



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VERIFICAR LA GENEALOGÍA DE BOVINOS JERSEY

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

REYNA GUADALUPE CUEVAS PAT

Bajo la supervisión de: RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ, Ph.D. y
ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA, Dra.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Julio 2013

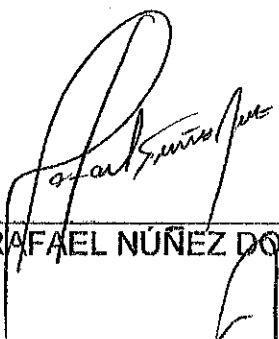
Chapingo, Estado de México

**USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VERIFICAR LA
GENEALOGÍA DE BOVINOS JERSEY**

Tesis realizada por **REYNA GUADALUPE CUEVAS PAT**, bajo la supervisión del Comité Asesor Indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

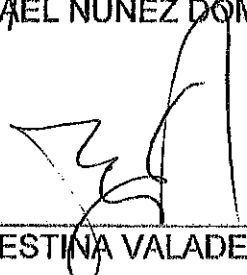
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



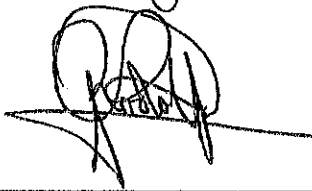
Ph.D. RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ

CODIRECTORA:



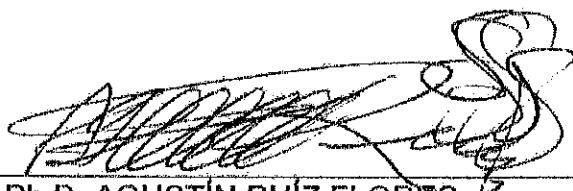
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



Ph.D. RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE

ASESOR:



Ph.D. AGUSTÍN RUÍZ FLORES

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE APÉNDICES	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Evaluaciones genéticas	4
2.2 Marcadores moleculares	4
2.3 Utilización de marcadores moleculares	5
2.4 Tipos de marcadores moleculares	6
2.5 El grupo sanguíneo y polimorfismo de proteína	9
2.6 Marcadores moleculares utilizados para pruebas de paternidad en bovinos	9
2.6.1 Microsatélites	10
2.6.2 Polimorfismo de base única (SNP)	15
2.7 Factores que pueden disminuir la sensibilidad de los marcadores microsatélites	16
2.7.1 Mutación	16
2.7.2 Alelos nulos	17
2.7.3 Homoplasia	18

2.8	Factores que causan errores de paternidad	18
2.9	Resultados de pruebas de paternidad con marcadores microsatélites en bovinos.....	20
2.10	Verificación de la paternidad en diferentes especies.....	22
2.11	Literatura citada.....	23
3	Uso de marcadores moleculares para verificar la genealogía en bovinos Jersey	32
3.1	Resumen	32
3.2	Abstract.....	33
3.3	Introducción	34
3.4	Materiales y métodos.....	36
3.5	Resultados y discusión	40
3.5.1	Calidad y cantidad de DNA	40
3.5.2	Parámetros de los marcadores de microsatélites usados para verificación de parentesco	41
3.6	Conclusiones	49
3.7	Literatura citada	50
4	Apéndices	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales marcadores moleculares utilizados en genética molecular.	7
Cuadro 2. Principales marcadores microsatélites y las razas de bovinos en las cuales se han utilizado para estudios de paternidad.	11
Cuadro 3. Probabilidad de exclusión combinada (CPE) utilizada para determinar paternidad en diferentes razas de bovinos.	12
Cuadro 4. Estimaciones de parámetros de diversidad genética con microsatélites utilizados en bovinos.	13
Cuadro 5. Relación de microsatélites utilizados para su amplificación en caracterización molecular de bovinos.	14
Cuadro 6. Errores de paternidad en bovinos estimados en diferentes partes del mundo.	20
Cuadro 7. Errores de paternidad estimados en diferentes especies con excepción de los bovinos.	22
Cuadro 8. Probabilidad de exclusión combinada (CPE) utilizando microsatélites para determinar paternidad en especies diferentes a los bovinos.	23
Cuadro 9. Cantidad y calidad de DNA extraído a partir de sangre con el kit comercial Maxwell 16, en animales menores y mayores de 2 años ($\bar{x} \pm DE$)...	40
Cuadro 10. Número de alelos por locus y la frecuencia del alelo más común (FAC) de los marcadores microsatélites analizados en Jersey en este estudio.	44
Cuadro 11. Información ² de marcadores analizados en bovinos Jersey.....	45
Cuadro 12. Contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidades de exclusión de paternidad (PE1, PE2 y CPE) ²	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que será amplificada, los primers, el buffer y la enzima Taq polimerasa. En el primer ciclo de PCR resultan dos copias de la cadena de DNA molde.....	8
Figura 2. Microsatélite de dos pares de bases repetidas con tres y cuatro repeticiones en tándem.....	10
Figura 3. Calidad de DNA en geles de agarosa 1%, en el que se muestra el DNA de alto peso molecular (señalado con flechas azules). El marcador molecular utilizado fue el de 1 Kb de fermentas (250 a 10000 pb).	41
Figura 4. Representación gráfica de los microsatélites de la reacción múltiplex detectados en bovino de la raza Jersey. En el panel a) los microsatélites marcados con el fluoróforo Azul (FAM), de izquierda a derecha TGLA227 (75 a 105 pb), BM2113 (122 a 146 pb), TGLA53 (143 a 191 pb), ETH10 (198 a 231 pb) y SPS115 (234 a 265 pb); en el panel b) los marcados con verde (JOE), de izquierda a derecha TGLA126 (115 a 131 pb), TGLA122 (136 a 184 pb) e INRA23 (195 a 225 pb); y en el panel c) los marcados con negro (NED), de izquierda a derecha ETH3 (103 a 133 pb), ETH225 (131 a 159 pb) y BM1824 (176 a 197 pb). La figura fue elaborada usando el software GeneMapper versión 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).	42

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Probabilidad de exclusión combinada (CPE1) del panel de locus utilizados para la asignación de paternidad cuando el genotipo del hijo y un padre es conocido.....	54
Apéndice 2. Probabilidad de exclusión combinada (CPE2) del panel de locus utilizados para la asignación de paternidad cuando el genotipo del hijo y los progenitores es conocido.	54
Apéndice 3. Genotipos de padres e hijas, para cada locus.	55
Apéndice 4. Genotipos de madres e hijas, para cada locus.	56
Apéndice 5. Genealogía de familias analizadas para prueba de paternidad	57

DEDICATORIA

Con admiración y respeto a mi familia...

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que con su colaboración hicieron posible la realización de este estudio.

- A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Producción Animal por la oportunidad que me brindaron para mi formación profesional.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de mis estudios de posgrado.
- Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por el apoyo económico recibido para la escritura de este documento.
- A la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A. C., por su colaboración para la investigación.
- Al Comité Asesor por su guía y apoyo en la realización de este documento.

DATOS BIOGRÁFICOS



DATOS PERSONALES

NOMBRE	Reyna Guadalupe Cuevas Pat
FECHA DE NACIMIENTO	29 de diciembre de 1987
LUGAR DE NACIMIENTO	Ejido José María Pino Suárez, Carmen, Campeche.
CURP	CUPR871229MCCVTY06
PROFESIÓN	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
CÉDULA PROFESIONAL	7499774

DESARROLLO ACADÉMICO

2002-2005	Escuela Preparatoria Uno, Universidad Autónoma de Yucatán.
2005-2010	Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
2011-2012	Posgrado en Producción Animal, Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La industria nacional de ganado de bovino de registro, en la década más reciente se ha basado en la comercialización de animales con evaluaciones genéticas. En 1999 se realizó la primera evaluación genética nacional para bovinos Holstein en México (Ruiz *et al.*, 2000) y a partir de 2004 se realizan evaluaciones genéticas para bovinos Jersey (Núñez *et al.*, 2004). Uno de los propósitos de las evaluaciones genéticas es obtener la mejor predicción de los valores genéticos de los animales y su respectiva exactitud para la selección de futuros reproductores, con el fin de mejorar características de importancia económica. Con base en estas evaluaciones, se proporciona a los criadores y productores comerciales de ganado una herramienta más confiable y objetiva para la selección y utilización de sementales y vientres. El procedimiento que se utiliza para las evaluaciones genéticas es el del modelo animal, que consiste en obtener el mejor predictor lineal insesgado (BLUP, por sus siglas en inglés) del valor genético del animal, utilizando los registros de comportamiento y la matriz de relaciones genéticas aditivas entre los animales (Henderson, 1976). La utilización de esta metodología requiere que las bases de datos genealógicas y de comportamiento productivo incluyan información completa y confiable, para asegurar una mejor predicción de los valores genéticos (Sifuentes *et al.*, 2006; Arellano *et al.*, 2007; Arellano-Vera *et al.*, 2010).

La existencia de errores de paternidad puede conducir a un sesgo considerable en los estimadores de correlaciones genéticas entre los efectos directos y maternos, lo que puede sesgar la estimación de los parámetros y valores genéticos, así como reducir la ganancia genética de la selección (Senneke *et al.*, 2004; Arellano-Vera *et al.*, 2010). Banos *et al.* (2001) estimaron que con 11% de errores de paternidad se reduce el progreso genético en aproximadamente 50 kg de leche, 3 kg de grasa y 1.7 kg de proteína y disminuye de 11 a 15% la tendencia genética en características de leche en bovinos lechero de EE. UU.; también se reduce la magnitud de la estimación de la habilidad de transmisión predicha entre 8 y 9%. Por otra parte, Israel y Weller

(2000) evaluaron mediante simulación el efecto de 10% de errores en paternidad en bovinos lecheros y observaron una disminución de 4.3% en el cambio genético anual.

Sifuentes *et al.* (2006), trabajando con bovinos Charolais en México, encontraron que la ausencia o identificación errónea de cualquiera de los individuos que forman una familia fue 24%; asimismo, reportaron una sobrestimación de la heredabilidad de hasta 47%, al comparar dos bases de datos, una considerando la paternidad simulada y la otra con la paternidad real. Los errores en los registros de paternidad no son exclusivos de México, se han reportado este tipo de errores en Israel de 5% (Ron *et al.*, 1996), Alemania entre 4 y 23% (Geldermann *et al.*, 1986), Irlanda 20% (Beechinor y Kelly, 1997) y Brasil 27.5% (Curi y Lopes, 2002).

Las técnicas de genética molecular permiten realizar pruebas de paternidad con alto nivel de confiabilidad en ganado. Los marcadores de DNA tipo microsatélites o SSR (Simple Sequence Reapeats, por sus siglas en inglés) de condición codominante, son preferidos en pruebas de paternidad (Gomez-Raya *et al.*, 2008). La genotipificación de marcadores se hace en la progenie y los progenitores putativos; si para algún microsatélite el genotipo del semental no corresponde con el genotipo de la progenie, dicho semental es eliminado como progenitor. La información precisa del pedigrí permite obtener predicciones confiables del valor genético de los animales y por ende una mayor efectividad del mejoramiento genético del ganado (Stevanovic *et al.*, 2010). Los marcadores microsatélites utilizados en una población pueden no ser los adecuados para otra población o para otra raza de la misma especie, pues la eficacia que tienen los paneles de marcadores depende del nivel de información que proporcione el número de alelos y su frecuencia en la población (Jamieson y Taylor, 1997; Arellano *et al.*, 2007). Es decir, aunque se ha usado el mismo panel de marcadores para verificar la paternidad en diferentes países y con diferentes razas, no significa que ese panel sea eficaz en la población de bovinos Jersey de México.

Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la eficacia de 11 marcadores moleculares en la verificación de la genealogía de bovinos Jersey en hatos participantes en evaluaciones genéticas nacionales. .

Este documento consta de dos capítulos, una revisión de literatura y un estudio en el cual se determina la eficacia del uso de 11 microsatélites para verificación de progenitores en bovinos Jersey. La revisión de literatura se centra en una descripción de los diferentes tipos de marcadores moleculares, características, definición de microsatélites, utilidad y factores que disminuyen la sensibilidad de éstos, la importancia que tienen las pruebas de paternidad en las evaluaciones genéticas y algunos resultados de investigaciones sobre pruebas de paternidad con marcadores microsatélites en bovinos.

Finalmente, en el segundo capítulo se incluye el estudio del uso de marcadores microsatélites para verificar la paternidad de bovinos Jersey. La verificación de paternidad se realizó con muestras de sangre o semen de bovinos a través de la extracción de DNA utilizando las técnicas de PCR y análisis de fragmentos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Evaluaciones genéticas

Los sistemas de evaluación genética son ampliamente aceptados como una forma de predecir el mérito genético de los animales (Bertrand y Wiggans, 1998). La meta final en la selección de animales es obtener una generación superior a la actual, siendo elemento esencial el sistema de evaluación genética para la detección correcta de los mejores animales (Wiggans y Gengler, 2002).

El propósito principal de las evaluaciones genéticas consiste en predecir el valor genético de los animales, a partir de un conjunto de registros propios y de sus parientes, eliminando los efectos ambientales de cada animal a evaluar (Ravagnolo *et al.*, 2004).

La información correcta en el pedigrí es importante para el éxito de los programas de mejoramiento genético y su importancia ha aumentado con la introducción en 1990 del modelo animal para realizar evaluaciones genéticas (Ron *et al.*, 2003). Visscher *et al.* (2002) indican que los errores en el pedigrí afectan la estimación de los parámetros genéticos en la población, y esto a su vez puede alterar la tasa de consanguinidad.

2.2 Marcadores moleculares

En las décadas más recientes se ha utilizado el término marcador para designar a un carácter o gen que debido a ligamiento permite identificar otro gen; su importancia reside en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar los que son de interés para el hombre; algunas veces, la selección con ayuda de marcadores puede realizarse antes de que los organismos expresen la característica de interés.

Hay dos tipos de marcadores, los morfológicos y los moleculares (Solís y Andrade, 2005). Los marcadores moleculares pueden ser cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características

fenotípicas), que además se pueden detectar fácilmente (Valadez y Kahl, 2000). Este tipo de marcadores pueden ser evaluados con base en muestras de DNA de los individuos, cualquiera que sea su estadio de desarrollo. Los marcadores moleculares se pueden dividir en dos clases, los bioquímicos y los de DNA. Entre los bioquímicos se encuentran proteínas como algunas isoenzimas o aloenzimas y forman parte de la primera generación de marcadores moleculares; los marcadores de DNA son catalogados como la nueva generación de marcadores moleculares (Solís y Andrade, 2005).

Algunos marcadores moleculares que utilizan DNA se basan en la clonación y secuenciación de fragmentos de DNA, mientras que otros, se basan en la detección de polimorfismo al azar (Dodgson *et al.*, 1997). Estos marcadores deben tener una serie de características que permitan maximizar su utilidad, tales como, buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Cheng y Crittenden, 1994).

2.3 Utilización de marcadores moleculares

Los marcadores bioquímicos se han utilizado para medir variabilidad genética y mapas genéticos (Azofeita-Delgado, 2006), mientras que los marcadores moleculares de DNA se han utilizado para realizar análisis de genética poblacional, construir mapas genéticos, determinación de genes importantes, medición del polimorfismo del DNA que han permitido mapeos, manipulación y clonación de genes asociados con características biológicas de interés (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). En bovinos los marcadores se han utilizado para medir variabilidad genética, relaciones entre razas (Maudet *et al.*, 2002), identificación de parientes y verificación de paternidad (Dodds *et al.*, 2005; Stevanovic *et al.*, 2010), y huellas de DNA (Ajmone-Marsan *et al.*, 1997).

2.4 Tipos de marcadores moleculares

En el Cuadro 1 se presentan las características y particularidades de los principales marcadores de DNA utilizados en genética molecular. Valadez y Kahl (2000) mencionaron que existen varias técnicas para identificar los marcadores y se agrupan en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de DNA con la hibridación tipo Southern. La hibridación consiste en la formación de una molécula de doble cadena mediante el pareamiento o unión de bases complementarias a la cadena líder. La PCR es una técnica que se basa en que las moléculas de DNA desnaturalizantes migran a través de un gel no desnaturalizante de poliacrilamida de acuerdo con su tamaño y su secuencia (Barroso *et al.*, 1998; Van Marle- Köster y Nel, 2003).

La PCR consiste en la amplificación exponencial de un segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) específico, mediante el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos o iniciadores (primers) que se hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de DNA. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos de temperatura que consisten en la desnaturalización del DNA molde, seguida de la hibridación de los primers con el molde y la posterior síntesis del DNA complementario mediante la acción de la enzima DNA polimerasa, extraída del microorganismo *Thermophilus aquaticus* (Taq DNA polimerasa). Lo anterior permite la síntesis de DNA a temperaturas mayores que 70 °C y es estable a los 94-95 °C, lo cual es necesario para separar las dos cadenas de DNA (Figura 1).

Por tanto, dos fragmentos de DNA producto de la PCR que difieren en un punto de mutación mostrarán un desplazamiento diferente en una placa de gel cargada eléctricamente, siendo ésta la base para la determinación de los polimorfismos en los loci.

Cuadro 1. Principales marcadores moleculares utilizados en genética molecular.

Tipo de marcador	Principal uso	Requerimientos	Características
Polimorfismo de base única (SNP)	Mapas genéticos	DNA clonado y secuencias de DNA	Este tipo de marcador se diferencia en una simple posición nucleotídica, tales como sustitución, delección o inserción de un solo nucleótido. Su máxima heterocigosidad es 50%
Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	Mapas genéticos	DNA clonado	Consiste en visualizar las diferencias a nivel de la estructura del DNA en sitios donde hay una secuencia específica de nucleótidos. Requiere el uso de geles de electroforesis que permitan separar fragmentos de diferentes tamaños
Minisatélites o VNTR número de secuencias de tamaño variable (VNTR)	Huellas digitales	Secuencias repetitivas y pruebas de hibridación	Son marcadores polimórficos que tienen altas tasas de heterocigosis en las poblaciones
Microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR)	Pruebas de paternidad, identificación de individuos, mapas genéticos, genómica comparativa, estudios de genética poblacional, asignación de individuos a una raza	DNA clonado y secuencias de DNA	Detección de fragmentos específicos de DNA y da la medida de los alelos en pares de bases en cada una de las regiones, son fáciles de medir y analizar, son muy confiables, repetitivos y automatizables
Polimorfismo amplificado aleatoriamente (RAPD)	Huellas digitales	Oligonucleótidos cortos aleatorios	Tiene baja repetibilidad de los análisis, se subestima la cantidad de polimorfismo existente

Dodgson *et al.*, 1997; Arangueren-Méndez *et al.*, 2005.

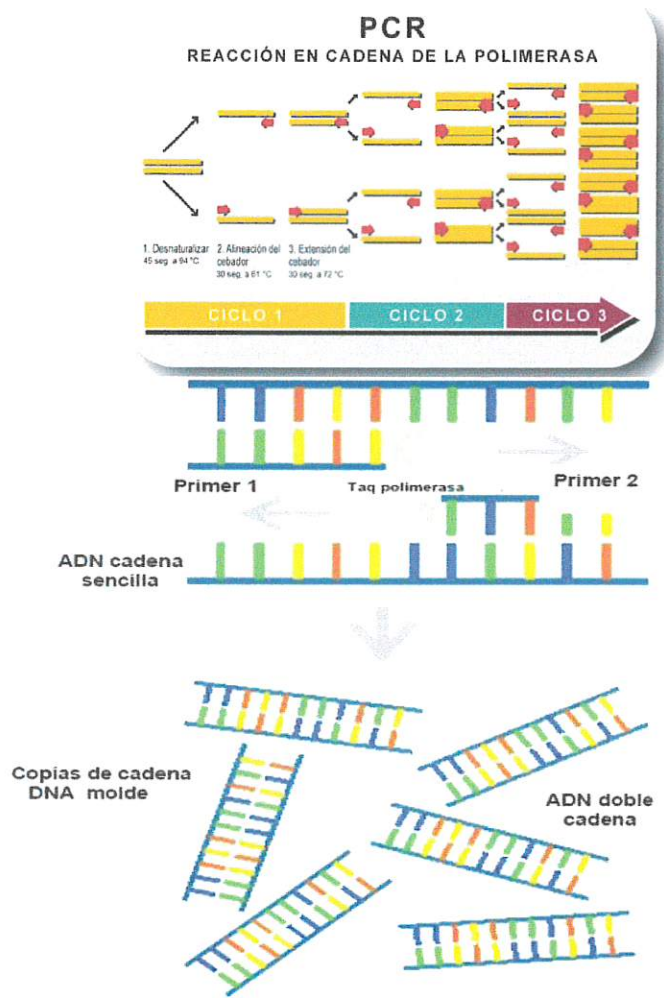


Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que será amplificada, los primers, el buffer y la enzima Taq polimerasa. En el primer ciclo de PCR resultan dos copias de la cadena de DNA molde.

La hibridación tipo Southern examina las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de DNA, ocasionada por la restricción del genoma mediada una enzima endonucleasa; los marcadores que utilizan esta técnica son polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y los minisatélites o número de secuencias de tamaño variable (VNTR). La técnica de PCR se utiliza para sintetizar fragmentos *in vitro* específicos de DNA, es decir, que se utiliza para aumentar de forma logarítmica y controlada el DNA, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo que se

estudia; los principales marcadores que utilizan esta técnica son DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), ISSR (Inter Sequence Simple Repeats), DAF (DNA Amplification Fragment), secuencias repetidas cortas (SSR) o microsatélites, entre otras (Valadez y Kahl, 2000; Van Marle- Köster y Nel, 2003).

2.5 El grupo sanguíneo y polimorfismo de proteína

Inicialmente, la verificación de pedigrí en ganado lechero se hacía usando los grupos sanguíneos y polimorfismo de proteína (Stormont, 1967; Adamov *et al.*, 2011). Aunque el método está estandarizado a nivel internacional y ha funcionado bien, tiene algunos inconvenientes. El número de loci utilizados dan una precisión relativamente baja y no siempre se puede excluir al padre putativo, aun cuando el supuesto padre no es el padre real; adicionalmente, el tipo de sangre no se puede hacer de forma retrospectiva, por ejemplo, después de que el semental ha muerto (Visscher *et al.*, 2002). Además, Adamov *et al.* (2011) mencionan que la utilización de grupo sanguíneo para pruebas de paternidad es cuestionable, debido a la limitada variabilidad del grupo sanguíneo en algunas poblaciones de ganado.

2.6 Marcadores moleculares utilizados para pruebas de paternidad en bovinos

En un inicio las pruebas de paternidad se realizaban utilizando el grupo sanguíneo y polimorfismo de proteínas; actualmente estas técnicas están en desuso y las pruebas se realizan auxiliándose en marcadores moleculares, específicamente microsatélites.

Visscher *et al.* (2002) mencionaron que los marcadores basados en DNA se están convirtiendo en el sistema estándar internacional de verificación de paternidad. Existen diferentes marcadores moleculares utilizados en la ganadería y la elección de uno u otro dependerá del objetivo del trabajo y el equipo con el que se cuente.

Actualmente, cualquier muestra biológica de un individuo (por ejemplo, sangre, pelo, semen, leche, hueso, etc.) puede ser utilizada para realizar pruebas de paternidad o cualquier otro objetivo que necesite el uso de marcadores moleculares, siempre y cuando contenga DNA. Por lo que la técnica de muestreo puede ser no invasiva y retrospectiva a partir de tejido almacenado y conservado (Weller *et al.*, 2004).

2.6.1 Microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como STRs (short tandem repeat), SSR (simple sequences repeats), SSLP (simple sequence length polymorphisms), son los principales tipos de marcadores utilizados para pruebas de paternidad, principalmente a causa de su facilidad de uso y a que los análisis son altamente reproducibles, por lo que su confiabilidad es alta (Adamov *et al.*, 2011). Los microsatélites son secuencias repetidas de DNA relativamente cortas, de una a seis pares de bases (pb), que pueden ocurrir como combinación de diferentes tipos de repeticiones (N) como por ejemplo $(GTAC)_N(GT)_N$; presentan variación altamente polimórfica, es decir, están presentes varios alelos por locus y tienen herencia codominante (Figura 2).

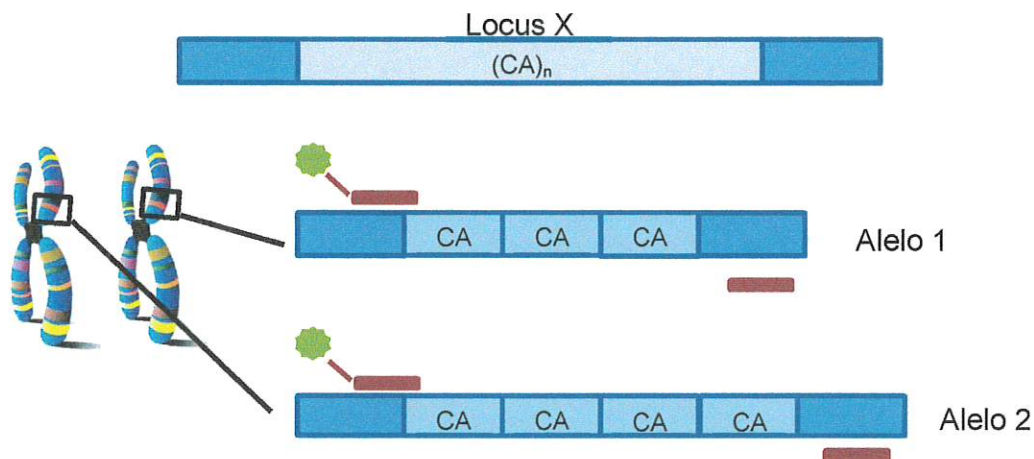


Figura 2. Microsatélite de dos pares de bases repetidas con tres y cuatro repeticiones en tándem.

Los SSR son útiles debido a que son abundantes, reproducibles, son fáciles de analizar con PCR, se distribuyen por todo el genoma (Dodgson *et al.*, 1997;

Bennett, 2000; Van Marle- Köster y Nel, 2003; Ellegren, 2004; Adamov *et al.*, 2011; Jakhesara *et al.*, 2012) y se encuentran en los intrones que son regiones no codificadoras del genoma (Adamov *et al.*, 2011). Se han utilizado para pruebas de paternidad, identificación de individuos, mapas genéticos, estudios de genética poblacional, genómica comparativa, y asignación de individuos a una raza (Dodgson *et al.*, 1997; Van Marle- Köster y Nel, 2003; Arangueren-Méndez *et al.*, 2005). En el Cuadro 2 se presenta una lista de los marcadores microsatélites que han sido utilizados con mayor frecuencia en diferentes estudios de paternidad en bovinos.

Cuadro 2. Principales marcadores microsatélites y las razas de bovinos en las cuales se han utilizado para estudios de paternidad.

Marcador	Cromosoma	Raza ^z (No de alelos)	Referencia ^y
D2S26	2	C (7), B (14)	3, 4, 7
HEL5	21	B (11)	4, 7
INRA23	3	C (10), B (10), E(10), H (9), S (11)	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
INRA37	10	C (6), B (12)	3, 4, 7
TGLA53	16	C (8), B (13), E(13), S (14)	3, 4, 5, 7, 8, 9
D15	15	B (11,12)	4, 7
TGL126	20	G (4), C (4), B (11), E(7), H (6), S (6)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
INRA040	2	B (22,23)	4, 7
BM6444	2	B (7,8)	4, 7
TGLA227	18	A (6), D (14), E (10), H (13), S (11)	2, 5, 6, 8, 9
BM2113	2	A (12), D (18), E(10), H (12), S (9)	2, 5, 6, 8, 9
ETH10	5	G (3), A (5), D (18), C (2), E(7), H (9), S (7)	1, 2, 3, 5, 6, 8, 9
SPS115	15	G (5), A (11), D (17), H (8), S (6), E(7)	1, 2, 5, 6, 8, 9
TGLA122	21	G (12), A (10), D (14), H (14), S (9), E(9)	1, 2, 5, 6, 8, 9
ETH3	19	G (4), A (4), D (17), H (7), S (6)	1, 2, 5, 6, 8
ETH225	9	G (4), A (8), D (21), H (8), S (6), E(7)	1, 2, 5, 6, 8, 9
BM1824	1	G (4), A (9), D (10), H (8), S (6), E(6)	1, 2, 5, 6, 8, 9
D1S34	x	C (4)	3
TGL44	x	C (10)	3
TGL431	x	C (9)	3

^z A = Brahman, Br = Braford, C = Charolais, D = Brangus, E = Boran, G = Gyr, H = Holstein, S = Simmental, BG = Brahman y Gyr.

^y 1 = Curi y López, 2002, 2 = Riojas *et al.*, 2006, 3 = Sifuentes *et al.*, 2006, 4 = Arellano *et al.*, 2007, 5 = Hernández *et al.*, 2009, 6 = Ozkan *et al.*, 2009, 7 = Arellano-Vera *et al.*, 2010, 8 = Stevanovic *et al.*, 2010, 9 = Kios *et al.*, 2012.

^x no reportado.

Cuando se realizan pruebas de paternidad con un panel de x número de marcadores, uno de los resultados es la probabilidad de exclusión, que es aquella en la que un supuesto padre es excluido como progenitor potencial, suponiendo que el supuesto padre fue elegido al azar. La probabilidad de exclusión combinada de todos los microsatélites utilizados en el análisis se utiliza para asignar al padre más probable, e indica el grado de confiabilidad de los resultados, el cual oscila entre 0.90 y 0.9999. En el Cuadro 3 se muestra una revisión de las probabilidades de exclusión que se han utilizado en diferentes estudios.

Cuadro 3. Probabilidad de exclusión combinada (CPE) utilizada para determinar paternidad en diferentes razas de bovinos.

Raza	CPE	Referencia
Holstein	>0.998	Heyen <i>et al.</i> , 1997
Holstein, Belgian Blue y Belgian Red Pied	>0.999	Peelman <i>et al.</i> , 1998
Gyr	0.978	Curi y Lopes, 2002
Holstein	0.90 a 0.99	Weller <i>et al.</i> , 2004
Brahman	0.996	Riojas <i>et al.</i> , 2006
Brangus	0.999	Riojas <i>et al.</i> , 2006
Holstein	0.999	Řehout <i>et al.</i> , 2006
Nelore	>0.998	Cervini <i>et al.</i> , 2006
Braford	>0.998	Arellano <i>et al.</i> , 2007
Limousin	>0.999	Carolino <i>et al.</i> , 2009
Petra	>0.999	Carolino <i>et al.</i> , 2009
Holstein	0.999	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Senepol	>0.999	Sepúlveda <i>et al.</i> , 2012
Boran	>0.999	Kios <i>et al.</i> , 2012

En cuanto al número de marcadores microsatélites que pueden ser utilizados, Weller *et al.* (2004) indicaron que un promedio de 2.5 marcadores son necesarios para obtener una probabilidad de exclusión de 90% y 5.3 marcadores para obtener una probabilidad de 99%. Zhang *et al.* (2010) señalaron que la probabilidad de identidad, es decir, la probabilidad que dos animales compartan un genotipo en común por casualidad es 6.34×10^{-11} y 1.52×10^{-6} para 10 y 17 marcadores, respectivamente; mientras que la probabilidad de que dos hermanos completos tengan genotipos idénticos con

excepción de gemelos idénticos es 1.04×10^{-4} y 4.68×10^{-7} para 10 y 17 marcadores, respectivamente.

En el Cuadro 4 se presentan resultados de estimaciones de parámetros de diversidad genética obtenidos con marcadores microsatélites utilizados para pruebas de paternidad en bovinos; los más sobresalientes para los diferentes indicadores son: INRA23, D15, INRA040, TGL126, TGL53, D2S26, Y HEL57.

Cuadro 4. Estimaciones de parámetros de diversidad genética con microsatélites utilizados en bovinos.

Marcador	Ho ^z	He ^y	PIC ^x	PE2 ^w
D2S26	0.620	0.825	0.800-0.808	0.484-0.744
HEL5	0.609	0.848	0.825	0.525
INRA23	0.774-0.800	0.796-0.889	0.590-0.860	0.472-0.809
INRA37	0.693-0.778	0.819	0.68-0.794	0.473
TGLA53	0.421-0.656	0.840-0.893	0.815-0.88	0.393-0.796
D15	0.802	0.886	0.869	0.610
TGL126	0.667-0.831	0.654 - 0.832	0.447-0.807	0.304-0.617
INRA040	0.856	0.940	0.931	0.766
BM6444	0.560	0.666	0.611	0.243
TGLA227	0.733-0.859	0.851-0.857	0.820-0.840	0.552
BM2113	0.607-0.814	0.803-0.817	0.770-0.800	0.333
ETH10	0.522-0.833	0.557-0.798	0.483-0.760	0.246-0.340
SPS115	0.654-0.719	0.656-0.678	0.452-0.620	0.311-0.485
TGLA122	0.452-0.825	0.728-0.829	0.589-0.810	0.175-0.432
ETH3	0.712-0.742	0.672-0.793	0.416-0.750	0.277-0.424
ETH225	0.581-0.673	0.645-0.726	0.306-0.680	0.188-0.230
BM1824	0.710-0.769	0.747-0.760	0.396-0.700	0.260-0.472

Ho^z = heterocigosidad observada, He^y = heterocigosidad esperada, PIC^x = contenido de información polimórfica, PE2^w = probabilidad de exclusión para cada locus.

Fuente: Arellano-Vera *et al.*, 2010, Stevanovic *et al.*, 2010, Ozkan *et al.*, 2009, Curi y López, 2002.

En el Cuadro 5 se muestran los marcadores microsatélites recomendados por la la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y la FAO, exclusivamente para bovinos.

Cuadro 5. Relación de microsatélites utilizados para su amplificación en caracterización molecular de bovinos.

Nombre	Cromosoma	Iniciadores (Forward/Reverse)	Tamaño (Pb)
INRA063	18	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC/ AAACCACAGAAATGCTTGAAG	167-189
INRA005	12	CAATCTGCATGAAGTATAAATAT CTTCAGGCATACCCTACACC	135-149
ILSTS005	10	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC	176-194
HEL5	21	GCAGGATCACTTGTTAGGGA AGACGTTAGTGTACATTAAAC	145-171
HEL1	15	CAACAGCTATTTAACAAGGA AGGCTACAGTCCATGGGATT	99-119
INRA035	16	TTGTGCTTTATGACACTATCCG ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG	100-124
ETH152	5	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	181-211
HEL9	8	CCCATTTCAGTCTTCAGAGGT CACATCCATGTTCTCACCAC	141-173
CSSM66	14	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	171-209
INRA032	11	AAACTGTATTCTCTAATAGCTAC GCAAGACATATCTCCATTCTTT	160-204
HEL13	11	TAAGGACTTGAGATAAGGAG CCATCTACCTCCATCTTAAC	178-200
INRA037	10	GATCCTGCTTATATTTAACCAC AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	112-148
BM1818	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	248-278
ILSTS006	7	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG ACACGGAAGCGATCTAAACG	277-309
MM12	9	CAAGACAGGTGTTTCAATCT ATCGACTCTGGGGATGATGT	101-145
CSRM60	10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	79-115
ETH185	17	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	214-246
HAUT24	22	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT AATACACTTTAGGAGAAAAATA	104-158

Cuadro 5. Continuación ...

Nombre	Cromosoma	Iniciadores (Forward/Reverse)	Tamaño (Pb)
HAUT27	26	AACTGCTGAAATCTCCATCTTA TTTTATGTTTCATTTTTTGAAGTGG	120-158
ETH10	5	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	207-231
ETH3	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	103-133
BM2113	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	122-156
BM1824	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	176-197
TGLA227	18	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	75-105
TGLA126	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	115-131
TGLA53	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	143-191
SPS115	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	234-258
ETH225	9	GATCACCTTGCCACTATTTCTT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	131-159
TGLA122	21	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	136-184
INRA023	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTAGATGAAGTC	195-225

Fuente: FAO, 2011.

2.6.2 Polimorfismo de base única (SNP)

Recientemente el tipo de marcador SNP (Single Nucleotide Polymorphism) está ganando popularidad debido a su alto rendimiento en análisis automatizados y su estabilidad genética en los mamíferos (Heaton *et al.*, 2005; Adamov *et al.*, 2011).

Las principales características de los SNP es que son polimórficos en una sola base (Heaton *et al.*, 2002), abundan en el genoma (Heaton *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2004), ocurren aproximadamente cada 300 pb en regiones codificantes y no codificantes, la frecuencia mínima de uno de los alelos es de 1%, tienen polimorfismos estables (Heaton *et al.*, 2005), baja tasa de mutación y la gran mayoría son neutros.

Werner *et al.* (2004) propusieron el uso de un set de 37 SNPs en lugar de microsatélites, para el control de identidad y pruebas de paternidad de bovinos Holstein, Fleckvieh y Suizo Europeo, encontrando probabilidades de exclusión mayores que 0.9999 en pruebas de paternidad. Heaton *et al.* (2002) utilizaron un set de 32 SNPs para la identificación individual y pruebas de paternidad, y encontraron que la probabilidad de que dos animales compartan el mismo genotipo para los 32 SNPs es 2.0×10^{-13} para múltiples razas y poblaciones compuestas, mientras que 1.9×10^{-10} para la raza Angus; la probabilidad de exclusión varió de 99.4 a 99.9%. Si se toma en cuenta que los SNPs son bialélicos, Morin *et al.* (2004) en una revisión predijeron que se necesitaban al menos dos a seis veces más SNPs para lograr la misma resolución que los microsatélites, cuando se utilizan para identificación humana y pruebas de paternidad.

2.7 Factores que pueden disminuir la sensibilidad de los marcadores microsatélites

Existen factores que pueden disminuir la sensibilidad de los marcadores microsatélites o generar un error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Los principales factores son mutación, alelos nulos y homoplasia.

2.7.1 Mutación

Las mutaciones son alteraciones del material genético y en ellas se incluyen desde simples sustituciones de un solo nucleótido, hasta las deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). El entendimiento del proceso de mutación de los microsatélites es esencial antes de inferir las relaciones existentes entre las variaciones observadas y la distancia genética o la estructura de una población. Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, presentan un patrón de mutación en el que están involucradas una simple unidad de repetición (Weber y Wong, 1993). Las tasas de mutación de microsatélites en ovejas es $1.1 \pm 0.5 \times 10^{-4}$ (Crawford y Cuthbertson, 1996).

2.7.2 Alelos nulos

Se habla de alelos nulos cuando éstos no pueden ser ampliados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del cebador; uno de los alelos no amplifica y por lo tanto es catalogado como homocigoto (Callen *et al.*, 1993; Dawson *et al.*, 1997; Holm *et al.*, 2001; Dakin y Avise, 2004; Adamov *et al.*, 2011).

Bello (2002) menciona que la existencia de alelos nulos es difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja. En caso de identificación de paternidad, es posible sospechar la presencia de alelos nulos cuando todos los marcadores apuntan a un progenitor homocigoto para el marcador excluyente y que el descendiente sea también homocigoto para ese marcador (Bello 2002; Jiménez-Gamero *et al.*, 2006). Dakin y Avise (2004), Weller *et al.* (2004) y Adamov *et al.* (2011) reportaron que si un alelo falla al momento de ser amplificado, el individuo que se está analizando aparece como un homocigoto para este marcador, aun cuando en realidad sea un heterocigoto. Cuando se analiza un alelo nulo la progenie de un toro heterocigoto aparecerá como homocigoto para el alelo materno, si el alelo materno es diferente a la del padre analizado, y ningún alelo común se observará entre el padre y la progenie, por lo que la paternidad será rechazada erróneamente (Adamov *et al.*, 2011). En pruebas de paternidad un alelo nulo no detectado puede tener serias consecuencias, ya que puede causar rechazo de un padre que está asignado correctamente y además desviar las estimaciones de frecuencias alélicas en poblaciones (Holm *et al.*, 2001; Dakin y Avise, 2004; Bello, 2002).

Callen *et al.* (1993) indicaron que se puede sospechar de la presencia de un alelo nulo de una población homogénea, cuando la frecuencia de la heterocigosidad observada es marcadamente inferior a la heterocigosidad esperada. Por otro lado, Weller *et al.* (2004) declararon a un semental heterocigoto para alelos nulos si los siguientes tres criterios se cumplían: 1) el padre se observó aparentemente homocigoto para el microsatélite; 2) no hubo predominio o superioridad de la progenie observada del padre en comparación

con la frecuencia esperada por equilibrio Hardy-Weinberg estimada a partir de la frecuencias alélica observada; y 3) más de 10% de los registros de la progenie fueron homocigotos para los alelos, aparte de lo observado en el alelo del padre putativo. Siguiendo los criterios anteriores de 104 marcadores que se utilizaron para la genotipificación, sólo se encontraron tres marcadores con alelos nulos y fueron CSSM41, IDVGA43, y IDVGA48.

2.7.3 Homoplasia

Homoplasia fue referido por los evolucionistas para referirse a que un mismo carácter que se presenta en dos especies, no siempre ha derivado del mismo carácter ancestral. A nivel de marcadores genéticos se dice que dos alelos son homoplásicos cuando poseen un estado idéntico aunque no sea por descendencia (Estoup *et al.*, 2002).

Este tipo de polimorfismo se puede detectar únicamente por secuenciación y puede pasar inadvertido, en caso de realizar el análisis de los individuos mediante amplificación por PCR y electroforesis para determinar tamaños de las bandas de DNA. La homoplasia en las pruebas de paternidad puede hacer que se asigne una relación de parentesco cuando no existe o viceversa. También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo; por ejemplo, los alelos interrumpidos $(CA)_2AA(CA)_{12}$ o compuestos $(GT)_2(TG)_{14}$ conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz y Shlötterer, 1994)

2.8 Factores que causan errores de paternidad

Las causas de los errores de paternidad son diversas y éstos pueden ser detectados mediante la utilización de marcadores y técnicas moleculares. Christense *et al.* (1982), Weller *et al.* (2004), Oliehoek y Bijma (2009) indicaron que las causas de los errores de paternidad pueden ser las siguientes: 1) empadres múltiples; 2) identificación errónea de los padres; 3) intercambio de

terneros al nacer; 4) errores cuando se registran los datos genealógicos en el libro; 5) errores de las empresas encargadas de realizar inseminación artificial o de las empresas que etiquetan el semen; 6) errores de los técnicos inseminadores por la identificación incorrecta de las pajillas de semen; 7) inseminación de vacas gestantes por una inseminación anterior, es decir, que ya estaba preñada cuando se realizó la inseminación; 8) uso de monta natural en vacas que ya han sido inseminadas, dando por hecho que el padre del producto es el de la inseminación artificial; y 9) errores del laboratorio en el que se analiza la paternidad, que dan resultados en los que se rechazan la paternidad de vacas con identificación correcta de paternidad. Kios *et al.* (2012) indicaron que también pueden existir errores al realizar la agrupación de terneros al nacer o por la identificación incorrecta de las madres y las crías al momento de extraer las muestras de sangre.

Weller *et al.* (2004) señalaron que máximo 20% de los errores de paternidad podría explicarse por el registro de varias inseminaciones con diferentes toros. Estos autores indicaron que en promedio 8.3% de los errores de paternidad puede ser explicado debido al personal encargado de las inseminaciones; en su estudio realizado con dos grupos de inseminadores (n=5 inseminadores con errores de paternidad alto y n=5 inseminadores con errores de paternidad bajo) se observó que la proporción de paternidad rechazada en este caso osciló entre 27 y 82% para los cinco inseminadores con los errores de paternidad más altos, mientras que para los cinco inseminadores con menor error de paternidad, la proporción de paternidad rechazada osciló entre 2 y 4.5%.

Visscher *et al.* (2002) mencionaron que para una empresa que es proveedora de servicios de verificación de paternidad, es peor declarar una exclusión de paternidad (no paternidad) cuando esto es falso, que no declarar una exclusión en un caso de no paternidad. Declarar una no paternidad cuando un solo marcador muestra la exclusión podría incrementar la tasa de detección de errores de pedigrí, pero podría también incrementar la tasa de falsos positivos.

Estos problemas pueden ser resueltos fácilmente incrementando el número de marcadores en pruebas de paternidad.

2.9 Resultados de pruebas de paternidad con marcadores microsatélites en bovinos

En el Cuadro 6 se muestran los errores de paternidad que se han encontrado en diferentes partes del mundo; la tasa de error de paternidad varió entre 3 y 55%, dependiendo principalmente del sistema de empadre (múltiple o controlado), siendo Israel el país en el que más estudios se han realizado; asimismo, los análisis se han realizado mayoritariamente en Holstein.

Cuadro 6. Errores de paternidad en bovinos estimados en diferentes partes del mundo.

Raza	Lugar	Porcentaje de error estimado	Animales analizados	Referencia
Ganado lechero Holstein	Holanda	9 al 12	10731	Bovenhuis and Van Arendonk (1991)
	Israel	5.2 en vacas 2.9 en toros	163 vacas 102 toros	Ron <i>et al.</i> , 1996
Gyr	Brasil	36	74 familias	Baron <i>et al.</i> , 2002
Gyr	Brasil	27.5	40 familias	Curi y Lopez 2002
Ganado lechero (Holstein)	Reino Unido	10	568	Visscher <i>et al.</i> , 2002
Ganado lechero Holstein	Nueva Zelanda	12 a 15	Diversos estudios	Spelman R. J. 2002
	Israel	6.25	244	Ron <i>et al.</i> , 2003
Ganado de carne	EUA	14.2	-	Sherman <i>et al.</i> , 2004
Holstein	Israel	11.7	6040	Weller <i>et al.</i> , 2004
Holstein	República Checa	10.73	510	Řehout <i>et al.</i> , 2006
Ganado lechero Charolais	Alemania	7	805	Sanders <i>et al.</i> , 2006
	México	24	183	Sinfuentes <i>et al.</i> , 2006
Ganado de carne Charolais, Limousin y Petra	Estados Unidos	12.2 en toros	625	Van Eenennaam <i>et al.</i> , 2007
	Portugal	2 en ambos padres, 7 en el padre y 14 con la madre	140 terneros	Carolino <i>et al.</i> , 2009
Holstein	Turkia	4.7	156	Ozkan <i>et al.</i> , 2009
Boran	Kenia	2.3 en vacas y 55.2 en el toro	87	Kios <i>et al.</i> , 2012

Por otra parte, se ha analizado el impacto que los errores de paternidad tienen en la tendencia genética, en el sesgo de la estimación de los parámetros y valores genéticos, y de la heredabilidad. Algunos autores como Banos *et al.* (2001) mencionaron que un error de 11% en los registros de paternidad disminuye entre 11 y 15% la tendencia genética en Estados Unidos para las características de leche, grasa y proteína; similarmente reduce de 8 a 9% la estimación de la desviación estándar de la habilidad de transmisión predicha del semental. Estos errores en la paternidad pueden disminuir el diferencial de selección de 0.07 a 0.09 unidades de desviación estándar, que corresponden a una disminución en aproximadamente 50 kg de leche, 3 kg de grasa y 1.7 kg de proteína del valor genético del semental.

Israel y Weller (2000) simularon una población de bovinos lecheros con heredabilidad de 0.25 y encontraron que 10% de errores en la paternidad causaron una disminución de 4.3% en la ganancia genética anual y 3.5% en la ganancia genética acumulada en 20 años; además, la estimación de la ganancia genética anual estuvo aproximadamente 6% por debajo, en comparación con la población de paternidad correcta. Visscher *et al.* (2002) predijeron que con una tasa de error de 10%, heredabilidad de 0.25 y tamaño de progenie de 50 animales por toro, se reduce la confiabilidad en 5% y el progreso genético en 3%, mientras que si el tamaño de progenie cambia a 100 animales por toro, la confiabilidad se reduce sólo 3% y el progreso genético en 2%.

Geldermann *et al.* (1986) observaron que con un error en los registros de 15%, la ganancia genética de grasa en leche se encontró entre 8.7 (con $h^2=0.5$) y 16.9% (con $h^2=0.2$) por debajo de los valores alcanzados sin error de identificación. Estos autores concluyeron que la pérdida en respuesta a la selección debe ser similar a la proporción de la progenie identificada erróneamente.

2.10 Verificación de la paternidad en diferentes especies

En el Cuadro 7 se observa que los errores genealógicos en especies diferentes que los bovinos son variables, y van de 2 a 28%. Los errores genealógicos más bajos se han reportado en equinos y los más elevados en aves. Sin embargo, estos valores dependen en gran medida de dos factores a) del tamaño de muestra analizada, y b) de contar con el DNA de los padres reales. Rodríguez *et al.* (2004) observaron un error de paternidad de 22% de las crías en una muestra de 18 alpacas; mientras que Bowling *et al.* (1997) reportaron un error de paternidad de 2% de las crías en una muestra de 4,803 caballos, lo que sugiere que la tasa de errores de paternidad pueden estar influida por el tamaño de muestra. Adicionalmente cuando no se cuenta con el DNA de los padres verdaderos no existe la posibilidad de asignarle la cría a los padres, generando así errores de paternidad elevados, como se presenta en el Cuadro 6 para el caso de los estudios con aves, peces y cocodrilos. De igual manera se observa que la verificación de la paternidad no sólo se ha realizado en animales domésticos.

Cuadro 7. Errores de paternidad estimados en diferentes especies con excepción de los bovinos.

Especie	Lugar	% de error estimado	Animales analizados	Referencia
Caballos		2	4803	Bowling <i>et al.</i> , 1997
Aves				
(<i>Phylloscopus trochilus</i>)	Gotland	28	68	Fridolfsson <i>et al.</i> , 1997
Ovejas		8.7 a 15.5	346	Barnett <i>et al.</i> , 1999
Cocodrilo	Australia	5.6	139	Isberg <i>et al.</i> , 2004
Alpacas	Perú	22	18	Rodríguez <i>et al.</i> , 2004
Cabras	España	16.2	388 hijos	Jiménez-Gamero <i>et al.</i> , 2006
Alpacas	Perú	15.5	329	Agapito <i>et al.</i> , 2008
Cabras	Brasil	10	292	Mello <i>et al.</i> , 2010
Perros	Francia	1 al 9	489	Leroy <i>et al.</i> , 2011
Ovinos	Francia	1 al 10	375	Leroy <i>et al.</i> , 2011
Búfalo	India	19	212	Jakhesara <i>et al.</i> , 2012
Peces	Singapur	3.2	2520	Liu <i>et al.</i> , 2012

El grado de confiabilidad de los resultados se mide por la probabilidad combinada de exclusión. En el Cuadro 8 se muestran los rangos de la probabilidad combinada de exclusión en diferentes especies y varían de 0.885 a 0.999, (lo que indica el nivel de confianza con el cual se realizaron las pruebas de paternidad). Cabe destacar que, aun cuando se utilicen los mismos microsatélites dentro de una misma raza, la información correspondiente a la probabilidad combinada de exclusión es variable (Luís *et al.*, 2002).

Cuadro 8. Probabilidad de exclusión combinada (CPE) utilizando microsatélites para determinar paternidad en especies diferentes a los bovinos.

Raza	Especie	CPE	Referencia
	Caballos	0.96 a 0.99	Marklund <i>et al.</i> , 1994
	Golondrina	0.999	Primmer <i>et al.</i> , 1995
	Caballos	0.999	Bowling <i>et al.</i> , 1997
Cashmere	Cabras	>0.999	Luikart <i>et al.</i> , 1999
Agora	Cabras	>0.999	Luikart <i>et al.</i> , 1999
Murcina-Granadina	Cabras	>0.999	Luikart <i>et al.</i> , 1999
Saanen	Cabras	>0.999	Luikart <i>et al.</i> , 1999
Lusitano	Caballos	0.996	Luís <i>et al.</i> , 2002
Sorraia	Caballos	0.885	Luís <i>et al.</i> , 2002
Garrano	Caballos	0.995	Luís <i>et al.</i> , 2002
	Cocodrilos	0.998	Isberg <i>et al.</i> , 2004
Murciano-Granadina	Cabras	>0.999	Martínez <i>et al.</i> , 2005
Alpina	Cabras	>0.999	Mello <i>et al.</i> , 2010
Saanen	Cabras	>0.988	Mello <i>et al.</i> , 2010
Santa Inés	Ovejas	>0.999	Souza <i>et al.</i> , 2012
Mehsana	Búfalos	0.993	Jakhesara <i>et al.</i> , 2012

La importancia de hacer las pruebas de paternidad radica en que los registros incorrectos de paternidad pueden causar sesgo en las evaluaciones genéticas e introducir errores en la estimación de la heredabilidad y de los valores genéticos (Jakhesara *et al.*, 2012).

2.11 Literatura citada

- Adamov N., L. Mickov, V. Petkov, and M. Adamov. 2011. Microsatellite markers for pedigree verification in cattle. *Macedonian Journal of Animal Science* 1: 9-15.
- Agapito, J., J. Rodríguez, P. Herrera-Velit, O. Timoteo, P. Rojas, and J. R. Espinoza. 2008. Parentage testing in Alpacas (*Vicugna Pacos*) Using

- semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers. *Animal Genetics* 39: 201-203.
- Ajmone-Marsan, P., A. Valentini, M. Cassandro, G. Vecchiotti-Antaldi, G. Bertoni, and M. Kuiper. 1997. AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 28: 418-426.
- Aranguren-Méndez, A. J., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de DNA por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13: 30-42.
- Arellano, W., A. Sifuentes, G. Parra, y R. Garcidueñas. 2007. Evaluación en ganado Braford de los marcadores microsatélites sugeridos por FAO/ISAG para pruebas de paternidad. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/genetica_seleccion_cruzamientos/bovinos_de_carne/29-Arellano-Microsatelites.pdf. Consultado el 5 de agosto del 2010.
- Arellano-Vera, W., A. M. Sifuentes-Rincon, R. Garcidueñas-Piña, y G. M. Parra-Bracamonte. 2010. Importancia de la verificación-asignación de progenitores en sistemas extensivos de pie de cría. *Revista Científica, FCV-LUZ* 20: 53-60.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-242.
- Banos, G., G. R. Wiggans, and R. L. Powell. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *Journal of Dairy Science* 84: 2523-2529.
- Barnett, N. L., L. W. Purvis, B. V. Hest, and I. R. Franklin. 1999. The accuracy of current dam pedigree recording strategies employed by stud Merino Breeders. *In: Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*. Mandurah, Western Australia, July 4-7, 13: 373-376.
- Baron, E. E., M. L. Martinez, R. S. Verneque, and L. L. Coutinho. 2002. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. *Genetics and Molecular Biology* 25: 389-394.
- Barroso, A., S. Dunner, and J. Cañón. 1998. Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science* 76: 1535-1538.

- Beechinor, J. G., and E. P. Kelly. 1987. Errors of identification amongst cattle presented as progeny of some bulls used in the artificial insemination service in Ireland. *Ireland Veterinary Journal* 41: 348-353.
- Bello P., N. 2001. Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Bellaterra, Barcelona. pp. 43. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3642/nbp1de4.pdf?sequence=1>. Consultado el 10 marzo del 2011.
- Bennett, P. 2000. Demystified...microsatellite. *Molecular Pathology* 53: 177-183.
- Bertrand, J. K., and G. R. Wiggans. 1998. Validation of data and review of results from genetic evaluation systems for US beef and dairy cattle. *In: Proceedings of the 6th World Congress of Genetics Applied Livestock Production* 27: 425-432.
- Bovenhuis, H., and J. A. M. Van Arendonk. 1991. Estimation of milk protein gene frequencies in crossbred cattle by maximum likelihood. *Journal of Dairy Science* 74: 2728- 2736.
- Bowling, A. T., M. L. Eggleston-Stott, G. Byrns, R. S. Clark, S. Dileanis, and E. Wictum. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics* 28: 247-252.
- Callen, D. F., A. D. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. I. Richards, J. C. Mulley, and G. R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *The American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Carolino, I., C. O. Sousa, S. Ferreira, N. Carolino, F. S. Silva, and L. T. Gama. 2009. Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 32: 306-311.
- Cervini M., F. Henrique-Silva, N. Mortari, and E. Matheucci. 2006. Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nellore cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology* 29: 486-490.
- Christense, L. G., P. Madsen, and J. Petersen. 1982. The influence of incorrect sire identification on the estimates of genetic parameters and breeding values. *In: Proc. 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid*, 7: 200-208.
- Cheng, H. H., and L. B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.

- Crawford, A. M., and R. P. Cuthbertson. 1996. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Research* 6: 876-879.
- Curi, A., and R. C. Lopes. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovine. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 3: 129-135.
- Dakin, E. E., and J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Dawson, R. J. G., H. L. Gibbs, K. A. Hobson, and S. M. Yezerinac. 1997. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79: 506-514.
- Dodds, K. G., M. L. Tate, and J. A. Sise. 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. *Journal of Animal Science* 83: 2271-2279.
- Dodgson, J. B., H. H. Cheng and R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76: 1108-1114.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Estoup, A., P. Jarret, and J. M. Cournet. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.
- FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. No. 9. Rome. 85 p.
- Fridolfsson, A. K., U. B. Gyllensten, and S. Jakobsson. 1997. Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. *Hereditas* 126: 127-132.
- Geldermann, H., U. Pieper, and W. E. Weber. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *Journal of Animal Science* 63: 1759-1768.
- Gomez-Raya, L., K. Priest, W. M. Rauw, M. Okomo-Adhiambo, D. Thain, B. Bruce, A. Rink, R. Torell, L. Grellman, R. Narayanan, and C. W. Beattie. 2008. The value of DNA paternity identification in beef cattle: Examples from Nevada's free-range ranches. *Journal of Animal Science* 86: 17-24.

- Henderson, C. R. 1976. A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in prediction of breeding values. *Biometrics* 32: 69-83.
- Hernández, E. C. M. Olivera, H. Ostos, y M. T. Guerra. 2009. Genetic variability of Zebu cattle breed (*Bos indicus*) in the department of Huila, Colombia using microsatellite molecular markers. *Acta Biológica Colombiana* 14: 173-180.
- Heaton, M. P., G. P. Harhay, G. L. Bennett, R. T. Stone, W. M. Grosse, E. Casas, J. W. Keele, T. P. L. Smith, C. G. Chitko-Mckown, and W. W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. Beef Cattle. *Mammalian Genome* 13: 272-281.
- Heaton, P. M., J. E. Keen, M. L. Clawson, G. P. Harhay, N. Bauer, C. Shultz, B. T. Green, L. Durso, C. G. Chitko-McKown, and W. W. Laegreid. 2005. Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing. *Journal of American Veterinary Medical Association* 226: 1311-1314.
- Heyen, D. W., J. E. Beever, Y. Da, R. E. Everts, C. Green, H. A. Lewin, S. R. E. Bates, and J. S. Ziegle. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Animal Genetics* 28: 21-27.
- Holm, L. E., V. Loeschcke, and C. Bendixen. 2001. Elucidation of the molecular basis of a null allele in a Rainbow Trout microsatellite. *Marine Biotechnology* 3: 555-560.
- Isberg, S. R., Y. Chen, S. G. Barker, and C. Moran. 2004. Analysis of microsatellites and parentage testing in Saltwater Crocodiles. *Journal of Heredity* 95: 445-449.
- Israel, C, and J. I. Weller. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science* 83: 181-187.
- Jakhesara, S. J., D. N. Rank, J. D. Kansara, R. C. Parikh, V. M. Patel, P. H. Vataliya, and J. V. Solanki. 2012. Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo. *Journal of Animal Science* 90: 4723-4728.
- Jamieson, A., and S. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400.
- Jiménez-Gamero, I., G. Dorado, A. Muñoz-Serrano, M. Analla, and A. Alonso-Moraga. 2006. DNA microsatellites to ascertain pedigree-recorded

- information in a selecting nucleus of Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* 65: 266-273.
- Kios, D., E. V Marle-Köster, and C. Visser. 2012. Application of DNA markers in parentage verification of Boran cattle in Kenya. *Tropical Animal Health and Production* 44: 471-476.
- Leroy, G., C. Danchin-Burge, I. Palhiere, R. Baumung, S. Fritz, J. C. Mériaux, and M. Gautier. 2011. An ABC estimate of pedigree error rate application in dog, sheep and cattle breeds. *Animal Genetics* 43: 309-314.
- Liu P, J. H. Xia, G. Lin, F. Sun, F Liu, H. S. Lim, H. Y. Pang, and G. H. Yue. 2012. Molecular parentage analysis is essential in breeding Asian seabass. *Plos One* 7: e51142.
- Luikart, G., M. P. Biju-Duval, O. Ertugrul, Y. Zagdsuren, C. Maudet, and P. Taberlet. 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplex for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics* 30: 431-438.
- Luís, C. E. Gus Cothran, and M. M. Oom. 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genetics and Molecular Biology* 25: 131-134.
- Marklund, S., H. Ellegren, S. Eriksson, K. Sandberg, and L. Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25: 19-23.
- Martínez, A. M., J. L. Vega-Pla, J. M. Lozano, M. P. Carrera, J. M. Acosta, y A. Cabello. 2005. Caracterización genética de la cabra Murciano-Granadina con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 54: 327-331.
- Maudet, C., G. Luikart, and P. Taberlet. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80: 942-950.
- Mello de A., A., S. E. Facioni G., C. Silva P., P. Savio L., M. Teixeira R., and T. M. Medeiros M. 2010. Paternity in Brazilian goats through the use of DNA microsatellites. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 1011-1014.
- Morin, P. A., G. Luikart, R. K. Wayne, and the SNP workshop group. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 208-216.
- Núñez D., R., R. Ramírez V., A. Ruíz F., y J. Domínguez V. 2004. Resumen de evaluaciones genéticas para ganado Jersey 2004. Chapingo, Méx. 44 p.

- Oliehoek P. A., and P. Bijama. 2009. Effects of pedigree errors on the efficiency of conservation decision. *Genetics Selection Evolution* 41: 9.
- Ozkan, E., M. I. Soysal, M. Ozder, E. Koban, O. Sahin, and I. Togan. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. *Livestock Science* 124: 101-106.
- Peelman, L. J., F. Mortiaux, A. Van Zeveren, A. Dansercoer, G. Mommens, F. Coopman, Y. Bouquet, A. Burny, R. Renaville, and D. Portetelle. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics* 29: 161-167.
- Primmer, C. R., A. P. Moller, and H. Ellegren. 1995. Resolving genetic relationship with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology* 4: 493-498.
- Ravangolo, O., G. Rovere, I. Aguilar, D. La Buonara, y D. Gimeno. 2004. Evaluación genética nacional raza Holando. Boletín Técnico. Asociación Rural de Uruguay. Instituto Nacional para el Mejoramiento Lechero. Sociedad de Criadores de Holando del Uruguay. Montevideo, Uruguay. 70 p.
- Riojas V., V. M., J. C. Gomez F., J. A. Salinas M., R. M De Oca. L., y A. Wong G. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *Ciencia UANL* 9: 41-50.
- Řehout, V., E. Hradecka, and J. Čítek. 2006. Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science* 51: 503-509.
- Rodríguez B. J., J. C. Wheeler, C. S. Dodd, M. W. Bruford, y R. Rosadio. 2004. Determinación de parentesco en Alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélites. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 15: 113-119.
- Ron, M., M. Blanc, E. Ezra, and J. I. Weller. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science* 79: 676-681.
- Ron, M. R. Domochofsky, M. Golik, E. Seroussi, E. Ezra, C. Shturman, and J. I. Weller. 2003. Analysis of vaginal swabs for paternity testing and marker-assisted selection in cattle. *Journal of Dairy Science* 86:1818-1820.
- Ruiz L., F. J., J. Moro M., y E. Castañeda G. 2000. Evaluaciones genéticas de ganado Holstein en México. *In: Memoria del Ciclo de Conferencias Sobre Evaluación, Comercialización y Mejoramiento Genético*. 31 de marzo al 4 de abril. Tuxtla Gutiérrez, Chis., México. pp: 86-97.

- Sanders, K., J. Bennewitz, and E. Kalm. 2006. Wrong and missing sire information affects genetic gain in the Angeln dairy cattle population. *Journal of Dairy Science* 89: 315–321.
- Senneke, S., L., M. D. Macneil, and L. D. Van Vleck. 2004. Effects of sire misidentification on estimates of genetic parameters for birth and weaning weights in Hereford cattle. *Journal of Animal Science* 82: 2307-2312.
- Sepúlveda, J. C., P. A. Ángel-Marín, A. Toro, J. D. Corrales, M. A. Moreno, and M. F. Cerón-Muñoz. 2012. Genetic variability of Senepol cattle in Columbia using molecular markers. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25: 183-190.
- Sherman, G. B., S. D. Kachman, L. L. Hungerford, G. P. Rupp, C. P. Fox, M. D. Brown, B. M. Feuz, and T. R. Holm. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measure of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Animal Genetics* 35: 220-226
- Sifuentes R., A. M.; G. M. Parra B., X. F. De la Rosa R., A. Sánchez V., F. Serrano M., y J. Rosales A. 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.
- Solis R. L Y., y A. Andrade T. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares>. Consultado el 13 de marzo del 2011.
- Souza C. A., S. R. Paiva, C. M. McManus, H. C. Azevedo, A. S. Mariante, and D. Grattapaglia. 2012. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Ines hair sheep in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 11: 1217-1229.
- Spelman, R. J. 2002. Utilisation of molecular information in dairy cattle breeding. *In*. *Proceedings of the 7 th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* 30: 11-17.
- Stevanovic, J., Z. Stanimirovic, V. Dimitrijevic, and M. Maletic. 2010. Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental Cattle). *Czech Journal of Animal Science* 55: 221-226.
- Stormont, C. 1967. Contribution of blood typing to dairy science progress. *Journal of Dairy Science* 50: 253-260.
- Tautz, D., and C. Shlötterer. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 832-837.

- Valadez, M. E., y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en Genoma de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorios). Mundi-Prensa México, S. A. de C.V, Universidad Autónoma Chapingo. 147 p.
- Van Marle- Köster E., and L. H. Nel. 2003. Genetic markers and their application in livestock breeding in South Africa: A review. *South African Journal of Animal Science* 33: 1-10.
- Visscher, P. M., J. A. Woolliams, D. Smith, and J. L. Williams. 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, J. L., and Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
- Weller, J. I., E. Feldmesser, M. Golik, I. Tager-Cohen, I. Domochofsky, O. Aluz, E. Ezra, and M. Ron. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein Population. *Journal of Dairy Science* 87: 2627-2640.
- Werner F. A. O., G. Durstewitz, F. A. Habermann, G. Thaller, W. Kramer. S. Kollers, J. Buitkamp, M. Georges, G. Brem, J. Mosner, and R. Fries. 2004. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics* 35: 44-49.
- Wiggans, G. R., and N. Gengler. 2002. Evaluation and Methods. *In: Genetic Selection. Ency. Dairy Sci.* Fox, P., and Fuquay, M. J. (ed.). Elsevier Science Ltd. Academic Press. London, UK. Vol. 2, pp: 1207-1212.
- Zhang, Y., Y. Wang., D. Sun., Y. Yu., and Y. Zhang. 2010. Validation of 17 microsatellite markers for parentage verification and identity test in Chinese Holstein cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 23: 425-429.

3 USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VERIFICAR LA GENEALOGÍA EN BOVINOS JERSEY¹

3.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia de 11 marcadores moleculares para verificar la genealogía de bovinos Jersey de hatos participantes en evaluaciones genéticas nacionales. Se utilizaron 73 muestras, 70 de sangre y tres de semen, de las cuales siete muestras eran de posibles padres, 32 de posibles madres y 34 de crías. El DNA de sangre se extrajo con el kit comercial DNAzol BD Reagent y el kit comercial Maxwell 16 LEV blood AS1010. La extracción de DNA del semen se realizó con la metodología descrita por Trommelen *et al.* (1993). Los microsatélites se amplificaron con el StockMarks para Cattle Bovine Genotyping Kit. Los microsatélites se verificaron por electroforesis y fueron secuenciados en el ABI PRISMA Genetic Analyzer 3130. Los resultados se leyeron e interpretaron con el software GeneMapper 4.0 y Cervus 3.0. La mejor eficiencia en la obtención de DNA de sangre se obtuvo con Maxwell 16. El porcentaje de amplificación fue mayor que 96% y se excluyeron tres muestras por que no cumplieron con la calidad de DNA. El panel de 11 microsatélites tuvo alto contenido de información polimórfica (0.66), con una probabilidad de exclusión combinada (CPE) cuando los genotipos del hijo y un progenitor son conocidos de 0.9917 y una CPE cuando los genotipos del hijo y los progenitores son conocidos de 0.9997; la media de alelos por locus fue 8.73, la frecuencia del alelo más común varió de 0.2929 a 0.8643. Adicionalmente se observó un rango de heterocigosidad esperada de 0.249 a 0.832 y de heterocigosidad observada de 0.186 a 0.812. En conclusión el panel de 11 marcadores microsatélites evaluados dan información suficiente para pruebas eficaces de paternidad en bovinos Jersey.

Palabras clave: Raza Jersey, Paternidad en bovinos, SSR, Análisis de fragmentos, PCR, DNA de Sangre.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Reyna Guadalupe Cuevas Pat
Directores: Rafael Núñez Domínguez y Ernestina Valadez Moctezuma

USE OF MOLECULAR MARKERS FOR PATERNITY TESTING IN JERSEY DAIRY CATTLE²

3.2 Abstract

This study aimed to determine the effectiveness of an 11 molecular marker panel to verify paternity in Jersey dairy cattle of farms participating in national genetic evaluations. Seventy three samples, 70 from blood and three from semen, were used. Seven of these were of putative sires, 32 of putative dams, and 34 of progeny. Commercial kits DNAzol BD Reagent and Maxwell 16 LEV blood AS1010 were used to extract DNA from blood samples. Extraction of DNA from semen was done using the methodology described by Trommelen *et al.* (1993). The microsatellites were amplified using StockMarks for Cattle Bovine Genotyping Kit. They were verified by electrophoresis and were sequenced using the ABI PRISMA Genetic Analyzer 3130. Results were read and analyzed using GeneMapper 4.0 and Cervus 3.0 software. The best efficiency to obtain DNA from blood samples was achieved with Maxwell 16. The amplification rate was 96%; three samples were discarded because of poor DNA quality. The 11 microsatellite panel had a high polymorphic information content (0.66), with a combined probability of exclusion (CPE) when genotypes of the calf plus one parent are known of 0.9917 and a CPE when genotypes of the calf plus the parents are known of 0.9997; average number of alleles per locus was 8.73, and frequency of the most common allele varied from 0.2929 to 0.8643. The expected heterozygosity ranged from 0.249 to 0.832, and observed heterozygosity from 0.186 to 0.812. It was concluded that the 11 microsatellite panel evaluated yields enough information to test paternity in Jersey dairy cattle.

Key words: Jersey dairy cattle, Paternity in bovine, SSR, Fragment length analysis, PCR, DNA from blood.

²Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Reyna Guadalupe Cuevas Pat
Advisors: Rafael Núñez Domínguez and Ernestina Valadez Moctezuma

3.3 Introducción

Uno de los propósitos de las evaluaciones genéticas es obtener la mejor predicción del valor genético de los animales y su respectiva exactitud, para la selección de futuros reproductores, con el fin de mejorar características de importancia económica. Las evaluaciones genéticas en bovinos Jersey se realizan en México desde 2004, utilizando las bases de datos de la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro, A. C. (Núñez *et al.*, 2004) Con base en estas evaluaciones, se proporciona a los criadores y productores comerciales de ganado una herramienta más confiable para la selección y utilización de animales reproductores.

El procedimiento que se utiliza para las evaluaciones genéticas es el del modelo animal, que consiste en obtener el mejor predictor lineal insesgado (BLUP, por sus siglas en inglés) del valor genético del animal, utilizando los registros de comportamiento y la matriz de relaciones genéticas aditivas entre los animales (Henderson, 1976). Su utilización requiere que las bases de datos genealógicas y de comportamiento productivo incluyan información completa y confiable, para asegurar una mejor predicción de los valores genéticos (Sifuentes *et al.*, 2006; Arellano *et al.*, 2007; Arellano-Vera *et al.*, 2010).

La existencia de errores de paternidad puede sesgar la estimación de los parámetros y valores genéticos, así como reducir la ganancia genética de la selección (Senneke *et al.*, 2004; Arellano-Vera *et al.*, 2010). Banos *et al.* (2001) estimaron que con 11% de errores de paternidad se reduce el progreso genético en aproximadamente 50 kg de leche, 3 kg de grasa y 1.7 kg de proteína, y disminuye de 11 a 15% la tendencia genética en características de leche en ganado bovino lechero en EE. UU. Por otra parte, Israel y Weller (2000) evaluaron mediante simulación el efecto de 10% de errores en paternidad en bovinos lecheros y observaron una disminución de 4.3% en el cambio genético anual.

Varios estudios han reportado errores en los registros de paternidad en México y otros países. Sifuentes *et al.* (2006), trabajando con bovinos Charolais en México, encontraron que la ausencia o identificación errónea de cualquiera de los individuos que forman una familia fue 24%; asimismo, reportaron una sobrestimación de la heredabilidad de hasta 47%, al comparar dos bases de datos, una considerando la paternidad simulada y la otra con la paternidad real. La magnitud de los errores de paternidad en otros países han sido de 5% en Israel (Ron *et al.*, 1996), entre 4 y 23% en Alemania (Geldermann *et al.*, 1986), 20% en Irlanda (Beechinor y Kelly, 1987) y 27.5% en Brasil (Curi y Lopes, 2002).

Las técnicas de genética molecular permiten realizar pruebas de paternidad con alto nivel de confiabilidad en ganado. Los marcadores de DNA tipo microsatélites y codominantes, son preferidos en pruebas de paternidad (Gomez-Raya *et al.*, 2008). La genotipificación de marcadores se hace en la progenie y los progenitores putativos; si para algún microsatélite el genotipo del semental no corresponde con el genotipo de la progenie, dicho semental es eliminado como progenitor. La información precisa del pedigrí permite obtener predicciones confiables del valor genético de los animales y por ende una mayor efectividad en el mejoramiento genético del ganado (Stevanovic *et al.*, 2010). Los marcadores microsatélites utilizados en una población pueden no ser los adecuados para otra población o para otra raza de la misma especie, ya que la eficacia de los paneles de marcadores depende del nivel de información que proporcione el número de alelos y su frecuencia en la población (Jamieson y Taylor, 1997; Arellano *et al.*, 2007). Es decir, aunque se ha usado el mismo panel de marcadores para verificar la paternidad en diferentes países y con diferentes razas, no significa que ese panel sea eficaz en la población de ganado Jersey existente en México.

Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de 11 marcadores moleculares en la verificación de genealogía de bovinos Jersey de hatos participantes en evaluaciones genéticas nacionales.

3.4 Materiales y métodos

Recolección y manejo de muestras

El estudio se llevó a cabo con 73 muestras de bovinos, 70 de sangre y tres de semen, siendo siete de posibles padres, 32 de posibles madres y 34 de crías, pertenecientes a miembros de la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro, A. C.

Los criterios de selección de los animales fueron: nacionalidad del semental y que el semental tuviera cinco crías nacidas entre 2003 y 2013. Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal utilizando tubos vacutainer con EDTA de 4 mL y se almacenaron a 4 °C para su análisis en los 7 días posteriores.

Extracción de DNA

El DNA de semen se extrajo según la metodología descrita por Trommele *et al.* (1993). La extracción de DNA de sangre se realizó con el kit comercial DNAzol® BD Reagent (Invitrogen) y el kit comercial Maxwell 16 LEV blood AS1010 (Promega). Para el DNAzol® BD se utilizó 0.5 mL de sangre total, la cual fue agregada en un tubo Eppendorf para microcentrífuga. Se adicionó 1 mL de DNAzol® BD para lisis y se mezcló vigorosamente. A continuación se añadieron 0.4 mL de isopropanol al lisado, posteriormente se le dio vortex o se agitó vigorosamente la mezcla y se dejó a temperatura ambiente por 5 min, y luego se sedimentó el DNA por centrifugación a 6,000 x g durante 6 min. Posteriormente se separó el sobrenadante y se le adicionó 0.5 mL de DNAzol® BD al sedimento de DNA, se le dio vortex hasta que el sedimento estuvo completamente disperso, luego se centrifugó la mezcla resultante a 6,000 x g por 5 min. Inmediatamente se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento de DNA con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 6,000 x g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se solubilizó el DNA con la adición de 200 µL de 8 EDTA y se dejó a temperatura ambiente durante 3 a 5 min con agitación

constante. El kit Maxwell 16 LEV Blood se utilizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para evaluar la calidad y cantidad del DNA se colocó 1 μL de cada muestra en un espectrofotómetro de ultrabajo volumen (Nanodrop 1000, Thermo Scientific), y se valoraron la concentración y absorbancia a 260/280 nm. Posteriormente se corroboró la calidad en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Finalmente todas las muestras se diluyeron a una concentración de 10 a 80 ng μL^{-1} y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amplificación por PCR

Se utilizó un kit "StockMarks for Cattle® Bovine Genotyping Kit" (Applied Biosystems Inc.) para amplificar los 11 loci de microsatélites (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824 y SPS115) que van en un rango de 75 a 265 pb. El kit contiene una mezcla de 22 primers (forward y reverse), un control de DNA (20 ng μL^{-1}), AmpliTaq Gold® DNA polimerasa (5 U μL^{-1}), mezcla de dNTPs y buffer para 100 animales, se prepararon las mezclas de reacción de acuerdo con las indicaciones de la empresa fabricante.

La amplificación de PCR se llevó en reacciones multiplex utilizando un volumen de 15 μL , conteniendo 3.0 μL del buffer de PCR StockMarks, 4 μL de la mezcla de dNTP, 0.5 μL de Taq ADN polimerasa, 5.5 μL de primer de amplificación, 1.0 μL de agua desionizada y 1.0 μL de DNA molde diluido en 10 a 80 ng μL^{-1} . La amplificación de DNA se realizó con el termociclador GeneAmp® PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA, con el siguiente programa de PCR: un ciclo inicial de 10 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de 31 ciclos de 45 seg a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 seg con 50% de velocidad de ramp a $61\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 seg con 80% de velocidad de ramp a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, una extensión final de 60 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un paso final de dos horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los productos de PCR fueron conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta realizar el análisis de PCR.

Análisis de fragmentos

Los microsatélites obtenidos por PCR, se verificaron por electroforesis capilar en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) utilizando 1.0 µL del producto de PCR, 11.5 µL de formamida para cada muestra y 0.5 µL de Size Standard 500 Rox, en placas de secuenciación de 96 pozos. Las reacciones fueron desnaturalizadas durante 2 min a 95 °C y después colocadas a congelación durante 3 min antes de ser llevadas al secuenciador. Las muestras corrieron a 1,500 V y a una temperatura de 60 °C durante 15 min. Se utilizó el polímero POP7™ como soporte de separación, el filtro F y la matriz DS-32 para la detección de los iniciadores en azul, verde y amarillo, marcados con las etiquetas fluorescentes FAM, JOE y NED, respectivamente. Los resultados se leyeron e interpretaron con el software GeneMapper®.

Análisis estadístico

A partir de la evaluación de los 11 marcadores para microsatélites se obtuvo: a) el número de alelos por locus en los loci amplificados y su valor medio; b) la heterocigosidad esperada y la observada en cada locus; c) el contenido de información polimórfica y su valor medio; y d) la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y un progenitor son conocidos (PE1) y la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y los progenitores son conocidos (PE2) y la probabilidad de exclusión de paternidad para cada locus, mediante el programa Cervus 3.0 (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007).

El número de alelos se determinó por conteo directo; la frecuencia alélica se obtuvo dividiendo el número de observaciones de cada alelo entre el número total de observaciones de todos los alelos. La heterocigosidad observada (la frecuencia de individuos heterocigotos observados y oscila entre 0 y 1) se calculó por cómputo directo; la heterocigosidad esperada es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes y se calculó de la siguiente forma:

$$He = 1 - \sum P_i^2$$

donde He es heterocigisidad esperada, P_i es la frecuencia del alelo i .

El contenido de información polimórfica (PIC) tiene valor máximo de 1 y mínimo de 0, y se obtuvo a partir de la siguiente ecuación (Botstein *et al.*, 1980).

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

Se calcularon dos probabilidades de exclusión, la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y un progenitor son conocidos (PE1) y la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y los progenitores son conocidos (PE2), mediante las ecuaciones propuestas por Jamienson y Taylor (1997):

$$PE1 = 1 - 4 \sum_{i=1}^n P_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n P_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n P_i^4$$

$$PE2 = 1 - 2 \sum_{i=1}^n P_i^2 + \sum_{i=1}^n P_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n P_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n P_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right)^2 + 3 \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n P_i^3 \right)$$

donde PE = probabilidad de exclusión del progenitor con el j -ésimo microsatélite, y n = número de alelos en el j -ésimo microsatélite.

La probabilidad combinada de exclusión se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$CPE = 1 - \left(\prod_{j=1}^k (1 - PE_j) \right)$$

donde CPE = probabilidad combinada de exclusión de paternidad del conjunto loci utilizados, y k = número total de loci de microsatélites utilizados.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Calidad y cantidad de DNA

Al realizar la extracción de DNA a partir de sangre total se observó que el DNAzol BD no cumplió con la cantidad y calidad mínima para llevar a cabo la PCR, mientras que con el Maxwell 16 se obtuvo DNA de calidad y cantidad adecuada, por lo que fue considerada la metodología más adecuada. Sin embargo, la utilización de esta metodología implica mayor costo (12%) por extracción de DNA.

Los resultados de calidad y cantidad de DNA de acuerdo con la edad de los animales se muestran en el Cuadro 9. Se observa que en animales de menor edad hay mayor rendimiento en calidad y cantidad de DNA, lo que concuerda con el estudio de Richardson *et al.* (2006) en el que personas mayores de 80 años tuvieron una reducción de 24% en la cantidad DNA comparada con el grupo de edad más joven. Los resultados en el rendimiento de DNA se explican debido al descenso progresivo de leucocitos conforme la edad incrementa (Erkeller-Yuksel *et al.*, 1992), ya que el DNA se extrae a partir de este tipo de células.

Cuadro 9. Cantidad y calidad de DNA extraído a partir de sangre con el kit comercial Maxwell 16, en animales menores y mayores de 2 años ($\bar{x} \pm DE$).

Grupo de edad	Número	Cantidad (ng μL^{-1})	Calidad (Abs 260/280)
> 2 años	43	39.72 $\pm$ 13.88 b	1.84 $\pm$ 0.09 a
< 2 años	21	81.58 $\pm$ 29.80 a	1.88 $\pm$ 0.05 a
Total	64	53.43 $\pm$ 28.31	1.86 $\pm$ 0.08

^{a,b}Medias sin una literal en común dentro de columna son diferentes ($p \leq 0.05$)

En la Figura 3 se presentan los resultados de la evaluación de calidad de DNA en geles de agarosa 1 %. En el gel se observa que en todos los carriles (pozos) hay una sola banda de alto peso molecular bien definida (algunas muestras están señaladas con flechas) que corresponde al DNA aislado de cada muestra; además se puede observar muy poco barrido debajo de ellas (el barrido indica

DNA fragmentado y entre menos barrido se observe en el gel, el DNA es de mejor calidad). En los extremos del gel se corrieron muestras del marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas), solamente con la finalidad de referencia para la posición de la banda del DNA extraído, ya que de ninguna manera es posible estimar el peso molecular real de esta forma, el cual oscila en el orden de megabases.

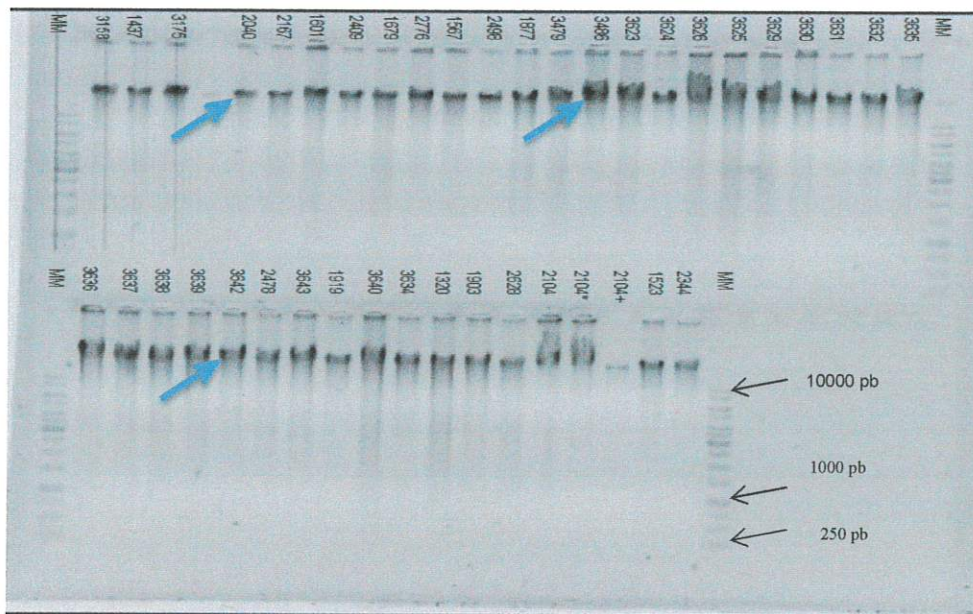


Figura 3. Calidad de DNA en geles de agarosa 1%, en el que se muestra el DNA de alto peso molecular (señalado con flechas azules). El marcador molecular utilizado fue el de 1 Kb de fermentas (250 a 10000 pb).

3.5.2 Parámetros de los marcadores de microsatélites usados para verificación de parentesco

En la Figura 4 se muestra el panel multiplex de fragmentos de marcadores (microsatélites) utilizados para determinación de la paternidad en bovinos; en el eje de las "y" se indica la intensidad de la señal (representada por valores) y el eje de las "x" la longitud de los fragmentos en pares de bases (pb). Se puede observar que los picos tienen una intensidad de señal apropiada para su análisis, también se puede ver que los loci (picos más altos) generalmente van acompañados a la izquierda de otros picos menores llamados "stutters" que

representan fragmentos más pequeños amplificados erróneamente por la DNA polimerasa. Los patrones stutters difieren en este caso en el orden de dinucleótidos, porque la unidad de repetición más corta (también en este caso) es de 2 pb que la del alelo correspondiente.

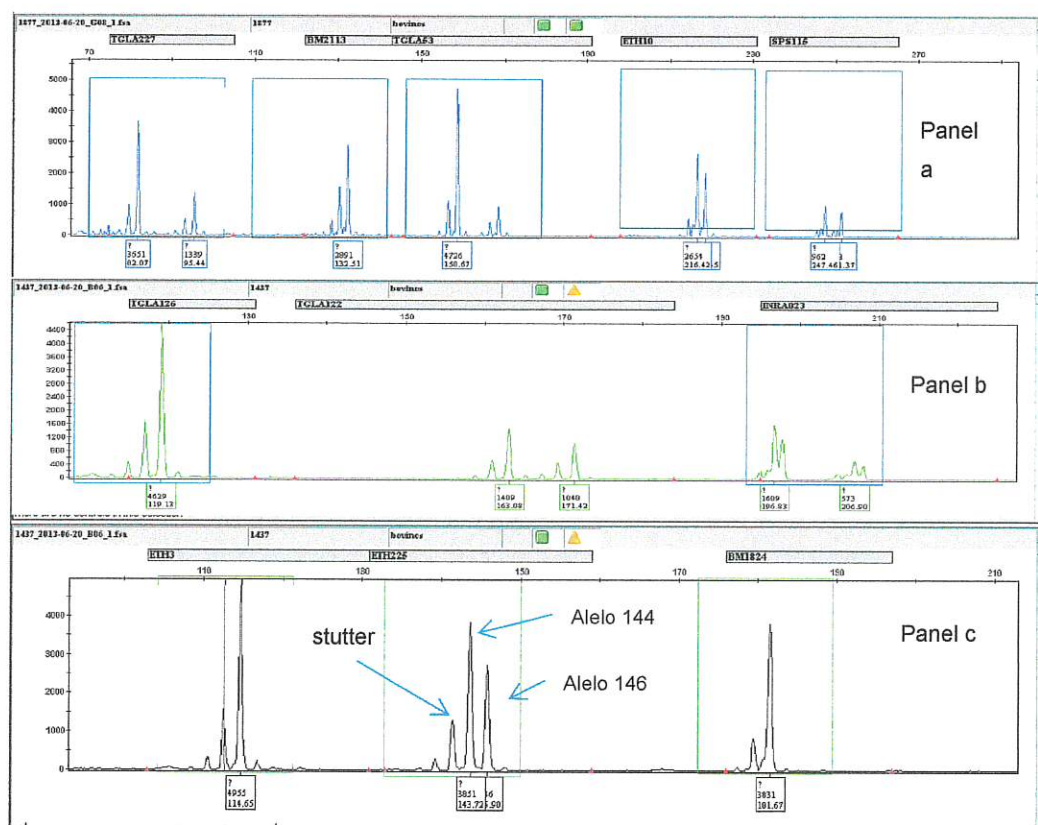


Figura 4. Representación gráfica de los microsatélites de la reacción múltiple detectados en bovino de la raza Jersey. En el panel a) los microsatélites marcados con el fluoróforo Azul (FAM), de izquierda a derecha TGLA227 (75 a 105 pb), BM2113 (122 a 146 pb), TGLA53 (143 a 191 pb), ETH10 (198 a 231 pb) y SPS115 (234 a 265 pb); en el panel b) los marcados con verde (JOE), de izquierda a derecha TGLA126 (115 a 131 pb), TGLA122 (136 a 184 pb) e INRA23 (195 a 225 pb); y en el panel c) los marcados con negro (NED), de izquierda a derecha ETH3 (103 a 133 pb), ETH225 (131 a 159 pb) y BM1824 (176 a 197 pb). La figura fue elaborada usando el software GeneMapper versión 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los picos (Figura 4) son de diferentes colores panel a, b y c porque representan fragmentos de DNA amplificados con primers marcados con diferentes fluoróforos; por ejemplo, los etiquetados con FAM (azul), JOE (verde), NED

(negro). Para el ejemplo que se presenta, los locus y sus alelos son los siguientes: a) TGLA227 alelos 87 y 95 (heterocigoto), BM2113 alelos 132 y 132 (homocigoto), TGLA53 alelos 159 y 169 (heterocigoto), ETH10 216 y 218 (heterocigoto) y SPS115 alelos 247 y 251 (heterocigoto), b) TGLA126 alelos 119 y 119 (homocigoto), TGLA122 alelos 163 y 171 (heterocigoto) y INRA023 alelos 197 y 207 (heterocigoto), c) ETH3 alelos 115 y 115 (homocigoto), ETH225 alelos 144 y 146 (heterocigoto) y BM1824 181 y 181 (homocigoto).

En el Cuadro 10 se muestra el número de alelos por locus y la frecuencia del alelo más común, de los marcadores microsatélites analizados en Jersey. El número de alelos por locus varió de cinco para el marcador ETH3 y TGLA126 a 14 para el marcador SPS115, con un promedio de 8.7. Este promedio es similar al publicado en estudios utilizando estos mismos marcadores, variando de 8.35 a 9.16 alelos por locus (Řehout *et al.*, 2006; Ozkan *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Resultados diferentes fueron reportados por Hernández *et al.* (2009) y Czerneková *et al.* (2006), quienes encontraron un promedio de 14.2 alelos en Cebú y de 5.82 a 9.00 en diferentes razas, respectivamente.

El número de alelos para un mismo marcador puede variar entre razas. Por ejemplo, en el presente estudio los marcadores ETH3 y el TGLA126 tuvieron cinco alelos cada uno; mientras que para ambos microsatélites en Gyr, se encontraron cuatro (Curi y Lopes, 2002), en Cebú 12 (Hernández *et al.*, 2009), y en Simmental seis alelos (Stevanovic *et al.*, 2010). Czerneková *et al.* (2006) reportaron 10 y 8 alelos para ETH3 y TGLA126 en diferentes razas.

El alelo 115 del microsatélite ETH3 tuvo la mayor frecuencia (0.8643) y el alelo 167 del microsatélite TGLA53 fue el menos frecuente (0.2929), lo que es diferente a lo reportado por otros autores donde el alelo más frecuente en ETH3 varió de 0.2880 a 0.5064 en diferentes razas (Řehout *et al.*, 2006; Cervini *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Ozkan *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2010) y el más frecuente en TGLA53 se encontró entre 0.2350 y 0.7520 en diferentes razas (Cervini *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2010). Lo

anterior indica que la información que proporcionan los microsatélites en términos del número de alelos por locus y su frecuencia, depende de la raza y la población estudiada.

Cuadro 10. Número de alelos por locus y la frecuencia del alelo más común (FAC) de los marcadores microsatélites analizados en Jersey en este estudio.

Microsatélites	Alelos	Número de alelos	FAC
ETH10	201, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222	11	0.4214
ETH3	114, 115, 119, 121, 123	5	0.8643
BM2113	126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135	9	0.4214
BM1824	179, 181, 182, 183, 184, 190, 192	7	0.4286
TGLA227	78, 82, 93, 95, 96, 100, 104	7	0.3500
TGLA126	116, 117, 119, 123, 125	5	0.7429
TGLA53	158, 159, 160, 161, 166, 167, 168, 169, 170, 180, 181	11	0.2929
SPS115	238, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 255, 256, 257, 258, 259, 260	14	0.3134
ETH225	135, 136, 139, 140, 143, 144, 146, 148	8	0.3143
TGLA122	142, 143, 149, 150, 151, 152, 162, 163, 1711	9	0.3214
INRA023	197, 199, 205, 207, 213, 214, 215, 216, 217, 218	10	0.3188
Media		8.73	

En el Cuadro 11 se muestra la información de los marcadores utilizados en el estudio para amplificación, y heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e). El promedio de amplificación de las muestras para los marcadores fue 99.5% (máx = 100%, mín = 96%); se observa que nueve de once marcadores obtuvieron una amplificación del 100%. Se excluyeron tres muestras del estudio porque no cumplieron con la calidad de DNA, lo que concuerda con Kios *et al.* (2012) quienes reportaron 95.3% de amplificación utilizando microsatélites similares a los del presente estudio, y que al menos siete de los 11 microsatélites obtuvieron amplificaciones mayores que 97%.

La H_e fluctuó entre 0.249 y 0.832 con promedio de 0.7002, mientras que la H_o varió de 0.186 a 0.812 con promedio de 0.596. Estos resultados son similares a

los publicados en diferentes razas bovinas por Czerneková *et al.* (2006), Carolino *et al.* (2009), Kios *et al.* (2012) y Sepúlveda *et al.* (2012). El nivel de información que proporciona un marcador está determinado por su valor de heterocigosidad y estos valores dependen del número de alelos y su frecuencia en la población bajo estudio.

Cuadro 11. Información^z de marcadores analizados en bovinos Jersey.

Microsatélite	N	Amplificación, %	Ho	He
ETH3	70	100.0		
BM2113	70	100.0	0.629	0.751
BM1824	70	100.0	0.514	0.729
TGLA227	70	100.0	0.657	0.761
TGLA126	70	100.0	0.386	0.412
TGLA53	70	100.0	0.529	0.823
SPS115	67	95.7	0.657	0.832
ETH225	70	100.0	0.786	0.783
TGLA122	70	100.0	0.714	0.796
INRA023	69	98.5	0.812	0.804
ETH10	70	100.0	0.686	0.763
Media	69.64	99.5	0.596	0.7002

^zN = número de muestras amplificadas por locus; Ho = heterocigosidad observada; He = heterocigosidad esperada.

En el Cuadro 12 se observa el PIC, la PE1, la PE2 y la CPE. El promedio de PIC fue 0.66, el cual es similar a los valores de 0.5, 0.69, 0.63, 0.685 y 0.713 reportados por Marshall *et al.* (1998), Kios *et al.* (2012), Sepúlveda *et al.* (2012), Czerneková *et al.* (2006) y Řehout *et al.* (2006). El PIC en el presente estudio varió de 0.238 a 0.806, lo que es cercano a lo publicado por Cervini *et al.* (2006) de 0.390 a 0.835, y por (Stevanovic *et al.* 2010) en bovinos para carne de 0.58 a 0.88.

Los microsatélites SPS115, TGLA53, INRA023, TGLA122, ETH225 y ETH10 mostraron el máximo polimorfismo con valores de PIC mayores que 0.73. En general, estos resultados fueron similares a los reportados por Sepúlveda *et al.* (2012), Řehout *et al.* (2006), Ozkan *et al.* (2009) y Zhang *et al.* (2010).

Las probabilidades de exclusión combinada para PE1 (CPE1) y PE2 (CPE2) fueron 0.9917 y 0.9997, respectivamente. Estas probabilidades fueron similares a las reportadas por Kios *et al.* (2012), quienes con los mismos 11

microsatélites que los del presente estudio, estimaron valores para CPE1 y CPE2 de 0.9900 y 0.9997. Otros estudios utilizando diferente número de marcadores en bovinos para carne reportaron valores para CPE1 que variaron de 0.9684 a 0.9936 y para CPE2 de 0.9989 a 0.9999 (Sherman *et al.*, 2004; Cervini *et al.*, 2006; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Carolino *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2009; Sepúlveda *et al.*, 2012). En bovinos lecheros con número variable de marcadores, Vischer *et al.* (2002), Rehout *et al.* (2006) y Zhang *et al.* (2010) reportaron una CPE1 que osciló de 0.990 a 0.999.

Cuadro 12. Contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidades de exclusión de paternidad (PE1, PE2 y CPE)².

Microsatélite	PIC	PE1	PE2
ETH3	0.238	0.032	0.134
BM2113	0.714	0.356	0.539
BM1824	0.685	0.323	0.502
TGLA227	0.718	0.359	0.537
TGLA126	0.365	0.085	0.208
TGLA53	0.794	0.472	0.645
SPS115	0.806	0.494	0.665
ETH225	0.743	0.389	0.568
TGLA122	0.762	0.418	0.597
INRA023	0.770	0.431	0.609
ETH10	0.731	0.383	0.567
PIC ($\bar{y}$)	0.6661		
CPE		0.9917	0.9997

²PE1 es la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y un progenitor son conocidos; PE2 es la probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y los progenitores son conocidos; y CPE es la probabilidad de exclusión combinada para los 11 microsatélites estudiados.

La alta variabilidad genética de los marcadores permitió una alta eficacia para su utilización en pruebas de parentesco. La probabilidad de exclusión combinada es una medida de la capacidad de un determinado grupo de

marcadores para identificar la paternidad, excluyendo a todos los demás padres candidatos.

Cuando se observan las probabilidades de exclusión para cada marcador (Cuadro 12), los valores se reducen aproximadamente al 50% respecto a los valores de la probabilidad de exclusión combinada. En el presente estudio se encontraron rangos para la probabilidad de exclusión entre 0.032 y 0.494 para PE1 y entre 0.134 y 0.665 para PE2, valores que son cercanos pero ligeramente inferiores en ambos límites a los reportados por Řehout *et al.* (2006), quienes reportan valores de 0.397 a 0.677 para PE1 y de 0.582 a 0.853 para PE2. Sin embargo, concuerdan con lo reportado por Sepúlveda *et al.* (2012), quienes en bovinos para carne encontraron que PE1 variaron de 0.02 a 0.46 y PE2 de 0.11 a 0.63.

El mayor número de alelos, PIC y PE se encontró en los marcadores SPS115, TGLA53, INRA023, TGLA122 y ETH3, mismos que mantienen la menor frecuencia del alelo más común, resultando en los marcadores más informativos en este estudio. Dos de los marcadores (TGLA53 y INRA023) coinciden con los reportados por Stevanovic *et al.*, (2010) como los de mayor cantidad de alelos y PIC, y menor frecuencia del alelo más común.

Jakhesara *et al.* (2012) utilizaron tres criterios para excluir la paternidad, cuando de diez marcadores al menos uno, dos y tres no coincidían. En el presente estudio la exclusión de paternidad y maternidad fue aplicada cuando al menos tres de once marcadores no coincidieron (nivel considerado como relajado). De las 12 familias analizadas, tres de 12 hijas no coincidieron con su presunta madre, mientras que 11 de 13 hijas no coincidieron con el presunto padre. La estimación alta del error de paternidad en el presente estudio no es muy confiable con fines de caracterización de la raza Jersey ya que la muestra es reducida; sin embargo, sugiere la necesidad de contar con mayor vigilancia en el proceso de identificación y registro de esta información. El error en la genealogía se puede atribuir entre otras razones: a) errores en el registro de

datos; b) animales fecundados por inseminaciones anteriores a la registrada; c) registro erróneo de los padres; y d) intercambio de terneros al nacer.

Otros autores también han reportados altas tasas de errores de paternidad en bovinos que han variado de 27.5 a 55.2% (Curi y Lopes, 2002; Ron *et al.*, 1996 y Kios *et al.*, 2012).

3.6 Conclusiones

El panel de 11 microsatélites proporciona datos suficientes de contenido de información polimórfica (0.66), probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y un progenitor son conocidos (0.9917), probabilidad de exclusión de la relación de parentesco cuando los genotipos del hijo y los progenitores son conocidos (0.9997), media de alelos por locus (8.73), frecuencia del alelo más común (0.2929 a 0.8643) y amplificación (mayor que 96%), lo que indica que son eficaces para pruebas de paternidad en bovinos Jersey.

En el presente estudio, los microsatélites más informativos para la raza Jersey fueron SPS115, TGLA53, INRA23, TGLA122 y ETH225.

Es posible realizar pruebas de paternidad en Jersey con ocho marcadores de microsatélites (SPS115, TGLA53, INRA023, TGLA122, ETH225, ETH10, BM2113 y TGLA227), ya que cumplen con el valor óptimo de probabilidad combinada de exclusión (mayor que 0.99).

La calidad del DNA extraído con el kit Maxwell 16, aunque 12% más cara, fue más homogénea que con el kit DNAzol® BD.

Los animales menores de 2 años tuvieron mayor cantidad de DNA extraído a partir de sangre total ($81.58 \pm 28.31 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) que los mayores de 2 años ($39.72 \pm 13.88 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

3.7 Literatura citada

- Arellano, W., A. Sifuentes, G. Parra, y R. Garcidueñas. 2007. Evaluación en ganado Braford de los marcadores microsatélites sugeridos por FAO/ISAG para pruebas de paternidad. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/genetica_seleccion_cruzamientos/bovinos_de_carne/29-Arellano-Microsatelites.pdf. Consultado el 5 de agosto del 2010.
- Arellano-Vera, W., A. M. Sifuentes-Rincon, R. Garcidueñas-Piña, y G. M. Parra-Bracamonte. 2010. Importancia de la verificación-asignación de progenitores en sistemas extensivos de pie de cría. *Revista Científica, FCV-LUZ* 20: 53-60.
- Banos, G., G. R. Wiggans, and R. L. Powell. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *Journal of Dairy Science* 84: 2523-2529.
- Beechinor, J. G., and E. P. Kelly. 1987. Errors of identification amongst cattle presented as progeny of some bulls used in the artificial insemination service in Ireland. *Ireland Veterinary Journal* 41: 348-353.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bovenhuis, H., and J. A. M. Van Arendonk. 1991. Estimation of milk protein gene frequencies in crossbred cattle by maximum likelihood. *Journal of Dairy Science* 74: 2728- 2736.
- Carolino, I., C. O. Sousa, S. Ferreira, N. Carolino, F. S. Silva, and L. T. Gama. 2009. Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 32: 306-311.
- Cervini M., F. Henrique-Silva, N. Mortari, and E. Matheucci. 2006. Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nellore cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology* 29: 486-490.
- Curi, A., and R. C. Lopes. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovine. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 3: 129-135.
- Czerneková, V., T. Kott, G. Dudková, Z. Sztankóová, and J. Soldát. 2006. Genetic diversity between seven Central European Cattle breeds as revealed by microsatellite analysis. *Czech Journal of Animal Science* 51: 1-7.

- Erkeller-Yuksel, F. M., V. Deneys, B. Yuksel, I. Hannet, F. Hulstaert, C. Hamilton, H. Mackinnon, L. T. Stokes, V. Munhveshulj, F. Valangendonck, M. d. Bruvére, B. A. Bach, and P. M. Lydvard. 1992. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *The Journal of Pediatrics* 120: 216-222.
- Geldermann, H., U. Pieper, and W. E. Weber. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *Journal of Animal Science* 63: 1759-1768.
- Gomez-Raya, L., K. Priest, W. M. Rauw, M. Okomo-Adhiambo, D. Thain, B. Bruce, A. Rink, R. Torell, L. Grellman, R. Narayanan, and C. W. Beattie. 2008. The value of DNA paternity identification in beef cattle: Examples from Nevada's free-range ranches. *Journal of Animal Science* 86: 17-24.
- Henderson, C. R. 1976. A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in prediction of breeding values. *Biometrics* 32: 69-83.
- Hernández, E. C. M. Olivera, H. Ostos, y M. T. Guerra. 2009. Genetic Variability of Zebu Cattle Breed (*Bos Indicus*) in the department of Huila, Colombia using microsatellite molecular markers. *Acta Biológica Colombiana* 14: 173-180.
- Israel, C, and J. I. Weller. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science* 83: 181-187.
- Jakhesara, S. J., D. N. Rank, J. D. Kansara, R. C. Parikh, V. M. Patel, P. H. Vataliya, and J. V. Solanki. 2012. Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo. *Journal of Animal Science* 90: 4723-4728.
- Jamieson, A., and S. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kios, D., E. V Marle-Köster, and C. Visser. 2012. Application of DNA markers in parentage verification of Boran cattle in Kenya. *Tropical Animal Health and Production* 44: 471-476.
- Núñez D., R., R. Ramírez V., A. Ruíz F., y J. Domínguez V. 2004. Resumen de evaluaciones genéticas para ganado Jersey 2004. Chapingo, Méx. 44 p.

- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Ozkan, E., M. I. Soysal, M. Ozder, E. Koban, O. Sahin, and I. Togan. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. *Livestock Science* 124: 101-106.
- Řehout, V., E. Hradecka, and J. Čitek. 2006. Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science* 51: 503-509.
- Richardson, A. J., N. Narendran, R. H. Guymer, H. Vu, and P. N. Baird. 2006. Blood storage at 4 °C – factors involved in DNA yield and quality. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 147: 290-294.
- Ron, M., M. Blanc, E. Ezra, and J. I. Weller. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science* 79: 676-681.
- Senneke, S., L., M. D. Macneil, and L. D. Van Vleck. 2004. Effects of sire misidentification on estimates of genetic parameters for birth and weaning weights in Hereford cattle. *Journal of Animal Science* 82: 2307-2312.
- Sepúlveda, J. C., P. A. Ángel-Marín, A. Toro, J. D. Corrales, M. A. Moreno, M. F. Cerón-Muñoz. 2012. Genetic variability of Senepol cattle in Columbia using molecular markers. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25: 183-190.
- Sherman, G. B., S. D. Kachamn, L. L. Hungerford, G. P. Rupp, C. P. Fox, M. D. Brown, B. M. Feuz, and T. R. Holm. 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.
- Sifuentes R., A. M.; G. M. Parra B., X. F. De la Rosa R., A. Sánchez V., F. Serrano M., y J. Rosales A. 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.
- Stevanovic, J., Z. Stanimirovic, V. Dimitrijevic, V. stojic, F. Natalija and M. Lazarevic. 2009. Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in Simmental cattle from Serbia. *Acta Veterinaria (Beograd)* 59: 621- 631.
- Stevanovic, J., Z. Stanimirovic, V. Dimitrijevic, and M. Maletic. 2010. Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied

- cattle (YU Simmental Cattle). Czech Journal of Animal Science 55: 221-226.
- Trommelen, G. J. M., N. H. G. Den Daas, J. Vijg, and A. G. Uitterlinden. 1993. Identity and paternity testing of cattle: application of a deoxyribonucleic acid profiling protocol. Journal of Dairy Science 76: 1403-1411.
- Van Eenennaam, A. L., R. L. Weaver, D. J. Drake, M. C. T. Penedo, R. L. Quaas, D. J. Garrick, and E. J. Pollak. 2007. DNA-Based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. Journal of Animal Science 85: 3159-3169.
- Visscher, P. M., J. A. Woolliams, D. Smith, and J. L. Williams. 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.
- Weller, J. I., E. Feldmesser, M. Golik, I. Tager-Cohen, I. Domochofsky, O. Aluz, E. Ezra, and M. Ron. 2004. Factors Affecting Incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein Population. Journal of Dairy Science 87: 2627-2640.
- Zhang, Y., Y. Wang., D. Sun., Y. Yu., and Y. Zhang. 2010. Validation of 17 microsatellite markers for parentage verification and identity test in Chinese Holstein cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Science 23: 425-429.

4 APÉNDICES

Apéndice 1. Probabilidad de exclusión combinada (CPE1) del panel de locus utilizados para la asignación de paternidad cuando el genotipo del hijo y un padre es conocido

Locus Microsatélite	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*
SPS115	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494	0.494
TGLA53		0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472
INRA023			0.431	0.431	0.431	0.431	0.431	0.431	0.431	0.431	0.431
TGLA122				0.418	0.418	0.418	0.418	0.418	0.418	0.418	0.418
ETH225					0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389
ETH10						0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383
TGLA227							0.359	0.359	0.359	0.359	0.359
BM2113								0.356	0.356	0.356	0.356
BM1824									0.323	0.323	0.323
TGLA126										0.085	0.085
ETH3										0.032	0.032
PEC1	0.494	0.732832	0.848	0.912	0.946	0.967	0.979	0.986	0.991	0.992	0.992

*Número de loci.

Apéndice 2. Probabilidad de exclusión combinada (CPE2) del panel de locus utilizados para la asignación de paternidad cuando el genotipo del hijo y los progenitores es conocido.

Locus Microsatélite	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*
SPS115	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665	0.665
TGLA53		0.645	0.645	0.645	0.645	0.645	0.645	0.645	0.645	0.645	0.645
INRA023			0.609	0.609	0.609	0.609	0.609	0.609	0.609	0.609	0.609
TGLA122				0.597	0.597	0.597	0.597	0.597	0.597	0.597	0.597
ETH225					0.568	0.568	0.568	0.568	0.568	0.568	0.568
ETH10						0.567	0.567	0.567	0.567	0.567	0.567
BM2113							0.539	0.539	0.539	0.539	0.539
TGLA227								0.537	0.537	0.537	0.537
BM1824									0.502	0.502	0.502
TGLA126										0.208	0.208
ETH3											0.134
PEC2	0.665	0.881	0.954	0.981	0.992	0.996	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999

*Número de loci.

Apéndice 3. Genotipos de padres e hijas, para cada locus.

Individuo	364 3624		364 3625		364 3635		364 3639		343 3623		343 3626		343 3629		343 3630		343 3631		343 3634		343 3637		343 3640		343 3642	
	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H
TGLA227a	82	82	82	95	82	95	82	93	95	93	95	95	95	82	95	95	82	95	93	95	82	95	95	95	95	95
TGLA227b	104	96	104	104	104	95	104	104	95	95	104	95	82	95	104	95	95	95	93	95	96	95	100	95	93	93
BM2113a	131	131	131	133	131	133	131	131	133	133	133	131	133	127	133	131	133	133	131	133	127	133	131	133	133	133
BM2113b	133	133	133	133	133	133	131	133	133	135	133	133	133	133	133	133	133	133	133	133	135	133	133	133	133	135
TGLA53a	167	159	167	167	167	167	161	159	159	159	159	159	161	159	159	159	159	159	159	159	167	159	167	159	161	161
TGLA53b	167	167	167	167	167	169	167	167	159	167	159	161	159	161	159	159	167	159	159	167	159	167	159	167	159	167
ETH10a	214	214	214	218	214	216	214	216	214	216	214	216	214	216	214	216	214	214	216	214	216	214	214	214	214	216
ETH10b	218	219	218	220	218	220	218	221	214	216	214	218	214	220	214	216	214	216	214	216	214	216	214	214	214	221
SPS115a	251	259	251	251	251	251	251	251	251	247	251	258	251	251	251	251	251	251	251	251	251	251	251	251	251	258
SPS115b	253	259	253	251	253	251	253	253	253	258	253	258	253	258	253	258	253	253	258	253	259	253	253	253	253	258
TGLA126a	117	119	117	117	117	119	117	119	119	117	119	117	119	119	119	119	119	119	119	119	117	119	117	119	119	119
TGLA126b	125	123	125	119	125	119	125	119	119	117	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119	119
TGLA122a	150	152	150	142	150	150	150	152	152	152	152	142	152	142	152	143	152	142	152	143	152	143	152	152	152	152
TGLA122b	171	171	171	171	171	171	171	171	171	163	171	142	171	152	171	152	171	142	171	152	171	152	171	143	171	171
INRA023a	197	197	197	207	197	197	197	197	199	205	199	205	199	199	199	213	199	205	199	197	199	197	199	197	199	197
INRA023b	197	207	197	213	197	213	197	197	205	217	205	217	205	217	205	217	205	217	205	197	205	217	205	205	217	217
ETH3a	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
ETH3b	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
ETH225a	140	136	140	135	140	135	140	140	140	144	140	136	140	144	140	136	140	144	140	140	139	140	144	140	144	144
ETH225b	144	146	144	135	144	140	144	140	144	144	144	140	144	144	144	144	144	144	144	144	144	144	146	144	146	146
BM1824a	184	182	184	190	184	184	184	179	183	181	183	179	183	181	183	181	183	181	183	181	179	183	179	183	183	183
BM1824b	190	190	190	190	190	190	190	181	197	192	192	181	192	192	181	192	181	192	192	192	182	192	181	192	181	181
Alelos en común	8	8	9	8	8	7	7	8	8	7	7	8	8	8	8	8	9	8	8	8	7	8	8	8	5	5

P = Macho y H = Hija

Apéndice 4. Genotipos de madres e hijas, para cada locus.

Individual	388 3624		322 3625		2628 3636		222 3639		356 3623		324 3626		380 3628		361 3630		374 3631		2104 3637		294 3640		354 3642	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
TGLA227a	82	82	82	95	95	95	82	93	93	93	82	95	82	82	95	95	82	82	82	82	93	95	93	93
TGLA227b	82	96	93	104	100	95	93	104	95	95	104	104	95	82	95	104	95	82	96	82	100	100	95	93
BM2113a	131	131	127	133	133	131	127	131	131	133	133	131	133	127	131	131	133	133	127	127	131	131	133	133
BM2113b	133	133	135	133	133	133	133	131	133	135	135	133	133	133	133	133	135	135	135	135	133	133	133	135
TGLA53a	159	159	159	167	169	167	159	161	169	159	161	159	167	161	169	159	159	167	167	167	167	167	158	161
TGLA53b	159	167	159	167	169	169	161	167	169	167	167	161	160	161	169	159	161	167	167	167	167	167	161	167
ETH10a	214	214	214	218	212	216	216	216	216	216	218	216	216	216	216	216	214	214	216	216	214	214	216	216
ETH10b	214	218	216	220	216	220	216	221	216	216	218	218	216	220	222	216	216	216	216	216	214	216	220	221
SPS115a	253	259	0	251	251	251	251	251	253	247	247	258	253	251	251	251	251	251	251	251	0	251	251	258
SPS115b	258	259	0	251	253	251	253	253	258	258	258	258	258	258	253	258	253	253	253	259	0	251	259	258
TGLA126a	119	119	119	117	119	119	119	119	119	117	117	117	119	119	117	119	119	119	117	117	117	117	119	119
TGLA126b	123	123	119	119	119	119	119	119	119	117	117	119	119	119	119	119	119	119	119	119	117	119	119	119
TGLA122a	142	152	142	142	150	150	150	152	150	152	142	142	142	142	150	143	142	142	142	143	143	143	142	152
TGLA122b	152	171	152	171	152	171	152	152	152	163	152	142	142	152	163	152	150	142	152	152	152	143	171	171
INRA023a	207	197	197	207	197	197	197	197	197	205	205	205	197	199	197	213	205	205	197	197	0	197	197	197
INRA023b	213	207	197	213	199	213	205	197	205	217	217	217	199	217	205	217	205	217	199	217	0	205	205	217
ETH3a	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
ETH3b	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	123	123	115	115	115	115
ETH225a	140	136	140	135	140	135	136	140	140	144	135	136	140	144	140	136	140	144	140	139	136	144	144	144
ETH225b	146	146	144	135	144	140	140	140	148	144	139	140	144	144	144	144	146	146	140	144	146	146	146	146
BM1824a	181	182	182	190	182	181	179	179	181	181	181	179	181	181	183	181	181	181	181	179	181	179	181	181
BM1824b	192	190	192	190	182	190	181	181	182	192	181	181	181	192	192	181	192	181	182	182	190	181	181	181
Alelos en común	9		3		10		10		3		10		10		7		11		9		9		10	

M = Madre y H = Hija

Apéndice 5. Genealogía de familias analizadas para prueba de paternidad

Padre	Hijas	Madres
364	3624	389
	3625	322
	3635	2628
	3639	222
343	3623	356
	3626	324
	3629	380
	3630	361
	3634	
	3637	2104
	3640	294
	3642	354

