

INFERENCIA DE HIBRIDACIÓN EN LA RAZA BOVINA BLANCA CACEREÑA.

J. A. Padilla, M.E. Sansinforiano, J. C. Parejo, A. Rabasco y M. Martínez-Trancón.
Dpto Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Campus Universitario s/n. 10071. Cáceres. jpadilla@unex.es

INTRODUCCIÓN

Entre las razas bovinas españolas, la Blanca Cacereña es quizás la más amenazada de extinción. Está localizada en el S.O. de España. La disminución del censo de esta raza, como la de otras razas locales europeas, se ha producido paulatinamente en la segunda mitad del siglo XX, como consecuencia de la expansión de otras razas altamente seleccionadas e intensivamente gestionadas. En 1979 fue declarada como raza de especial protección por el Ministerio de Agricultura. Desde entonces criadores y organizaciones públicas han trabajado, con mayor o menor éxito, para conservar y recupera esta raza. Todo esto junto a los análisis genéticos moleculares realizados (Parejo *et al.*, 2002) ha permitido el diseño de un plan coordinado de conservación de la raza, en el que la gestión de la conservación se realiza tanto en un núcleo de conservación como en ganaderías comerciales (Calero *et al*, 2000). Aunque existe un estricto control genealógico en el núcleo de conservación, en las ganaderías comerciales dedicadas a la producción de carne se conoce la práctica ganadera de cruzar hembras de esta raza con sementales de razas cárnicas precoces, principalmente la raza Charolesa, para obtener híbridos con buenos rendimientos. El conocimiento de la influencia genética de la raza Charolesa en los rebaños actuales y la identificación de los híbridos en la raza son necesarios para la gestión del Plan de Conservación.

La utilización de marcadores genéticos altamente polimórficos como los microsatélites son una herramienta fiable y frecuentemente utilizada para la estimación de la diversidad genética y de la estructura genética poblacional, parámetros poblacionales necesarios para la gestión de la conservación en poblaciones de animales silvestres y domésticos. Normalmente, los microsatélites son suficientemente variables como para permitir la identificación inequívoca de todos los individuos muestreados en una población. Se han desarrollado varios métodos que emplean genotipos multilocus para seleccionar o excluir poblaciones como origen de los individuos y para inferir estructura poblacional. Estos métodos incluyen una variedad de procedimientos de asignación de máxima verosimilitud (Paetkau *et al.*, 1995, Rannala y Mountain, 1997, Cornuet *et al.*, 1999) y de modelos de agrupamiento bayesianos (Pritchard *et al.*, 2000, Falush *et al.*, 2003, Wilson y Rannala, 2003). En este estudio hemos utilizado 30 loci microsatélites para identificar los animales de raza pura y contribuir con ello al manejo del Plan de Conservación de la raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

Poblaciones de referencia: Hemos utilizado muestras de sangre completa de 112 animales (34 ♂ y 78 ♀) de raza Blanca Cacereña (BC), 60 animales (30 ♂ y 30 ♀) de raza Charolesa (CH) y 60 animales (31 ♂ y 29 ♀) de la raza Retinta (RE). Las muestras fueron recogidas de animales no emparentados e inscritos en los Libros de Registro de cada raza. La población de referencia de BC estuvo constituida por animales de raza pura (con genealogía conocida), procedentes de las cinco ganaderías que constituyeron el actual núcleo de conservación. Se utilizaron 68 animales sin genealogía conocida procedentes de 6 ganaderías comerciales para los análisis de asignación a raza e identificación de híbridos.

El ADN genómico de cada animal fue extraído utilizando el kit *Perfect gDNA Blood Mini* (Eppendorf AG). Todos los animales fueron genotipados con los 30 loci microsatélites recomendados por la FAO para los estudios de diversidad genética (<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>). Los 30 microsatélites se amplificaron solos o en reacciones múltiplex (3 -10 loci co-amplificaban) en 6 reacciones de PCR independientes. Los productos de PCR marcados fluorescentemente se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, USA) y se analizaron mediante GeneMapper®. Para estandarizar los resultados se han utilizado seis muestras de ADN de referencia, Holstein, Ayrshire, Limousin, Charolais, Aberdeen Angus y Piedmontese del Roslin Institute (Edimburgo).

Las estimaciones del nº de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, los estadísticos F y el análisis factorial de correspondencias se estimaron mediante el programa GENETIX 4.05.2 (Belkir *et al.*, 2001). Las diferencias entre medias se estimaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XV. El equilibrio Hardy-Weimberg se computó mediante test exacto con el programa GENEPOP 3.4 (Raymond y Rousset, 1995).

Hemos utilizado el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) para inferir la estructura poblacional y asignar los animales a la población más probable, bajo el modelo con mestizaje y frecuencias alélicas correlacionadas. Para estimar la probabilidad de que un individuo pertenezca a cada población de referencia hemos utilizado el algoritmo de re-muestreo Monte Carlo de Paetkau *et al.*, (2004) con 10000 individuos simulados, utilizando el criterio de asignación de Rannala y Mountain (1997), disponibles en el programa GeneClass v.2.0.f. (Piry *et al.*, 2004, Baudouin *et al.*, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han detectado un total de 223 alelos en los 30 loci microsatélites y poblaciones de referencia analizadas. Los valores de variabilidad genética encontrados en la raza BC fueron significativamente menores que los observados para las tres razas analizadas (Tabla 1), y similares a otras razas amenazadas, como la Mallorquina (Martin Burriel *et al.*, 2003).

Raza	MNA	H _o ± S.E.	H _e ± S.E.	F _{IS}	PA
Blanca Cacereña (BC)	3,53 ± 0,218 ^a	0,512 ± 0,045 ^a	0,452 ± 0,038 ^a	-0,132	7
Charolais (CH)	5,97 ± 0,385 ^b	0,660 ± 0,032 ^b	0,664 ± 0,030 ^b	0,006	36
Retinto (RE)	5,77 ± 0,341 ^b	0,652 ± 0,029 ^b	0,656 ± 0,027 ^b	0,006	25
Total	7,43 ± 0,400	0,586 ± 0,031	0,656 ± 0,027	-0,048	

Tabla 1: Número medio de alelos por locus (MNA), heterocigosidades medias observada (H_o) y esperada (H_e), déficit de heterocigotos (F_{IS}), y el nº de alelos privados de cada raza, observados con 30 loci microsatélites en las tres razas analizadas. Los superíndices indican diferencias (P < 0.05) entre los valores medios.

Las estimaciones de los estadísticos F para todos los loci y poblaciones, mostraron valores de diferenciación racial (F_{ST} = 0.213) mayores que los obtenidos en otras razas europeas (8-11%) (MacHugh *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000; Cañón *et al.*, 2001). En promedio, las razas tuvieron un 4,8 % de déficit de heterocigotos (F_{IS}), mientras que la población total alcanzó el 17,5% (F_{IT}). La mayor diferenciación genética se encontró entre la raza BC y las otras razas. No se encontraron loci microsatélites en desequilibrio H-W en las tres razas a la vez.

El análisis factorial de correspondencias reveló una clara separación de las tres razas. Hemos obtenido resultados similares en los análisis realizados con STRUCTURE, sin utilizar información previa poblacional, asumiendo que las poblaciones de referencia de las razas constituían una única e hipotética población. Las muestras se han agrupado en tres "clusters" genéticos distintos (K = 3), cada uno correspondiente a una raza (Fig. 1A).

La asignación racial de los 68 individuos BC sin genealogía conocida y la identificación de los híbridos se realizó con STRUCTURE, con dos aproximaciones modélicas: sin y con información poblacional previa. En el primer caso, los animales de cada raza son asignados a los clusters 1, 2 ó 3, estimando la probabilidad (q_i) de que cada genotipo pertenezca a cada uno de los tres clusters. En el segundo caso, asumimos que los individuos proceden de una de las tres razas predefinidas, y *structure* asigna los individuos y estima la probabilidad de que cada individuo tenga un ancestro en los otros grupos, tanto en la generación muestreada como en la 1ª y 2ª generaciones anteriores. En ambas aproximaciones modélicas se han obtenido los mismos resultados. En 31 de los 68 animales sin genealogía conocida las probabilidades de afiliación a la raza BC eran q₁ < 0.86. El resto de los animales BC se agruparon en el cluster 1 con una proporción de afiliación q₁ > 0.99. Los híbridos interraciales se identifican en la fig. 1B. Estos resultados han sido confirmados, además, por el método de computación de probabilidades de Paetkau *et al.* (2004), ya que con excepción de los 31 animales híbridos, el resto de los animales fueron excluidos de las razas de las que no procedían y asignados a su verdadera población de origen.

En el segundo modelo “con información poblacional” se ha inferido la ascendencia de los 31 híbridos. La mayor parte de ellos fueron híbridos BC-CH. Así, 2 animales mostraron una probabilidad $q_2 > 0.98$ (Cluster 2) de ser migrantes de la raza CH (híbridos con varias generaciones de retrocruzamiento); 7 animales tuvieron ascendencia significativa en la primera generación pasada (un padre) y 14 en la segunda generación (un abuelo) de raza Charolesa ($q_2 \geq 0.897$). Excepto 1 animal que tuvo un abuelo en el cluster 3 (RE, $q_3 = 1$), el resto tuvieron ancestros en las segundas generaciones de los cluster 2 y 3 (4 animales) o de los cluster 1, 2 y 3 (3 animales).

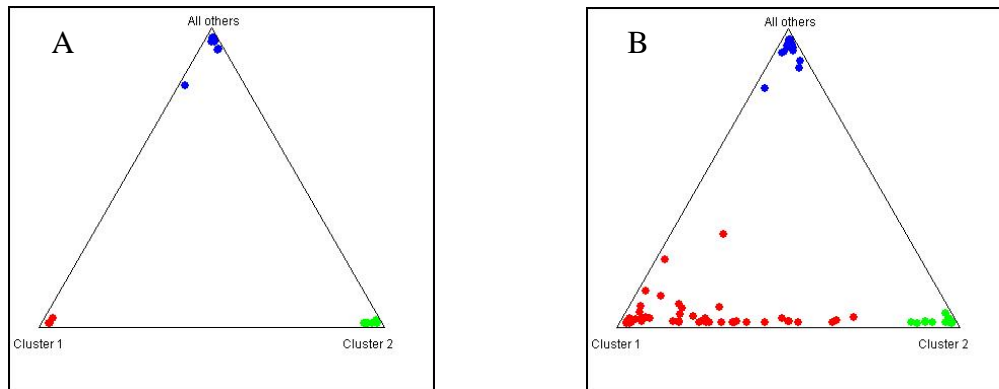


Fig. 1. Resumen de los resultados de agrupamiento asumiendo tres razas. Cada punto muestra la proporción individual de afiliación (q_i) de las muestras. Los Clusters 1 a 3 representan los genotipos BC, CH y RE, respectivamente. Los genotipos mestizos se representan intermedios entre los clusters. A) Poblaciones de referencia. B) Agrupamiento obtenido al incluir los 68 animales BC a asignar (N = 180).

En los últimos años se está generalizando la utilización de los métodos bayesianos para la detección de híbridos en animales domésticos (Freeman et al. 2005; Cañón et al. 2006; García et al. 2006). Nuestros resultados permiten identificar los animales de la raza BC y los animales híbridos, confirmando la existencia de cruzamientos con una raza cárnica mejorante, como es la raza Charolesa. Esta identificación constituye una de las fases primordiales en el manejo y gestión del plan de conservación, ya que permitirá preservar el acervo genético que la caracteriza y evitar la sustitución con otras razas foráneas, y puede proporcionar una valoración genética objetiva que facilite las decisiones para la concesión de ayudas a la cría en pureza (Decreto 34/97, Junta de Extremadura)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baudouin L., Piry S. y Cornuet J.M. (2004) *Journal of Heredity* 95: 217–24.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. y Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, Université de Montpellier II (France).
- Calero, R., Padilla, J.A., Parejo, J.C., Bartolomé, P., Martínez-Trancón, M., García-Barreto, L.J., Rabasco, A., Sansinforiano, E. y Bravo, J.A. 2000. *Feagas*, 17: 70-76.
- Cañón J., Alexandrino P., Bessa I., Carleos C., Carretero Y., Dunner S., Ferran N., García D., Jordana L., Laloe D., Pereira A., Sánchez A. y Moazami-Goudarzi K. (2001). *Genetics Selection and Evolution* 33: 311-389.
- Cañón J., García D., García-Atance M.A., Obexer-Ruff G., Lenstra J.A., Ajmone-Marsan .P, Dunner S. y The ECONOGENE Consortium (2006) *Animal genetics* 37: 327-334.
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A. y Solignac M (1999). *Genetics* 153: 1989-2000.
- Falush D., Stephens M. y Pritchard J.K. (2003) *Genetics* 164: 1567–1587.
- Freeman A.R., Bradley D.G., Nagda S., Gibson J.P. y Hanotte O. (2006) *Animal Genetics*. 37(1):1-9,
- García D., Martínez A., Dunner S., Vega-Pla J.L., Fernández C., Delgado J.V. y Cañón J. (2006) *Meat Science* 72: 560-566
- Kantanen J., Olsaker I., Holm L.e., Lien S., Vilki J., Brusgaard K., Eythorsdottir E., Danell B. y Adalsteinsson S. (2000). *Journal of Heredity* 91: 446-457.
- MacHugh D.E.R., Loftus T., Cunningham P. y Bradley D.G. (1998). *Animal Genetics* 29: 333 - 340
- Martin –Burriel I., Osta R., Puigserver G., Rodellar C. y Zaragoza P. (2003). *ITEA* 24E.
- Parejo J.C., Padilla J.A., Rabasco A., Sansinforiano M.E. y Martínez-Trancón M. (2002). *Genes & Genetic Systems* 77: 51-58.
- Pritchard J.K., Stephens M. y Donnelly P. (2000). *Genetics* 155: 945–959.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I. y Strobeck C. (1995). *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Paetkau D., Slade R., Burden M. y Estoup A. (2004). *Molecular Ecology* 13: 55-65.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D, Baudouin L. y Estoup, A. (2004). *Journal of Heredity* 95 (6): 536–539.
- Rannala B. y Mountain J.L. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 9197 – 9201.

Este trabajo es fruto de un Convenio Junta de Extremadura-UEx en materia de Conservación de Razas. Cofinanciado con fondos europeos FEOGA-ORIENTACIÓN medida 7.8 del programa operativo integrado de Extremadura 2000-2006.