetición cortas, cada una de las cuales está repetida muchas veces ( $10^6$  o más). A diferencia del ADN repetitivo-disperso, el ADN satélite está repetido en tándem, esto es, en un lugar dado se encuentran muchas copias de la misma unidad de repetición una al lado de otra (Nicholas, 1996).

El ADN satélite está disperso por todo el genoma y se encuentra en regiones de heterocromatina, que es el nombre que reciben las regiones condensadas que se tiñen intensamente. Estos lugares incluyen regiones inmediatamente adyacentes a casi todos los centrómeros, regiones en los extremos (telómeros) de algunos cromosomas, y algunas otras regiones aisladas (Nicholas, 1996; Laguna y Piña, 2002).

### **1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

A partir de su descripción en 1985 (Mullis *et al.*, 1986), una de las herramientas básicas para el análisis del ADN es la PCR. La PCR es una técnica que permite

replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN (Mullis, 1990; Satz y Kornblihtt, 1993).

Esta técnica permite multiplicar ó amplificar pequeñas cantidades de ADN. El segmento de ADN destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta 100 mil nucleótidos de longitud. Una ventaja de la PCR es que el ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas, ADN nuclear total, ADN mitocondrial, etc. (Satz y Kornblihtt, 1993).

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta (94-95°C), en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas del ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización" (Einstein, 1990; Mullis, 1990; Satz y Kornblihtt, 1993).

En el segundo paso, la temperatura se reduce (45-65°C) para permitir el "apareamiento" de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del segmento de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "primers" o iniciadores, debe ser complementario al segmento de ADN a amplificar (Einstein, 1990; Mullis, 1990; Satz y Kornblihtt, 1993).

En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa "extiende" los primers en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde (paso conocido como extensión). Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidonucleósidos trifosfato ( $dNTP_s$ ) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa (72°C para la Taq polimerasa). Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, alineamiento y extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación exponencial del segmento de ADN delimitado por los primers (Einstein, 1990; Mullis, 1990; Satz y Kornblihtt, 1993).

#### **1.4 Marcadores Moleculares para la Determinación de la Variabilidad Genética**

Las técnicas de análisis molecular que permiten la detección de la variabilidad genética directamente a nivel de la molécula de ADN, se basan en diferentes tipos de marcadores moleculares. Entre sus principales aplicaciones en ganadería se encuentran la identificación y verificación del parentesco. Los marcadores moleculares constituyen una herramienta para la selección (Cornide y Coto, 2002). Entre sus aplicaciones más inmediatas se encuentran la identificación de parentesco o de identidad y la caracterización de la diversidad genética (Kappes *et al.*, 1997; Peelman *et al.*, 1998; Vankan y Faddy, 1999; Blancou 2001; Cunningham y Meghen, 2001; Kovak, 2001; Salazar *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares se definen como todo fenotipo proveniente de un gen expresado, como en el caso de las isoenzimas o las proteínas (marcadores

bioquímicos), o de un segmento específico de ADN correspondiente a regiones de expresión o no del genoma. El desarrollo de los marcadores moleculares ocurrido en los últimos años ha motivado el interés en utilizarlos para determinar el parentesco entre animales (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70's se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en gel de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tiene una limitación importante: no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros (Díaz, 2006).

En los estudios de genética poblacional, los marcadores moleculares permiten la identificación de cada alelo por *locus*, obtener datos poblacionales, calcular las frecuencias alélicas, y a partir de estas estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999).

En la determinación de la variabilidad genética, los marcadores "ideales" cumplen una serie de características, entre las que se encuentran: elevada capacidad para detectar altos niveles de polimorfismo, herencia mendeliana, amplia dispersión en el genoma, independencia del estado físico y de desarrollo del individuo, facilidad de obtención, independencia de las condiciones ambientales y la posibilidad de determinación en cualquier tipo de células que contengan núcleo (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

### **1.4.1 Marcadores basados en *loci* hipervariables de minisatélites (VNTR)**

Se conoce que una gran proporción variable del genoma eucariota está compuesto por secuencias repetitivas de ADN, las cuales difieren en el número y la composición de nucleótidos. Los primeros marcadores de este tipo en ser utilizados fueron los minisatélites o VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"); (Jeffreys *et al.*, 1987), que están ubicados en regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas, teniendo repetido de 4 a 40 veces el motivo (Moyzis *et al.*, 1988). Están constituidos por un número variable de secuencias idénticas repetidas. Estas poseen de 15 a 100 pb y en cada *locus* hipervariable están repetidas hasta 50 veces (Moyzis *et al.*, 1988).

El nombre de minisatélites se debe al hecho de que las secuencias repetitivas forman un pico satélite diferente al pico principal de ADN genómico después de la separación en gradientes de cloruro de cesio, por contener una proporción de pb G+C diferente a la media del resto del genoma. De esta observación surgió el concepto de huella dactilar genética (genetic fingerprint) y este tipo de marcador constituyó durante un tiempo la base genética de la identificación de individuos (Lewin, 1997).

### **1.4.2 Marcadores basados en la amplificación de microsatélites o "sequence tandem repeat" (STR)**

En el año 1989 se identificaron los microsatélites al descubrirse que existían zonas del ADN no codificante que contenían pares de bases (pb) repetidas de mono, di, tri, tetra, penta y hexanucleótidos en un número variable. Estas regiones repetidas tienen la característica de presentarse en tándem y de forma aleatoria en el

genoma de los seres vivos (Litt y Luty, 1989; Cheng y Crittenden, 1994). Inicialmente, a los microsatélites se les denominó VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) por que la unidad repetida estaba presente un número variable de veces (Goldstein y Schlotterer, 2000).

Existen varias familias de microsatélites, entre ellas: (A/T)<sub>n</sub>, (CA/TG)<sub>n</sub>, (TC/AG)<sub>n</sub>, (AT/CC)<sub>n</sub>, (CAC/GTG)<sub>n</sub>, cuyo número de repeticiones (n), está entre 10 y 50 veces, pero como promedio se tiene una n= 25 (Weber y May, 1989). Estos segmentos tienden a estar distribuidos aleatoriamente a lo largo del genoma. Es necesario aclarar que no son sinónimo de minisatélites ya que éstos poseen hasta 20 pb (Morera *et al.*, 1999).

Una de las ventajas de los microsatélites versus otros marcadores como minisatélites, RFLP, RAPD, etc., radica en que constituyen una herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994) ya que son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son cien por ciento confiables, repetitivos y automatizables (Peelman *et al.*, 1998).

Una de las principales aplicaciones de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio, es de utilidad para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones animales (Weber y May, 1989; Aranguren *et al.*, 2005).

Los microsatélites han demostrado ser los marcadores más informativos para estudios poblacionales a nivel de subespecie. La mayoría de los estudios realizados

hasta el momento con este tipo de marcadores se basa en el análisis de frecuencias alélicas, con la finalidad en un principio de la creación de mapas genéticos y posteriormente para la determinación de *Locus* de Características Cuantitativas (QTL) (Georges *et al.*, 1995; Velmala *et al.*, 1999).

Los microsatélites poseen atributos que incluyen (Weber y May, 1989; Bello, 2001; Yañez, 2002):

- Ser altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- Son técnicamente fáciles de reproducir: la tecnología del PCR puede fácil y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores, así como el uso de equipo semiautomático para la lectura de los geles.
- Es una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de ADN son requeridas.
- Son analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
- Son abundantes: los microsatélites están dispersos a través del genoma de los individuos.
- Son ampliamente aplicables: los *loci* son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y
- Son de fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los primers, sin la necesidad de la transferencia física de los mismos.

Aun cuando poseen muchas ventajas, los microsatélites también tienen limitaciones con menos frecuencia o modificaciones, estas se darían en el caso que errores, ocurridos en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tendrían como

resultado alelos nulos. Otra limitante es la presencia de bandas "fantasmas", las cuales son productos de la amplificación por PCR que difieren de una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original y se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso de los microsatélites. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura del gel, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico (Chambers y MacAvoy, 2000).

Los microsatélites requieren de tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada primer; sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos primers en más de una especie. Esto es debido a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies de mamíferos (Becerra y Paredes, 2000).

### **1.4.3. Importancia del uso de los marcadores microsatélites en la ganadería de pie de cría**

A partir de los marcadores genéticos microsatélites únicos se puede obtener un registro similar a huellas digitales (llamado huella genética) para utilizarse en las asociaciones de criadores de raza pura y para garantizar la identificación en general y autenticar la progenie (Cavalli, 1998).

En gran parte del país las explotaciones de bovinos se realizan de manera extensiva, con empadre múltiple, en la mayoría de los casos; con estos marcadores genéticos se puede identificar invariablemente la paternidad/maternidad de los individuos (Weller *et al.*, 2004, Sifuentes *et al.*, 2006).

Cabe resaltar, que el análisis con un panel de microsatélites altamente polimórficos proporciona los siguientes valores:

Identificación: La probabilidad de hallar dos genotipos iguales entre animales no emparentados es de 1 en 4,000 millones. Esta probabilidad entre animales estrechamente emparentados (hermanos) es de 1 en 6,250 (Datagene, 2002).

La elección de 11 *loci* microsatélites, con un levado grado de polimorfismo ha demostrado una capacidad de exclusión de paternidad "a priori" al 99.9% (Osta, 1993). En el caso de que el presunto padre y el padre real fueran hermanos, la probabilidad media de exclusión es del 93.8% (Datagene, 2002).

Durante los últimos años se han realizado estudios en los cuales se utilizan los *loci* microsatélites para la asignación de paternidad en ganado Bovino (Buchanan *et al.*, 1994; Marklund *et al.*, 1994; Ron *et al.*, 1996; Moazami-Gourdarzi *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997; Vankan y Faddy, 1999; Curi y Lopes, 2002; Salazar *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2004; Riojas *et al.*, 2006; Sifuentes *et al.*, 2006). En México, aún no son comunes dichos estudios, pudiendo mencionar la realización de únicamente solo tres trabajos publicados en revistas indexadas, uno de ellos realizado en el noreste de México para las razas Beefmaster y Charolais, utilizando los siguientes *loci* microsatélites: SPS115, BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, TGLA53, TGLA126, INRA037 e INRA023 (Salazar *et al.*, 2004).

Un segundo trabajo realizado por Riojas *et al.*, (2006) en ganado Brhman y Brangus en México, en el que se utilizo un panel de 9 *loci* microsatélites (BM1824, BM2113, SPS113, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA227), y el tercero de Sifuentes *et al.*, (2006) con ganado Charolais, utilizando 9 *loci* microsatélites (INRA37, INRA23, TGLA126, TGLA53, TGLA44, TGLA431, ETH10, D1S34 y D2S26).

Los marcadores moleculares del tipo de los microsatélites han sido probados en diferentes razas de bovinos en el mundo, teniendo como objetivo la identificación de relaciones de parentesco, así como la genotipificación en animales de alto valor genético. El presente trabajo se realizó tomando en cuenta la disponibilidad de un hato de raza Braford bajo empadre múltiple y por el hecho de que en esta raza no se ha realizado ningún tipo de investigación con los marcadores moleculares mencionados.

Cabe hacer mención que el ganado Braford se originó en los Estados Unidos de América a partir de cruzamientos entre ganado Brahman y Hereford, estableciéndose la raza con diferentes proporciones de cada raza, aunque lo más común es 5/16 Brahman 11/16 Hereford. Este ganado se ha distinguido por tener una habilidad materna superior a las demás razas, así como por su mayor fertilidad, ausencia de problemas de parto y una productividad longeva (Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Braford, A.C., 1997.)

El panel de *loci* microsatélites que se probó en el presente estudio (cuadro 1) ha sido evaluado en diferentes razas de bovinos con resultados diversos (Heyen *et al.*, 1997; Curi y Lopes, 2002; Salazar, 2002; De la Rosa, 2003; Sherman *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005 y Riojas *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

- Estructurar la genealogía de una población de ganado Braford manejada bajo empadre múltiple y evaluar las implicaciones de la correcta o incorrecta estructuración en su mejoramiento genético.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar un panel de marcadores microsatélites altamente informativo, estimando parámetros genéticos poblacionales (frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada y observada así como el contenido de información polimórfica) y sus probabilidades de exclusión.
- Genotipificar la población para establecer la estructura familiar del hato.
- Evaluar el efecto de la estructura familiar establecida sobre los parámetros y valores genéticos del hato.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo se desarrolló durante los meses de Noviembre de 2006 a Junio de 2007, y se dividió en dos fases, una de campo y otra de laboratorio.

En la fase de campo, se tomaron muestras de sangre a un hato disponible de bovinos de raza Braford (22 posibles padres, 33 crías "hembras, machos" y 33 madres), pertenecientes a un rancho productor de pie de cría ubicado en el Municipio de San Juan de Sabinas Coahuila, a 28° 08' 41" Latitud Norte, 101° 31' 28" Longitud Oeste, y a una altitud de 472.44 msnm.

Se recolectaron 3 ml de sangre de la vena ó arteria coccígea de cada animal con la ayuda de un adaptador y aguja Vacutainer™ (0.8x38mm) y tubos MONOJECT con EDTA K<sub>3</sub> (al 15%) como agente anticoagulante, al terminar la toma de muestras se almacenaron en frío para su traslado al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN), para el procesamiento de cada muestra y obtención del ADN.

La segunda fase, de laboratorio, se llevó a cabo en el CBG-IPN, ubicado en Cd. Reynosa, Tamaulipas, y consistió en el aislamiento y análisis de ADN de las muestras de campo.

#### **3.1 Aislamiento de ADN**

El aislamiento de ADN se realizó utilizando el kit comercial de la compañía Promega Wizard<sup>(R)</sup> (DNA Purification System) y la metodología descrita en él, la cual consta de los siguientes pasos:

- 1.- Se colocaron 500µl de sangre completa en un microtubo de 1.5 ml y se agregaron 9 ml de solución de lisis I (solución preparada con: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, pH 7.4).
- 2.- Se incubaron las muestras en hielo (Sangre+Solución Lisis I) durante 10 min, mezclando bien por inversión de manera suave.
- 3.- Se centrifugó durante 5 min a 5000 revoluciones por minuto (rpm) (microcentrífuga HERMLE<sub>Z160M</sub>).
- 4.- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células obtenida en 1ml de solución Lisis I, se incubó durante 5 min en hielo y se centrifugó como en el paso anterior. Se repitió la operación hasta obtener una pastilla limpia (blanca). El último lavado se realizó con la solución de lisis.
- 5.- Lisis de núcleo. Se agregaron 500µl de solución de lisis de núcleo, se mezcló por inversión o hasta disolver la pastilla y se prosiguió con un vórtex por 20 s (Mini Vortex <sub>VWR3434</sub>).
- 6.- Precipitación de proteínas. Se añadió 165µl de solución de precipitación de proteínas, y se procedió con un vórtex por 20 s. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30s. (Paso 4 y 5 se realizan en el mismo tubo).
- 7.- Precipitación de ADN. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo conteniendo 500µl de isopropanol, se mezcló y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min.

8.- Se descartó el sobrenadante y se adicionó 500µl de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó a 13,000 rpm por 20s. Se aspiró el etanol y se secó la pastilla por aire seco (de 10 a 15 min). Se disolvió la pastilla de ADN con el volumen apropiado de la solución de resuspensión de ADN (10Mm Tris, 1mM EDTA).

### **3.2 Cuantificación del ADN**

La revisión de integridad y cuantificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el programa computacional Gel-Imagen de Kodak 1 Digital Science (Kodak Company, 1995-1999), que consistió en lo siguiente: se realizó electroforesis en un gel de agarosa (al 1.5%), utilizando como buffer de corrida TBE 1X [TBE 1X (90 mM Tris base, 88 mM de ácido bórico y 2.0 mM EDTA pH 8.0)], en una cámara de electroforesis horizontal, a 70 volts por 2 hrs, se depositó una mezcla de 1 µl de ADN de la muestra a cuantificar + 1 µl de buffer de carga (que contiene Sybergold 1), en el primer y último carril del gel se depositó 1 µl de marcador de tamaño molecular (550 ng/µl Lambda ADN, GIBCO BRL®). Una vez obtenidos los patrones electroforéticos se calculó la concentración de ADN de cada una de las muestras mediante el programa y se formaron alícuotas de trabajo a una concentración de 50 ng/µl en un volumen final de 50 µl.

### **3.3 Selección de los *loci* Microsatélites Utilizados**

Para el análisis genético de todas las muestras (22 posibles padres, 33 crías "hembras, machos" y 33 madres), se probó un panel de 19 *loci* microsatélites disponibles en el laboratorio del CBG-IPN y recomendados por la FAO/ISAG para llevar a cabo pruebas de paternidad en bovinos (FAO, 1998) (Cuadro 1). De ellos solamente se seleccionaron aquellos que fueron más informativos, tomando como criterio los rangos alélicos, el contenido de información polimórfica (PIC), así como

el grado de dificultad técnica que presentaron para su amplificación en las muestras utilizadas en este estudio. En cada par de iniciadores seleccionados el correspondiente al 5', se marcó con fluorescencia (IRD800) lo que permitió su posterior análisis en el equipo semiautomático marca LI-COR (Modelo 42001G) (Kappes, 1997; Genetic Analysis Manual, 1999; Kovak, 2001).

Cuadro 1. Secuencia de primers para amplificar los 19 *loci* microsatélites a ser probados en la raza Braford.

<i>Locus</i> Microsatélite	Cromosoma	Secuencia (5'-3')	Referencia
BMS1987	2	TGATGCAGAGAACGTTTTAATTT CTTGGGGTAGGCAGAGATTT	Stone <i>et al.</i> , 1995; Ihara <i>et al.</i> , 2004
D1S24	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	Bishop <i>et al.</i> , 1994; Ihara <i>et al.</i> , 2004
D2S26	2	GCTGCCTTCTACCAATACCC CTTCTGAGAGAAGCAACACC	Sunden <i>et al.</i> , 1993; Ihara <i>et al.</i> , 2004
HEL5	21	GCAGGATCACTTGTAGGGA AGACGTTAGTGACATTAAC	Kaukinen <i>et al.</i> , 1993; Ihara <i>et al.</i> , 2004
ILSTS005	10	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGAAGC	Brezinsky <i>et al.</i> , 1993; Ihara <i>et al.</i> , 2004
INRA23	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	Vaiman <i>et al.</i> , 1994
INRA037	10	GATCCTGCTTATATTTAACCAC AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	Vaiman <i>et al.</i> , 1994; Ihara <i>et al.</i> , 2004
TGLA44	2	AACTGTATATTGAGAGCTACCATG CACAACCTAGCGACTAAACCACCA	Georges and Massey, 1992; Sonstegard <i>et al.</i> , 1997
OarfCB11	2	GCAAGCAGGTTCTTACCCTAGCACC GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC	Buchanan and Crawford, 1993
TGLA53	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	Georges and Massey, 1992; Ihara <i>et al.</i> , 2004
D15	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGCCTAGTTGGCTGTG	Moore and Byrne, 1993
BMS1866	2	CAGGGACTGAAAAATAATGCC TTCCATGTTGATTGTTTCTTCC	Stone <i>et al.</i> , 1995; Ihara <i>et al.</i> , 2004
ETH225	9	GATCACCTTGCCACTATTTCTC ACATGACAGCCAGCTGCTACT	Steffen <i>et al.</i> , 1993; Ihara <i>et al.</i> , 2004
TGLA126	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	Georges and Massey 1992; Ihara <i>et al.</i> , 2004
INRA040	2	TGAAAGGGGGTGTGTGGG CTGCCCTGGGGATGATT	Vaiman <i>et al.</i> , 1994; Ihara <i>et al.</i> , 2004
TGLA431	2	GGTCATATCCTTCAAATTTACTTA CCCATTATTCTTAATTTCAACTTC	Georges and Massey 1992; Ihara <i>et al.</i> , 1004
BM6444	2	CTCTGGGTACAACACTGAGTCC TAGAGAGTTTCCCTGTCCATCC	Bishop <i>et al.</i> , 1994; Ihara <i>et al.</i> , 2004
MAF36	26	CATATACCTGGGAGGAATGCATTACG TTGCAAAGTTGGACACAATTGAGC	Swarbrick <i>et al.</i> , 1991; Ihara <i>et al.</i> , 2004
MAF70	4	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGCGCTTTGC	Buchanan and Crawford, 1992; Ihara <i>et al.</i> , 2004

Los microsatélites se amplificaron mediante PCR en un termociclador (Perkin Elmer modelo PT 9700). Las reacciones se llevaron a cabo evaluando un *locus* por reacción bajo las condiciones descritas en el cuadro 2. Todas las reacciones se hicieron en un volumen final de 10  $\mu$ l.

Cuadro 2. Mezclas para la amplificación de cada *locus* microsatélite seleccionado.

	BM6444	INRA040	INRA23	INRA37	D15	D2S26	TGLA126	TGLA53	HEL5
ADN	50ng/ $\mu$ l								
Buffer	1X								
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2mM	2.5mM	3mM	3mM	2.5mM	3mM	2mM	2mM	1mM
dNTPs10mM	0.4mM								
Iniciador 5'	0.02 $\mu$ M	0.02 $\mu$ M	0.02 $\mu$ M	0.015 $\mu$ M	0.015 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.072 $\mu$ M	0.025 $\mu$ M	0.015 $\mu$ M
Iniciador 3'	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.075 $\mu$ M	0.075 $\mu$ M	0.05 $\mu$ M	0.36 $\mu$ M	0.125 $\mu$ M	0.075 $\mu$ M
Go Taq	0.125 U	0.125 U	0.125U	0.125U	0.125 U	0.125U	0.125 U	0.125U	0.125U
Programa*	TD60	TD60	TDTG	TDTG	D55	D55	TDTG	TDTG	TDTG

ng/ $\mu$ l: nanogramos por microlitro, mM: mili molar,  $\mu$ M: micro molar, U: unidades, Programa\*: programa de amplificación dentro del método Touchdown (Ver cuadro 2).

El método Touchdown (Hecker y Roux, 1996; McPherson y Møller, 2000) consiste en ir disminuyendo la temperatura de alineamiento 2°C en cada uno de los primeros cinco ciclos. Para la amplificación de los microsatélites analizados en este trabajo se utilizaron cuatro programas Touchdown que difieren en la temperatura inicial y final de alineación (Cuadro 3)

### 3.4 Análisis de Productos de PCR

Para analizar los tamaños alélicos, los productos de PCR se separaron en gels de poliacrilamida-bisacrilamida desnaturalizante al 6.5 %, de 25 cm de longitud y 0.4 cm de grosor, empleando TBE 1X (90 mM Tris base, 88 mM de ácido bórico y 2.0 mM EDTA pH 8.0) como amortiguador de corrimiento en cámaras de electroforesis vertical, a 1500 volts durante 1:30 h a 50 °C. En cada carril del gel se depositó 0.5  $\mu$ l del producto de PCR (para cada *locus*) y un marcador de tamaño molecular (Marcador 50-350 pb, LI-COR), cada 10 carriles del gel, para la determinación del

tamaño de la banda amplificada. Los productos de amplificación fueron analizados en el secuenciador semiautomatizado LICOR (Modelo 42001G; Kovak, 2001). Con el programa computacional SAGA GT se obtuvo el tamaño y número de alelos.

Cuadro 3. Programas de amplificación por PCR incluidos en el programa Touchdown del termociclador Perkin Elmer (PT 9700).

	TDTG		TD55		TD60		TD65	
Tiempo	Temp. °C	No. Ciclos						
5 min	95	1	95	1	95	1	95	1
45 s	95		95		95		95	
45 s	58 – 2 cada ciclo	} 5	62 – 2 cada ciclo	} 5	65 – 2 cada ciclo	} 5	68 – 2 cada ciclo	} 5
45 s	72		72		72		72	
45 s	95		95		95		95	
45 s	50		55		60		65	
45 s	72	30	72	30	72	25	72	25
10 min.	72	1	72	1	72	1	72	1

### 3.5 Análisis de la Diversidad Genética

Para el estadístico de la diversidad genética se evaluaron:

a) El número de alelos por *locus* en los 9 *loci* seleccionados y su valor medio

b) Los valores de Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ); la cual se definió como la proporción esperada de *loci* heterocigotos por individuo; y Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) en cada *loci*, la cual corresponde a la proporción observada de *loci* heterocigotos por individuo (Marshall, 1998).

c) El valor de contenido de información polimórfica (PIC) en cada *locus* y su valor medio.

d) La probabilidad de exclusión de paternidad con la ausencia del genotipo de uno de los padres (PE1).

e) La probabilidad de exclusión de paternidad (PE2) para cada *locus*.

Todos estos parámetros se calcularon para cada *locus* microsatélite utilizando el programa *CERVUS*, versión 3.0 (Marshall, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007), el cual evalúa la facilidad de asignar la paternidad al padre más probable mediante un módulo de simulación en el que se establecen los criterios Delta; dependiendo de los valores de Delta obtenidos en la simulación, y definiendo la proporción de falsos positivos en las asignaciones (nivel de confianza del 80% como "estricto" y del 95% como de "alta astringencia").

f) La probabilidad combinada de exclusión para los 9 *loci* (PEC2), utilizando la ecuación propuesta por Jaimenson y Taylor (1997):

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \dots (1 - P_K)$$

Donde:

P = probabilidad combinada de exclusión de paternidad del panel de *loci* utilizados

K = número total de *loci* dentro del panel utilizado

### **3.6 Asignación y Simulación de Paternidad/Maternidad**

Para la asignación de paternidad y maternidad se corrió un análisis de simulación asumiendo un 96% de *loci* tipificados y un error del 1% en la genotipificación con los criterios de restricción estrictos (80 y 95% de confianza).

Para la asignación de paternidad se formaron 2 grupos de individuos de acuerdo a la clasificación dada por el ganadero:

Grupo 1: se formó de 16 crías (con proporción 11/16 de raza Hereford/Brahman), y 7 posibles padres de raza Hereford.

Grupo 2: se formó de 17 crías (con proporción 5/8 de raza Brahman/Hereford), y 5 posibles padres de raza Brahman.

### **3.7 Análisis del Efecto de la Asignación de Paternidad sobre los Parámetros y Valores Genéticos**

Se diseñó una prueba para analizar el efecto de la paternidad incierta sobre los parámetros genéticos: varianza genética directa ( $\sigma^2$ ), varianza ambiental ( $\sigma^2_e$ ), índice de herencia directa ( $h^2_d$ ), proporción de la varianza ambiental con respecto a la fenotípica ( $e^2$ ), así como sobre los valores genéticos [Diferencias Esperadas de la Progenie (DEPs)] y sus exactitudes, en los sementales probados para asignación de paternidad.

Se ajustó un modelo animal univariado para la variable disponible, peso al nacimiento (PN).

Se generaron dos bases de datos: en la primera (PS) se simuló la paternidad de las crías, mientras que en la otra se incluyeron los datos de paternidad obtenidos del análisis de asignación (PR). La simulación de sementales se realizó de manera aleatoria entre los diferentes padres candidatos utilizados durante el empadre múltiple. Para la estimación de las DEPs se utilizó toda la información disponible de las familias analizadas (fecha y peso al nacimiento).

El modelo animal univariado ajustado, incluyó el efecto fijo del sexo de la cría, el efecto aleatorio del padre y el residual. La forma matricial del modelo fue:

$$y = Xb + Zu + \varepsilon$$

Donde:

$y$  = variable de interés PN,

$X$  y  $Z$  = matrices conocidas de incidencia que relacionan las observaciones con su respectivo efecto fijo y aleatorio,

$b$  = efecto fijo de sexo de la cría,

$u$  = efecto aleatorio del padre, y

$\varepsilon$  = efecto residual.

Los componentes de varianza fueron estimados mediante el procedimiento de máxima verosimilitud restringida usando el programa MTDFREML (Boldman *et al.*, 1993), el índice de herencia fue estimado por el mismo programa, mediante las salidas de los componentes de varianza ( $h^2_d = \sigma^2_d / \sigma^2_f$ , Donde:  $h^2_d$  = índice de

herencia directa,  $\sigma^2_g$ = varianza genética directa,  $\sigma^2_f$ = varianza fenotípica), las DEPs y exactitudes fueron obtenidas de una de las subrutinas del subprograma MTDFREML, incluida en el mismo programa. El criterio de convergencia del modelo fue considerado en  $1 \times 10^{-9}$ , y se realizaron tres reinicios en el análisis, hasta que el cambio en el logaritmo de la función de verosimilitud fuera menor a  $1 \times 10^{-4}$ , para asegurar el mínimo global.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de la Diversidad Genética

En el presente trabajo, se analizaron 19 *locus* microsatélites sugeridos por FAO/ISAG para la asignación de paternidad en ganado de carne. Para establecer el panel de trabajo en la raza Braford, fueron eliminados aquellos *loci* que no amplificaron con las muestras de ADN obtenidas, quedando un total de nueve *loci*. Se consideró que los 10 *loci* restantes no amplificaron porque este tipo de ganado no presenta dichos *loci*, aunque cabe la posibilidad de que no se hayan encontrado las condiciones adecuadas de amplificación e incluso es factible que haya habido un incorrecto almacenamiento de los primers.

Con ellos, se analizó la población total para obtener los datos de número de alelos y sus frecuencias, valores con los cuales se determinaron los parámetros de diversidad genética que se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Nivel informativo de los microsatélites utilizados en la asignación de paternidad.

<i>Locus</i> Microsatélite	No de alelos	Rango alélico (pb)	Ho	He	PIC	PE2
BM6444	8	145-159	0.5604	0.6661	0.6109	0.2463
INRAO40	22	120-204	0.8556	0.9401	0.9310	0.7665
INRA23	10	195-213	0.8000	0.8534	0.8323	0.5373
D15	11	235-257	0.8022	0.8855	0.8690	0.6104
D2S26	14	114-149	0.6098	0.8245	0.7999	0.4838
TGLA126	11	114-139	0.8315	0.8324	0.8074	0.4931
TGLA53	13	149-175	0.4205	0.8399	0.8159	0.5102
INRA37	12	120-146	0.6932	0.8186	0.7939	0.4733
HEL5	11	155-179	0.6087	0.8485	0.8252	0.5252

pb: pares de bases, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, PIC: contenido de información polimórfica, PE2: probabilidad de exclusión de paternidad para cada *locus*

Debido a la falta de trabajos publicados en medios indexados referentes a *loci* microsatélites en la raza Braford se optó por la realización de una comparación subjetiva con trabajos realizados en diferentes razas de bovinos bajo condiciones similares.

Dentro del panel de microsatélites estudiado, el *locus* BM6444 mostró el menor PIC (0.6109) y por consiguiente la menor PE2 (0.2463), siendo el *locus* menos polimórfico, ya que en la población analizada sólo se encontraron ocho alelos, de los cuales el alelo 149 se encontró en 41/88 individuos con una frecuencia de 0.4615, compartiendo el fenotipo heterocigoto con el alelo 151 el cual se encontró en 31/88 individuos con una frecuencia de 0.2424.

Contrariamente, el *locus* INRA040 fue el que mostró un mayor PIC (0.9310), y mayores valores de  $H_o$  y  $H_e$  (0.8556 y 0.9401 respectivamente). Se encontraron 22 alelos de los cuales el alelo 170 se presentó en 17/88 individuos con una frecuencia de 0.0992, el alelo 172 en 16/88 individuos con la misma frecuencia y el 178 en 16/88 individuos con una frecuencia de 0.0931, convirtiéndolo en el *locus* con mayor nivel de PE2 (0.7665). En un estudio previo, con ganado de raza Beefmaster, de la Rosa (2003) observó un PIC de 0.8150,  $H_o$  y  $H_e$  de 0.6000 y 0.8341, respectivamente, para este *locus*.

El *locus* INRA23 mostró una  $H_o$  y  $H_e$  de 0.8000 y 0.8534, respectivamente, un PIC de 0.8323 con una PE2 de 0.5300, similar a los valores de PIC observados por Salazar (2002) de 0.8320 en ganado Beefmaster, mostrando diferencias en la  $H_o$  0.6670 y 0.6530,  $H_e$  0.855, siendo superiores a las publicadas por Sherman *et al.*, (2004) en ganado Angus Rojo ( $H_o$  de 0.7470 y PIC de 0.3550).

El *locus* D15 mostró un PIC de 0.8690, menor a 0.9996 observados por Riojas *et al.*, (2006), en ganado Brahman; el PE2 encontrado para este *locus* fue de 0.6104, mayor al reportado en ganado Brahman. En ganado Angus Rojo se observó una PE2 de 0.1920 (Sherman *et al.*, 2004), para dicho *locus* Martínez *et al.*, (2005), observó un PIC de 0.28 y una PE2 de 0.15 en la raza mostrenca, mientras que Salazar (2002), encuentra un PIC de 0.8380 y una PE2 de 0.7090, en ganado Beefmaster.

En el presente estudio, se encontró un PIC de 0.7999 y una PE2 de 0.4838 para el *locus* D2S26, siendo inferiores a las reportadas por Salazar (2002), las cuales son PIC 0.8250 y PE2 de 0.6870, mientras que Sherman *et al.*, (2004), observó una PE2 de 0.5150 en Angus Rojo; en ganado Mostrenco se reporta un PIC de 0.6000 y una PE2 de 0.4200 (Martínez *et al.*, 2005). En ganado Brahman se ha observado un PIC de 0.9999 y una PE2 de 0.72 (Riojas *et al.*, 2006).

Para el caso del *locus* TGLA126 se obtuvo en este estudio un PIC de 0.8081 y una PE2 de 0.4941, diferentes a los observados en una población Gyr (PIC de 0.4471 y PE2 de 0.3035) (Curi y Lopes, 2002). Mientras que en 1997, Heyen *et al.*, encontraron en ganado de raza Holstein un PIC de 0.5400 y una PE2 de 0.3100, de raza Angus Rojo, un PIC de 0.5100 y una PE2 de 0.29, de raza Simmental, un PIC de 0.5100 y una PE de 0.2900. Sherman *et al.*, (2004) en ganado Angus Rojo, observó una heterocigosidad de 0.7120 y una PE2 de 0.2950. En ganado Beefmaster se reportó un PIC de 0.7690 y una PE2 de 0.593 (Salazar, 2002).

El *locus* TGLA53 mostró en este estudio, un PIC de 0.8159 y una PE2 de 0.5102, siendo inferior al PIC (0.8420) y superior a la PE2 (0.5930), reportada en ganado Beefmaster (Salazar, 2002). Heyen *et al.*, (1997), reportaron en ganado Holstein un PIC de 0.7500, PE2 de 0.5600, Angus Rojo 0.5600 y 0.3500, Simmental 0.7200

y 0.5200 para PIC y PE2 respectivamente. Sherman *et al.*, (2004), observó en Angus Rojo una PE2 de 0.5680. En ganado Mostrenco español se reportó un PIC de 0.7200 y una PE2 0.5500 (Martínez *et al.*, 2005).

En el caso de INRA37 se encontró un PIC de 0.7939 y una PE2 de 4733, Salazar (2002), reporta en ganado Beefmaster un PIC de 0.7760 y una PE2 de 0.626 y Martínez *et al.*, (2005), reporta un PIC de 0.4200 y una PE2 de 0.2500.

Finalmente para el *locus* HEL5 se obtuvo un PIC de 0.8225 y una PE2 de 0.5252, con 11 alelos detectados entre los rangos 155-179 pb y una  $H_o$  de 0.6087. Como se mostró anteriormente, se puede resumir que, del total de *loci* microsatélites utilizados para dicho estudio el *locus* BM6444 fue el menos informativo, a diferencia de los *loci* INRA040 y D15, mostrando los mejores niveles de PIC (0.9310 y 0.8690 respectivamente).

Los resultados encontrados en el análisis de diversidad genética del presente estudio muestran alta variabilidad genética, comparada con resultados observados en diferentes razas de bovinos (Heyen *et al.*, 1997; Curi y Lopes, 2002; Salazar, 2002; de la Rosa, 2003; Sherman *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Riojas *et al.*, 2006), los cuales son atribuibles a la variabilidad intrínseca de las razas evaluadas, debido a que las razas progenitoras del Braford (Brahmán-Hereford) son distantes entre sí, dando lugar a mayor recombinación y aumento de la variabilidad genética al momento de unirse, y por tanto aumento de los parámetros observados. Este hecho muestra claramente la necesidad de la caracterización de paneles de *loci* específicos para cada raza en la cual se desee realizar pruebas de paternidad, el número de alelos y de frecuencias alélicas puede ser diferente en diferentes poblaciones de igual raza.

Al término del estudio de diversidad genética se procedió a calcular la probabilidad combinada de exclusión para los 9 *loci* (PEC2). El cuadro 5 muestra la probabilidad combinada de exclusión para el panel de microsatélites.

Cuadro 5. Probabilidad de Exclusión Combinada del panel de *locus* utilizado para la asignación de paternidad.

<i>Locus</i> Microsatélite	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*
BM6444	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463	0.2463
INRA040		0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665	0.7665
INRA23			0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373	0.5373
D15				0.6104	0.6104	0.6104	0.6104	0.6104	0.6104
D2S26					0.4838	0.4838	0.4838	0.4838	0.4838
TGLA126						0.4931	0.4931	0.4931	0.4931
TGLA53							0.5102	0.5102	0.5102
INRA37								0.4733	0.4733
HEL5									0.5252
PEC2**	0.2463	0.8240	0.9185	0.9682	0.9836	0.9916	0.9959	0.9978	0.9989

\*: Número de *loci*, PEC2 \*\*: Probabilidad de Exclusión Combinada.

Los resultados obtenidos para PIC, He, Ho y PE2, muestran que el *locus* con mayor variabilidad genética dentro del estudio fue el INRA040, seguido por el D15. Por su parte, el *locus* BM6444 fue el menos informativo de los 9 seleccionados, por lo tanto si se excluye a dicho *locus* del panel se obtendría una probabilidad de exclusión combinada de 0.9986, valor que se considera aceptable para la asignación/verificación de relaciones de parentesco (Ron *et al.*, 1996; Heyen *et al.*, 1997; Curi y Lopes, 2002; Salazar *et al.*, 2004; Riojas *et al.*, 2006), por lo que el panel de *loci* pudiera reducirse a ocho *loci* microsatélites.

## 4.2 Verificación de Maternidad

Para realizar la verificación de maternidad se tomó como verdadera la información proporcionada por el ganadero en cuanto a la relación de las madres con las crías y se realizó la verificación de las madres tomando en cuenta que no se conocía el

genotipo de uno de los padres (madre). La verificación mostró que sólo el 9.09% (3 de 33 madres) de las madres estaban asignadas correctamente, teniendo un error de asignación de maternidad del 90.91%, evidenciando que la madre asignada por el ganadero a la cría no correspondía a la verdadera madre. Esta cifra es superior al 8 % de error en la asignación de maternidad en ganado bovino Irlandés observado por Ron *et al.*, (1996). Dodds *et al.*, (2005) observan, de un experimento de simulación en ovinos, que el efecto de la ausencia del 5 al 10% del pedigrí de las madres no afecta significativamente el resultado final en un programa de mejoramiento genético.

Este error puede ser causado por el tipo de manejo del hato, al momento de identificar a las madres de las crías, el cual consiste en agrupar dentro de un corral de manejo la totalidad de vientres y crías que se encuentran en determinada pradera, dentro de esta se capturan las crías para marcarlas bajo el arete en turno, al momento de la captura de la cría se le asigna la madre, la cual es apoyada en la proximidad de la cría y cualquier vientre. De esta manera se cae en errores graves al momento del registro de la maternidad dentro del hato, poniendo en duda la veracidad de los datos otorgados por el productor, repercutiendo de manera directa en el verdadero valor genético de la cría.

#### **4.3 Asignación de Paternidad**

Para el caso de asignación de paternidad, se logró asignar la paternidad en el 100% de las crías, utilizando los criterios de asignación estricto (95% de confianza), asumiendo un 96% de *loci* tipificados y un error del 1% en la genotipificación. Estos resultados demostraron la eficiencia del panel de *loci* microsatélites utilizado.

La asignación de paternidad para las crías de ambos grupos se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Asignación de paternidad a las crías del grupo 1 y 2.

<i>Grupo de Crías</i>	<i>No. de Padre asignado</i>	<i>Número de Cría</i>
Grupo 1	431	188, 150, 147, 195, 190, 186, 157, 156H
	953	143, 158
	447	177, 156M, 161, 197,
	453	159M, 176
	917	155
Grupo 2	188279	171, 175, 169
	01/8	154, 179, 183, 178, 164,
	064	184, 174, 165, 163, 185, 173, 168
	168	159H

H: hembra, M: macho

Como se aprecia en el cuadro 6 el semental del grupo 1 que muestra dominancia reproductiva frente a los demás es el número 431, al cual se le asignó la paternidad de 8 crías, en segundo lugar se encuentra el semental 447 con 4 crías asignadas, y a los sementales 453 y 917 se les asignó la paternidad de dos y una cría respectivamente. Para el caso de machos del grupo 2, el semental 064 fue el que mostró dominancia reproductiva con la asignación de 7 crías, mientras que al semental 168 sólo le fue asignada una cría.

Mediante la verificación de maternidad y asignación de paternidad del hato de raza Braford utilizado para la realización de este estudio, se logró la estructuración de sólo tres familias completas (ver cuadro 7), es decir 9.09% del 100% de las posibles familias.

Cuadro 7. Estructuración de las familias completas dentro del ható de raza Braford bajo estudio.

<i>No. de Madre</i>	<i>No. de Cría</i>	<i>No. de Padre</i>
338/1	143	953
436/3	154	01/8
638/4	195	431

#### **4.4 Estimación de las Diferencias Esperadas en la Progenie (DEPs)**

Para la estimación de las DEPs se utilizó toda la información disponible de las familias analizadas (fecha y peso al nacimiento). Se generaron dos bases de datos:

Paternalidad simulada de las crías (PS), se realizó de manera aleatoria entre los diferentes padres candidatos utilizados durante el empadre múltiple, y para la cual se obtuvo la siguiente información:

- Probabilidad del logaritmo de verosimilitud  $-2 \log L = 155.6394$
- Varianza genética directa  $\sigma^2_d = 1.5609$
- Varianza ambiental  $\sigma^2_e = 20.6779$
- Varianza fenotípica  $\sigma^2_f = 22.2388$
- Índice de herencia directa  $h^2_d = 0.07$

Paternalidad real de las crías (PR), en la que se incluyeron los datos de paternidad obtenidos del análisis de asignación. En su análisis se obtuvieron los estimadores:

- Probabilidad del logaritmo de verosimilitud  $-2 \log L = 127.3615$
- Varianza genética directa  $\sigma^2_d = 2.7740$
- Varianza ambiental  $\sigma^2_e = 17.3512$
- Varianza fenotípica  $\sigma^2_f = 20.1252$
- Índice de herencia directa  $h^2_d = 0.14$

Donde la varianza genética directa o aditiva ( $\sigma^2_d$ ) es la proporción de la varianza genética que es debida a efectos individuales de los genes, la varianza ambiental ( $\sigma^2_e$ ) corresponde a toda la variación explicada por el grupo contemporáneo (año, época de nacimiento, sexo, etc.), pero para dicho análisis sólo se incluyó el efecto del sexo; y por último, la varianza fenotípica ( $\sigma^2_f$ ), la cual es la varianza del indicador productivo incluidas en ella la varianza genética y ambiental. En consecuencia, el índice de herencia directa o heredabilidad directa ( $h^2_d$ ) es la proporción de la varianza fenotípica que es explicada por el efecto de los genes que son transmitidos a la cría por su padre (Falconer y Mackay, 1996).

Se pueden observar diferencias en las varianzas estimadas y consecuentemente en los parámetros genéticos estimados a partir de las dos bases de datos (PR y PS); en general, se puede apreciar que al simular una paternidad al azar se crea una subestimación del índice de herencia (0.07%) y de la varianza genética directa (1.2131%), así como un incremento en las varianzas fenotípica y ambiental. Estos resultados son consecuencia de varios efectos bajo los cuales se realizó el estudio, entre los que podemos mencionar el reducido número de observaciones por semental y la poca información acerca de los datos productivos de los sementales, madres y crías. Van Vleck *et al.*, (1987), reporta que la exactitud de los predictores genéticos depende del índice de herencia, del número de registros del animal y de sus parientes.

Es claro que una mayor cantidad de observaciones por semental daría mejores estimaciones de estos valores, sin embargo, el propósito de esta parte del estudio es evidenciar las diferencias en los análisis de las DEPs cuando se tiene un pedigrí erróneo. El diseño de estudios con mayor número de observaciones podrá reforzar los hallazgos del presente estudio, aunque en condiciones de campo, es

complicado encontrar y diseñar estudios de este tipo por las inherentes complicaciones económicas que esto implica.

Sin duda, el resultado que muestra mayor relevancia es la diferencia que se observa en los valores genéticos medidos en las evaluaciones genéticas de los grupos de PS y PR, reflejados en las DEPs, y por consecuencia en la jerarquización de los sementales. En el cuadro 8, se muestran las diferencias en la predicción de los valores genéticos y las exactitudes dadas la paternidad simulada (PS) y real (PR), cabe mencionar que, de los nueve padres reales de los dos grupos de crías sólo se contaba con los pesos al nacimiento de 5 de ellos.

Cuadro 8. Diferencias en la predicción de los valores genéticos (DEPs) y sus exactitudes dada la paternidad simulada (PS) y real (PR) para peso al nacimiento.

Paternidad Simulada			Paternidad Real		
No. Semental	*DEPs/PN	Exactitud	No. Semental	DEPs/PN	Exactitud
447	-0.2601	0.17	447	0.5791	0.30
227	0.2400	0.28	431	-0.1363	0.34
431	0.6664	0.27	917	-0.2410	0.18
917	-0.0551	0.30	453	0.1335	0.23
409	-0.6304	0.31	953	-0.3353	0.17
453	0.0554	0.31			
953	0.0968	0.32			
168	0.3686	0.25			
01/8	-0.4741	0.22			
53	-0.1927	0.13			
64	0.3356	0.20			
188279	-0.0373	0.20			

\*DEPs/PN: Diferencias Esperadas en la Progenie para peso al nacimiento

Como se aprecia en el cuadro 8, el semental 447 en la PS muestra un valor de DEPs de -0.2601, y para el caso de la PR es el que muestra un valor de DEPs mayor (0.5791), caso contrario al semental 431 el que muestra una DEPs para la PS de 0.6664 al cual se le estaría sobreestimando su valor genético, trayendo

consigo un retroceso en la mejora genética del hato al que se fuese a introducir, ya que estaría aportando una DEP de -0.1363, con una exactitud de 0.34.

Las DEPs son un valor de suma importancia ya que durante los procesos de comercialización de los sementales son un excelente indicador de su mérito genético, por lo que, si en las evaluaciones genéticas un animal resulta subestimado o sobreestimado, su valor económico disminuirá y la oportunidad de incrementar el valor genético del hato en el que se ingrese no será el esperado.

En México no se han estimado las pérdidas económica causada por los errores en la asignación de paternidad en ganado bovino, los cuales traen en muchos casos retroceso o un incremento lento en la mejora genética del hato; por ejemplo, en ganado bovino para leche el porcentaje de error en la asignación de paternidad de los individuos puede alcanzar el 20% en los animales de registro (Meuwissen y Van Arendonk, 1992). Geldermann *et al.*, (1986), reportó que en ganado lechero un error en la asignación de paternidad del 15% se provoca una disminución del 8.7 y 16.9% en el mejoramiento genético; en años posteriores Israel y Weller (2002), mencionan que con un error del 10% se produce una reducción del 4.3% en la mejora genética en el ganado lechero.

En Israel en el año de 1995 se realizó un estudio el cual mostró que se generó un progreso genético anual del 5% en el ganado lechero, atribuido a la correcta asignación del registro en el pedigrí, reflejando una producción de 100 kg de leche/vaca/año, representando un incremento sobre la ganancia económica de US \$0.10/kg de leche. Ejemplificando dicho progreso genético, en dado caso de que no se realizara la correcta asignación del registro en el pedigrí y considerando una población de 100, 000 vacas, traería una pérdida de 500, 000 kg de leche al año, equivalente a unos US \$50, 000 (Ron *et al.*, 1996).

## **5. CONCLUSIONES**

Se estableció un panel de nueve *loci* microsatélites recomendados por FAO/ISAG que presentan un alto grado de informatividad para la asignación/verificación de relaciones filiales (maternidad y paternidad) en ganado Braford. En este estudio se demuestra la necesidad de establecer paneles apropiados para cada raza que se desee estudiar, ya que algunos *loci* pueden ser apropiados en ciertas razas y no en otras.

Mediante la genotipificación de la población bajo estudio, se logró la asignación del 100% de los padres a las crías, pero solamente la verificación del 9.09% de las madres. Por consiguiente sólo se pudo estructurar de manera completa y acertada tres familias.

Los cambios observados en las DEPs después de simular y asignar la paternidad de las crías, pueden conducir a problemas en la determinación de valores genéticos confiables, lo que representaría falsas atribuciones del mérito genético en sementales evaluados, con el consecuente impacto en el valor productivo y económico del hato ganadero.

Bajo este sistema de producción es poco probable que se puedan establecer programas de mejoramiento genético puesto que los registros de producción y las relaciones de parentesco no serían acordes al pedigrí real como se puso en evidencia durante el presente estudio.

## **6. LITERATURA CITADA**

Aranguren MAJ, Roman BR, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 13:30-42.

Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Braford, A.C. 1997. "Primer foro de análisis de los recursos genéticos de la ganadería bovina". Hacia el establecimiento del programa nacional de recursos genéticos pecuarios. Del 19 al 19 de noviembre, en la ciudad de México, D. F. Pp. 146-149.

Basrur PK, Moon YS. 1967. Chromosomes of cattle, bison, and their hybrid, the cattalo. American Journal Veterinary of Research, 126:1319-1325.

Becerra VV, Paredes CM. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica, Chile, 60:270-281.

Bello PN. 2001. Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Ballaterra, Barcelona. Pp. 16-22.

Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Solinas TS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, Beattie CW. 1994. A genetic linkage map for cattle. Genetics, 136:619.

Boldman KG, Kriese LA, Van Vleck LD, Van Tasell CP, Kachman SD. 1993. A manual for use of MTDFREML, A set of programs to obtain estimates of variances and covariances [ Draft]. USDA, Agric Res Service. Clay Center, Lincoln. Ne 1995.

Bowcock AM, Ruiz LA, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli SLL. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature, 368:455-457.

Buchanan FC, Crawford AM. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF70 locus. Animal Genetics, 23:185.

Buchanan FC, Crawford AM. 1993. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193 OarFCB266 and OarFCB304 loci . Journal Animal Genetics, 24:145.

Buchanan FC, Adams JL, Littlejohn PR. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. Genomics, 22:397-403.

Blancou J. 2001. A history of the traceability of animals and animal products. Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics, 20:420-425.

Brezinsky L, Kemp SJ, Teale AJ. 1993. ILSTS005: A polymorphic bovine microsatellite. Animal Genetics, 24:73.

Carmona MAM, Gasque GR, Ochoa GP. 2000. Mejoramiento animal. Genética. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia. pp. 1-93.

Cadena-Maneses JA, Morales-Castillo A. 2002. Comparación de diferentes métodos para la estimación de componentes de varianza. *Agrociencia*, 36:713-723.

Cavalli SLL. 1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics*, 14:60-65.

Caballero A, Toro MA. 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetical Research*, 75: 331-343.

Cardoso FF, Tempelman RJ. 2004. Genetic evaluation of beef cattle accounting for uncertain paternity. *Livestock Production Science*, 89:109-120.

Casas E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 14:24-31.

Cornide MT, Coto O. 2002. Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. 367 pp.

Cunningham EP, Meghen CM. 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Revue scientifique et technique*, International Office of Epizootics, 20:491-499.

Curi A, Lopes RC. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovine. *Brazilian Journal Veterinarian Research of Animal Science*, São Paulo. 3: 129-135.

Chambers G, Macavoy ES. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B*. Elsevier, 126:455-476.

Cheng HH, Crittenden LB. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73:539-546.

Datagene. 2002. Acreditación de linajes en ganado bovino. (en línea) [http://www.datagene.es/DATAGENE/Castellano/Servicios/Pruebas\\_de\\_ADN\\_en\\_animales.htm](http://www.datagene.es/DATAGENE/Castellano/Servicios/Pruebas_de_ADN_en_animales/adn_animales.htm) [consulta noviembre 2006].

Dentine MR. 1999. Marker-assisted selection. In: *The genetics of cattle*. Fries R, Ruvinsky A. (Editors). CABI Publishing London, England 497-511 pp.

De la Rosa RFX. 2003. Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. Tesis, para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Reynosa Tamaulipas México.

Díaz MGC. 2006. Marcadores moleculares: Qué son, como se obtienen y para qué valen. Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga. (en línea) <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html> [consulta noviembre 2006].

Díaz C, Carabaño JM, Hernandez D. 1995. Connectedness in genetic parameters estimation and BV prediction. In: *46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Prague, 4-8 Sept.

Díaz C, Quintanilla R. 2002. Estado y nuevas demandas de los programas de mejora de vacuno de carne. ITEA. 98:00-00.

Dodds GK, Tate LM, Size AJ. 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. *Journal Animal Science*, 83:2271-2279.

Einstein BI.1990. The polymerase chain reaction. A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *New English Journal of Medicine*, 322:178-183.

Falconer, D.S. y T.F.C. Mackay. 1996. *Introducción a la genética cuantitativa*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. 469 p.

FAO. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: Management of small population at risk, FAO. Rome.

Ferreira MA, Grattapaglia D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (2nd ed.) Embrapa-Cenargen.

Geldermann H, Pieper U, Weber W E. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *Journal of Animal Science*, 63:1759- 1768.

Genetic Analysis Manual. The Global IR<sup>2</sup> System. 1999. (LI-COR, Inc, Lincoln, Nebraska).

Georges M, Massey J. 1992. Polymorphic DNA markers in Bovidae (World Intellectual Property Org Geneva). Wo Publ No 92/13102, Volume: null, Page: null.

Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasqino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao Y, Womack JE, Hoeschle J. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle exploiting progeny testing. *Genetics Society of American*, 139:907-920.

Goldstein BD, Schlotterer C. 2000. *Microsatellites; Evolution and Applications*. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanism. Ed. Oxford University Press. Oxford New York 1-273.

Hecker KH, Roux KH. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques*, 20:478-485.

Heyen WD, Becver EJ, Da Y, Evert ER, Green C, Bates ERS, Ziegle SJ, Lewin AH. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Animal Genetics*, 28:21-27.

Holroyd RGV, Doogan J, De Faveri J, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD. 2002. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiplesire herds. *Animal Reproduction Science*, 71:67-79.

Ihara N, Mizoshita K, Takeda h, Sugimoto M, Mizoguichi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed K, Snelling W, Kappes S, Beattie C, Bennett G, Sugimoto Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3, 802 microsatellites. *Genome Research*, 14:1987.

Israel C, Weller IJ. 2002. Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. *Journal Dairy Science*, 85:1285-1297.

Jaimenson A, Taylor STCS. 1997. Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28:397-400.

Jeffreys AJ, Hillel J, Hartley N, Bulfield G, Morton D, Wilson V, Wong Z, Harris S. 1987. The implications for hypervariable DNA-regions for animal identification: hypervariable DNA and genetic fingerprints. *Animal Genetics* 18, Supplement 1 (20th International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms):141-142 pp.

Kaukinen J, Varvio SL. 1993. Eight polymorphic bovine microsatellites. *Animal Genetics*, 24:148.

Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw R.A, Sonstegard TS, Smith TPL. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Reserch*, 7:235-249.

Kalinowski TS, Taper LM, Marshall CT. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16:1099-1106.

Kinghorn BP, Kennedy BW, Smith C. 1993. A method of screening for genes of major effect. *Genetics Veterinarian*, 134:351-360.

Kodak Company. 1995-1999. Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software, Version 3.0 Windous User`s Manual. (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, USA).

Kovak J. 2001. Bovine microsatellite multiplexing for herd evaluation and parentage with LI-COR IR2 and SAGA GTTM. (en línea) <http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8734.html> [consulta octubre el 2006].

Laeflet AS, Rosa AJM, Schafhouser E, Hassen A, Rouse GH, Wilson DE, Reecy JM. 2003. Use of molecular markers to determine parentage in multiple sire pastures. *Beef Res Rep. Iowa State University*.

Lastra MIJ, Peralta AMA. 2000. La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000. (en línea) <http://www.sagar.gob.mx> [consulta febrero de 2007].

Lewin B. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford, McGraw-Hill Interamericana.

Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44:397-401.

Marklund S, Ellegren H, Ericsson S, Sandberg K , Andersson L. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 25:19-23.

Marshall TC. 1998-2001. CERVUS 3.0 General release version-24 april 2001.Copyright.

Martínez MA, Calderon J, Camacho E, Rico C, Vega-Pla LJ, Delgado VJ. 2005. Caracterización genética de la raza bovina Mostrenca con microsatélites. *Archivos de Zootecnia*, 54:357-361.

Meuwissen THE, Van Arendonk JAM. 1992. Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *Journal Dairy Science*, 75:1651-1659.

Moore SS, Byrne K. 1993. Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent adenylylase locus. *Animal Genetics*, 24:150.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 85:6622-6626.

Moazami-Goudarzi K, Laloë D, Furet PJ, Grosclaude F. 1997. Analysis of genetics relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics*, 28:338-345.

Morera L, de Andrés DF, Barbancho M, Garrido JJ, Barba JC. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Archivos de Zootecnia*, 48:63-70.

Montaldo VHH, Barria PN. 1998. Mejoramiento genético de animales. *Ciencia al día*, 2:1-19.

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51:263-273.

McPherson M, Møller S. 2000. PCR The basics from background to bench. Springer-Verlag New Cork.

Nicholas F. W. 1996. *Genética veterinaria*. Ed Acribia, Zaragoza España. 24-26pp.

Osta R, García ME, Zaragoza P, Rodellar C, Zarazaga I. 1993. Milk protein genotyping in bovine embryos using PCR. 9na Reunion AETE-Lyon, 10-11, Septiembre.

Parra BGM. 2006. Mejora genética de características de producción de ganado Brahman en México. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica multidisciplinaria Agronomía y Ciencias. pp.143.

Peelman LJ, Mortiaux F, Van Zeveren A, Dansercoer A, Mommns G, Coopman F, Bouquet Y. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatelite markers in four Belgain cattle breeds. *Animal Genetics*, 29:161-167.

Ponsuksili S, Wimmers K, Schmoll F, Horst P, Schellander K. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *Journal Heredity*, 90:656-659.

Ramirez GAJ, Rios RGJ. 1997. Tecnologías reproductivas de vanguardia aplicadas a la ganadería bovina. En *Memorias: Primer Foro de los Análisis de los Recursos Genéticos de la ganadería Bovina*. 17 al 19 de Noviembre. Cd. De México D.F. Pp. 49-69.

Riojas VVM, Gomez FJC, Salinas MJA, Montes de Oca LR, Wong GA. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *CIENCIA UANL*, 9: 41-50.

Ron M, Blanc M, Ezra E, Weller JI. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal Dairy Science*, 79:676-681.

Ruíz FA. 2004. Impacto del TLCAN en la cadena de valor de los bovinos para carne. Universidad Autónoma Chapingo. P 39.

Satz LM, Kornblihtt RA. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones. (en línea) <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm> [consulta octubre del 2006].

Salazar MEL. 2002. Evaluación de nueve marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Reynosa Tamaulipas pp. 38-42.

Salazar MEL, Gonzales PM, Del Bosque GA, Resendez PD, Barrera SHA, Sifuentes RAM. 2004. Evaluación de marcadores microsatelitales para la identificación de individuo, en dos razas de ganado bovino de carne de la región noreste de México. *Técnica Pecuaria en México*, 42:429-453.

Sifuentes RAM, Parra BGM, De la Rosa RXF, Sánchez VA, Serrano MF, Rosales AJ. 2006. Importancia de las pruebas de paternidad basadas en microsatélites para la evaluación genética de ganado de carne en empadre múltiple. *Técnica Pecuaria en México*, 44:389-398.

Sostegard TS, Lopez CNL, Kappes SM, Beattie CW, Smith TPL. 1997. Comparative mapping of human chromosome 2 identifies segments of conserved synteny near the Bovine MH locus. *Mamm Genome*, 8:751.

Steffen P, Eggen A, Dietz AB, Womack JE, Stranzinger G, Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics*, 24: 121.

Stone RT, Pulido JC, Duyk GM, Kappes SM, Keele JW, Beattie CW. 1995. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm Genome*, 6:714.

Snustad PD, Simmons JM. 2006. *Principles of Genetics*. Fourth Edition. Pp.1-844.

Sherman BG, Kachman DS, Hungerford LL, Rupp PG, Fox PC, Brown DM, Feuz MB, Holm RT. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Animal Genetics*, 35:220-226.

Swarbrick PA, Buchanan FC, Crawford AM. 1991. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF36 locus. *Animal Genetics*, 22:377.

Tosh JJ, Wilton JW. 1994. Effects of data structure on variance of prediction error and accuracy of genetic evaluation. *Journal of Animal Science*, 72:2568-2577.

United States Department of Agricultura. 2003. GAIN Report Number MX3114. USDA. Foreign Agriculture Service. pp. 3-15.

United States Department of Agricultura. 2006. GAIN Report Number MX3114. USDA. Foreign Agriculture Service. pp. 3-15.

Vaiman D, Mercier D, Moazami GK, Eggen E, Ivezziel H. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mamm Genome*, 5:288-197.

Vankan DM, Faddy MJ. 1999. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire mating. *Animal Genetics*, 30: 355-361.

Van Vleck D, Pollack J, Branford OEA. 1987. Genetics for the animal sciences, New York: W.H. Freeman and Company.

Velmala RJ, Vilkki HJ, Elo KT, de Koning DJ, Maki TAV. 1999. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetics*, 30:136-143.

Visscher PM, Woolliams JA, Smith D, Williams JL. 2002. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *Journal of Dairy Science*, 85:2368-2375.

Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44:388-396.

Weller IJ, Feldmesser E, Golik M, Tager-Cohen I, Domochoovsky R, Alus O, Ezra E and Ron M. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 87:2627-2640.

Williams JL, Usha PA, Urquhart DGB, Kilroy M. 1997. Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *Veterinary Record*, 140:446-449.

Yañez AVO. 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipoema batatas* (L.) Lam). Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Académico Profesional en Ciencias Biológicas. Lima-Perú.