



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Huella genética en el ganado caprino por  
amplificación de microsatélites**

Tesis que presenta

**Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga**

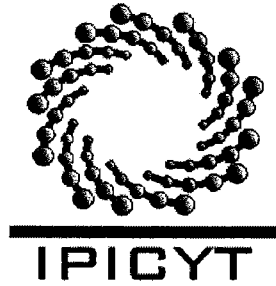
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2004.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 004 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de agosto del año 2004, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga**

sobre la Tesis intitulada:

*Huella genética en el ganado caprino por amplificación de microsátélites*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

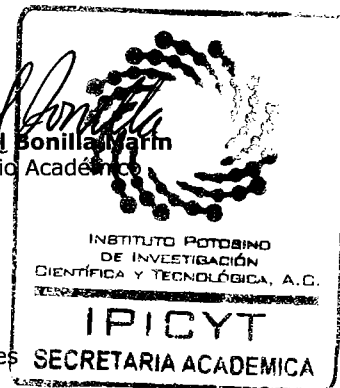
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes agosto de 2004.

  
**Dr. Marcial Bonilla**  
Secretario Académico

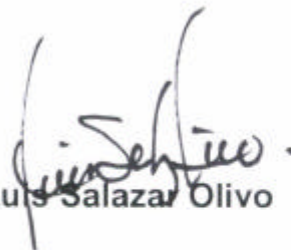


  
**Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

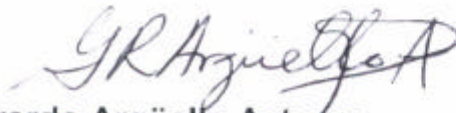
La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga y aprobada el día 05 de Agosto de 2004 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**Dr. Rubén López Revilla**



**Dr. Luis Salazar Olivo**



**Dr. Gerardo Argüello Astorga**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización de este trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 176112).

## DEDICATORIAS

Primeramente doy gracias a Dios por haberme concedido el don de la vida, y por abrirme los caminos necesarios para llegar a donde me encuentro.

Y a mis abuelos que desde donde quiera que estén siguen velando por mí.

Dedico este trabajo a mis padres Octaviano y Eugenia y a mis hermanos Luis, Caty, Miguel, Roberto y Fabiola, por todo su apoyo y paciencia.

A mi esposo, por su apoyo y confianza y por impulsarme siempre a cumplir todas mis metas.

A mis tíos y primos

A todos mis amigos, que gracias a Dios no son muchos pero tampoco pocos y cada uno de ellos siempre comparten conmigo todos los momentos importantes de mi vida.

Y como olvidar a mis maestros y compañeros de trabajo que contribuyeron a formar en mí lo que soy, de una manera especial a la Dra. Ana Cristina Cubillas y a la Dra. Claudia Escudero

Al Dr. Rubén López Revilla, miles de gracias por su amistad y confianza hacia mí, por su apoyo consejos y entusiasmo en la asesoría de este trabajo, por sembrar y cultivar en estos dos años la confianza en mí misma pero sobre todo por ser una gran persona y hacerme partícipe de sus conocimientos

A mis dos grandes compañeros de trabajo Andrés y Mireya  
A todos los niños de escasos recursos de mi país, por que han dado el coraje para seguir superándome.

A mi país, con la esperanza de que pueda seguir luchando mucho más por él.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rubén López Revilla, miles de gracias por confiar en mí para la realización de este trabajo, por su apoyo consejos y entusiasmo en esta investigación.

Al Med. Vet. Andrés Luna González, a la Biol. Mireya Sánchez Garza y a la Ing. Adriana Lomelí, Forcada por su apoyo técnico, paciencia, tiempo y entusiasmo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Salazar Olivo por su confianza, su apoyo y por sus consejos, por ser una excelente persona, mil gracias maestro y amigo.

A mis compañeras y compañeros del Lab. de Biotecnología Médica y Pecuaria del IPICYT, porque me han acompañado cada día en la realización de este trabajo,

Al Dr. Carlos Cruz del Instituto Tecnológico Agropecuario de Aguascalientes, por su colaboración para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ángel Alpuche, al Dr. Gerardo Argüello y a todo el personal del Lab. de Biotecnología Vegetal del IPICYT, por las facilidades otorgadas para la realización de mi trabajo, por la disposición y asesoría prestada.

Al Centro de Selección y Reproducción Caprina del estado, por las facilidades otorgadas para la obtención de las muestras.

A la Dra. Claudia Escudero y al Q.F.B. Eduardo Villegas y al personal del Lab. de Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP por las facilidades otorgadas para el uso del fotodocumentador.

A todo el personal del Lab. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

## ÍNDICE

Hoja de aprobación de la tesis	2
Créditos institucionales	3
Dedicatorias	4
Agradecimientos	5
Lista de tablas	7
Lista de figuras	8
Lista de anexos	9
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Materiales y Métodos	22
Resultados	24
Discusión	30
Referencias	33
Tablas	37
Figuras	46
Anexos	58

## LISTA DE TABLAS

1.	Tríos caprinos empleados	37
2.	Rendimiento de DNA con tres métodos de extracción	38
3.	Secuencias de los primers, contenido de GC y temperaturas de annealing para la PCR	39
4.	Alelos de microsatélites amplificados con primers SR CRSP en el ganado caprino	40
5.	Alelos de microsatélites registrados en el hato de raza Nubia	41
6.	Alelos de microsatélites registrados en el hato de raza Boer	42
7.	Concordancia de huellas genéticas para los tríos registrados	43
8.	Alelos de microsatélites no compartidos y compartidos en hatos de razas Boer y Nubia	44
9.	Alelos de microsatélites no compartidos y compartidos en hatos de razas Boer, Nubia y los reportados por Arévalo <i>et al.</i> (1994)	45



## LISTA DE FIGURAS

1.	Gradiente de concentración de $MgCl_2$ para la pareja 3 de primers	46
2.	Gradiente de concentración de $MgCl_2$ para la pareja 9 de primers	47
3.	Patrones de amplificación de DNA caprino (M94) con TaqDNApol y TaqPlatinum	48
4.	Gradiente de temperatura para las parejas de primers 1, 2, 3 y 4	49
5.	Gradiente de temperatura para las parejas de primers 5, 6 y 9	50
6.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 1 de primers	51
7.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 2 de primers	52
8.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 3 de primers	53
9.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 4 de primers	54
10.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 5 de primers	55
11.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 6 de primers	56
12.	Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja 9 de primers	57

## ANEXOS

A.	Componentes para una mezcla de PCR (25µl)	58
B.	Componentes del gel de poliacrilamida para la cámara Protean II (Bio Rad)	59
C.	Parejas de oligos SR CRSP y temperaturas de annealing recomendadas	60
D.	Alelos de microsatélites amplificados con las 10 parejas de oligos SR CRSP empleadas	61
E.	Tamaño de los alelos, frecuencias alélicas, heterocigocidad de la muestra, contenido de información polimórfica, y temperatura de “annealing” para 10 microsatélites caprinos SR CRSP	62

## RESUMEN

Un serio problema de la caprinocultura mexicana es el elevado número de animales de escaso valor genético que constituyen el hato nacional. Debido a que los sistemas de producción caprina predominantes son la ganadería extensiva y semi-extensiva, la mayoría de los apareamientos se dan en el campo, con escaso o nulo control y sin registros de paternidad. La caprinocultura nacional mejoraría sustancialmente con programas de mejoramiento genético que incrementen la producción y la productividad. Este trabajo pretende iniciar un sistema de pedigrí basado en el uso de la huella genética en el ganado caprino para el mejoramiento genético. Utilizando muestras de sangre de 4 sementales, 8 madres y 8 crías de razas Boer y Nubia que conformaron 8 tríos (padre, madre y cría) con registros de monta confiables, estandarizamos un sistema para la identificación de individuos y la determinación de la paternidad basado en la amplificación por PCR de alelos de microsatélites con las parejas de primers SR Caprine Repeat Short Polymorphics (SR CRSP). El sistema nos ha permitido 1) identificar los alelos de microsatélites caprinos en los dos hatos incluidos en el trabajo, 2) confirmar la paternidad de los tríos analizados, y 3) cuantificar la endogamia de la muestra.

Palabras Clave: microsatélites, PCR, SR CRSP, paternidad, identificación individual, endogamia, raza Nubia, raza Boer

**ABSTRACT**

A serious problem of Mexican goat breeding is the high number of animals with scarce genetic value that constitute the national flock. Because predominant goat production systems are extensive and semiextensive cattle raising, most of the matings occur in the field, with scarce or null control and lack of paternity records. Goat breeding would improve substantially with genetic improvement programs to increase production and productivity. This work seeks to start a pedigree system based on the use of genetic fingerprinting in goat livestock that could be used in genetic improvement programs. Using blood samples of 4 stud animals, 8 mothers and 8 kids of Boer and Nubia breeds conforming 8 trios (father, mother and kid) with reliable breeding records, we standardized a system identifying individuals and determining paternity based on PCR amplification of microsatellite alleles with SR Caprine Repeat Short Polymorphics (SR CRSP) primer couple. The system has allowed us 1) to identify goat microsatellite alleles of the flocks included in this work, 2) to confirm the paternity of the trios analyzed, and 3) to quantify the endogamy in the sample.

Key Words: microsatellites, PCR, SR CRSP, paternity, individual identification, endogamy, breed Nubia, breed Boer.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Antecedentes generales

La individualidad genética está definida por el conjunto de marcadores genéticos que el individuo hereda de los padres (Alberts *et al.*, 1994). Esta individualidad conocida como “huella genética” consiste en la representación visual del DNA en forma de bandas paralelas, y la probabilidad de que dos individuos tengan la misma huella genética utilizando varios marcadores genéticos puede ser tan baja como  $10^{-21}$  (Berumen y Juárez, 1999) .

El DNA contiene secuencias repetidas no codificantes dentro de las cuales se encuentran los microsatélites, que son secuencias de DNA esparcidas por todo el genoma y contienen unidades de 2-6 pb repetidas en tándem hasta 50 veces, con tramos de longitud variable (100-300 pb) y se consideran la mayor fuente de polimorfismo para la huella genética (Berumen y Juárez, 1999). El número de repeticiones en cualquier locus puede variar en los cromosomas y de ella deriva la heterocigocidad del número de copias de un número particular de microsatélites en un individuo. Esta característica es heredable y debido a su número y facilidad de detección mediante la PCR, los microsatélites se utilizan con frecuencia en la construcción de mapas de ligamiento genético. En el gran número de miembros de una familia puede explorarse la presencia de ciertos polimorfismos de microsatélites (Murray *et al.*, 2001).

Los microsatélites fueron descritos por Tautz (1989) y han resultado herramientas apropiadas para el mapeo, la identificación de rasgos de loci cuantitativos y las pruebas de parentesco (Van Marle-Koster *et al.*, 2000). La técnica de microsatélites se ha utilizado con éxito en los seres vivos para una gran variedad de análisis. En humanos tiene gran aplicación en estudios de genética de poblaciones. En medicina forense Gómez y Carracedo (2000) citan la aplicación de microsatélites en pruebas de identidad humanasealizadas de 1998 a 1999 en España y Portugal. Existe un gran número de reportes de pruebas de paternidad

en casos de incesto y violación (Allen *et al* 2000; Chakraborty y Stivers, 1996; Gunn y Trueman, 1997; Pineda, 1999; Rouger y Van Huffel, 1996).

Las principales ventajas y desventajas de los microsatélites resumidas en (<http://www.datagene.es>) son las siguientes:

Ventajas:

1. Altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados en individuos estrechamente relacionados.
2. Técnicamente simples: la tecnología de PCR puede ser fácil y rápidamente utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
3. Técnicamente sensibles: solo se requieren pequeñas cantidades de DNA.
4. Analíticamente simples: los datos son producidos en forma confiable y son altamente reproducibles.
5. Muy abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 kb.
6. Ampliamente aplicables: los loci están conservados suficientemente entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros.
7. De fácil intercambio entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin necesidad de transferencia física de los mismos.
8. Generan más alta incidencia de polimorfismo en comparación con otras técnicas como RFLPs y RAPDs.

Desventajas:

1. La inversión inicial de recursos es relativamente alta.
2. Requieren personal con experiencia técnica para clonación y secuenciación de los alelos.

3. Tasa de mutación alta: se estima entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  por generación. Nuevas mutaciones pueden ocurrir con frecuencia y dar como resultado que el verdadero padre sea excluido. Esta posibilidad requiere que los padres potenciales sean excluidos en al menos dos loci.
4. Alelos nulos: si los hijos heredan un alelo nulo (no amplificante) de un locus paterno, el verdadero padre puede ser excluido.
5. "Primers": mutaciones en las regiones homólogas para los "primers" pueden resultar en productos de PCR no amplificados. Esto es particularmente cierto si las mutaciones ocurren en la región homóloga del DNA para la terminación 3' de los "primers".

#### *Microsatélites y huella genética en especies de interés comercial*

La Finissh Animal Breeding Association, de Finlandia, realizó un estudio de variabilidad en cinco razas caninas: Labrador Dorado, Pastor Alemán, Daschunds, Welsh Corgi y Bedlington Terrier cuantificada con 10 microsatélites, tomando una muestra de 50 individuos de cada raza (Koskinen., 2001). También se ha reportado el uso de 20 microsatélites caninos específicos en varias camadas, concluyendo que los microsatélites proporcionan bases confiables para asignar paternidad en el pedigree de las razas (Zajc y Sampson,1996).

El uso de microsatélites se ha extendido a animales no domésticos. Hay análisis de la relación genética en una comunidad de bonobos (*Pan paniscus*) salvajes, usando DNA nuclear y mitocondrial extraído de muestras fecales (Gerluff y Hartung,1999). En Cayo Santiago, Puerto Rico, Nurberg y Saverman (1998) establecieron relaciones de parentesco en primates (*Macaca mulata*) utilizando marcadores humanos para pruebas de paternidad en tres grupos sociales.

### *Microsatélites y huella genética en el ganado*

Los microsatélites están siendo utilizados en múltiples trabajos de paternidad, sobre todo en especies ganaderas de interés comercial tales como equinos, porcinos y bovinos (Alvarez *et al.*, 2000; Israel y Weller, 2000). En el ganado porcino fue comparada la capacidad fertilizadora de dos sementales con parámetros de semen similares, mediante inseminación heteroespermática de cerdas, utilizando un marcador de DNA amplificado por PCR para determinar la paternidad en embriones de 5 a 6 días (Salthberg y Harlizius, 2000). Se ha desarrollado también un eficiente sistema para el control del parentesco y la determinación de paternidad en cerdos australianos basado en microsatélites (Nechtelberger *et al.*, 2001). En el ganado ovino un estudio realizado en el norte de España, en la raza Aragonesa, determinó la paternidad utilizando DNA microsatélite (Ferreira y Monteagudo, 1999). Los microsatélites HEL5, HEL9, INRA063 y BM2113 han sido empleados para el análisis genético de similitud y distancia genética en hatos de ganado bovino aislados geográficamente en México (Russel *et al.*, 2000).

## **2. Antecedentes directos**

### *Microsatélites y huella genética en el ganado caprino*

El conocimiento de marcadores genéticos en cabras, particularmente de grupos sanguíneos, es muy limitado (Iolchiev *et al.*, 2001). De los trabajos realizados en ganado caprino destaca la caracterización de microsatélites específicos de caprinos que pueden ser amplificados en diversas especies (Arévalo *et al.*, 1994). y algunos de los primeros trabajos en cabras se enfocaron al análisis de la diversidad genética en cabras suizas basada en microsatélites de



bovino (Saitbekova *et al.*, 1999). Recientemente más de 1400 microsatélites han sido mapeados en especies lecheras y el 40% de estos pueden ser amplificados en cabras (Luikart *et al.*, 1999). Se ha establecido un sistema de control de pedigree basado en 11 marcadores microsatélite en *Capra hircus*, probando dos sistemas multiplex, cada uno con 11 loci de microsatélites, desarrollados para las pruebas de paternidad en cabras (Luikart *et al.*, 1999). De esos loci, ocho eran de cabras, nueve de bovinos y cinco de ovinos. Las probabilidades de exclusión del sistema fueron calculadas a partir de la frecuencia de alelos en aproximadamente 30 individuos no relacionados de cada una de las cuatro razas analizadas (Cachemira, Angora, Saanen y Murciana – Granadina). Esta prueba dió un valor muy alto de identificación individual (Luikart *et al.*, 1999). Zhao y Yang (2001), efectuaron una investigación en la provincia de Hubei, China, para determinar la variación genética entre cinco razas caprinas nativas usando microsatélites de bovino y ovino.

### *La cabra en México*

Un problema de la caprinocultura mexicana es el elevado número de animales de escaso valor genético que constituye el hato nacional. El 95% del ganado caprino está constituido por poblaciones criollas desarrolladas a partir de los animales introducidos al país durante la colonización española en el siglo XVI y el 5% restante corresponde a animales de razas puras (Arbiza, 1986). México cuenta con cerca de 197 millones de hectáreas, bajo un mosaico de regiones ecológicas que le dan la principal característica a su ganadería; esto es, una gran biodiversidad de recursos genéticos. La ganadería constituye el principal uso del suelo en el país, desarrollándose en una superficie de 113.8 millones de hectáreas, lo que representa el 58% del territorio nacional. La producción caprina representa un recurso importante para algunos estratos sociales. A pesar de que en México existen unidades caprinas en las cuales se aplica tecnología avanzada,

el común denominador de este sector pecuario es la escasa o nula tecnificación aplicada en los procesos productivos. La producción caprina se extiende por todo el territorio nacional aunque principalmente se relaciona a las regiones áridas y semiáridas del país caracterizadas por la limitada producción de sus agostaderos.

La producción de carne y leche se concentra en los estados del norte y centro-norte de México, contribuyendo con el 72% y 62% de la producción nacional de carne y leche, respectivamente. De las especies que se han visto reducidas en sus inventarios, la caprina es la más afectada. En los últimos años el hato caprino se ha reducido en un millón de cabezas aproximadamente, como resultado de la demanda existente, particularmente de cabritos, que evita que los animales alcancen su edad reproductiva.

Debido a esta problemática se han establecido acciones para el rescate de hembras como una forma de estimular la cría. La producción de carne de caprino descendió 2.3% en la última década y la producción de leche de caprino se redujo en un 3.1% en el mismo periodo, como efecto directo de los cambios en el inventario ([www.siea.sagarpa.gob.mx](http://www.siea.sagarpa.gob.mx)).

### *La cabra en San Luis Potosí*

El estado de San Luis Potosí cuenta con una superficie de 6'248,288 ha., que representan el 3.2% del territorio nacional. Se dedican a la ganadería un total de 3'995,213 hectáreas, equivalentes al 63.94% de la superficie total. Por su localización geográfica el estado tiene gran diversidad de climas y tipos de vegetación, que en su mayor parte son aprovechados para la ganadería extensiva que generalmente se realiza por pastoreo directo. En el estado, las zonas con mayor uso del suelo para la ganadería son en orden de importancia la occidente, la norte, la centro, la media y la huasteca. La zona occidente se caracteriza por la explotación de ovinos y bovinos, y en menor escala caprinos, la actividad se

sustenta en el pastoreo de pastizales nativos así como de matorrales. La zona centro se caracteriza por la explotación de bovinos, caprinos y en menor escala ovinos. Predomina el ganado criollo con cruza de Cebú, en caprinos predominan los criollos encastados con Nubia.

La raza Nubia es de origen africano aunque fue desarrollada en Inglaterra (de ahí que se conoce también como Anglonubio). Esta raza se caracteriza por orejas largas y colgantes y una nariz tipo romana o curva, su pelo es corto y brillante; generalmente es acorne aunque puede presentar cuernos. Las hembras carecen de barba. Esta raza presenta diferentes colores y combinaciones incluyendo negro, gris, blanco, crema, diferentes tonalidades de café y rojo. Está entre las razas que producen un mayor porcentaje de grasa en la leche. Su producción anual varía de 590 a 680 kg de leche por lactancia. El peso en la hembra es de 60 kg y de 80 kg en el macho. Algunas personas la equiparan, por su resistencia al ganado cebú dentro de los bovinos (Díaz y Ochoa 1996).

La producción de bovinos se comercializa principalmente en la capital del estado, los ovinos en el Distrito Federal y los caprinos en el mercado regional de Matehuala. La zona norte se caracteriza por la caprinocultura extensiva. El pastoreo se realiza en matorrales de lechuguilla y gobernadora. Predominan razas criollas, encastadas con Nubia, recientemente se introdujo la raza Boer.

A la raza Boer se le conoce también como Africander, Afrikaner, cabra común de Sudáfrica. Esta raza es un tipo indígena mejorado con influencia de algunas razas europeas, cabras Angora y cabras índicas. El nombre de la raza se deriva de la palabra holandesa "boer" que significa granja y se usó probablemente para distinguir las cabras nativas de Sudáfrica de las cabras Angora importadas durante el siglo XIX. El tipo actual de Boer apareció a principios de este siglo cuando granjeros de la provincia este del Cabo comenzaron a seleccionarla como un tipo de carne. El registro sudafricano se estableció en 1959. Desde 1970, la cabra

Boer está incorporada en el Programa Nacional de Registro Productivo de Ovinos y Caprinos, siendo la primera raza caprina en estar incluida en un programa de prueba de rendimiento. La Boer es una cabra primariamente de carne con varias adaptaciones a las regiones en las cuales se ha desarrollado. Tiene cuernos, las orejas caídas, y muestra una variedad de patrones de colores.

El destino de la producción tiene dos vías: el ganado adulto se destina hacia Jalisco, México, Guerrero y Puebla; el cabrito se destina hacia el estado de Nuevo León. En la zona media predomina el ganado caprino de razas criollas encastados con Nubia; el pastoreo se realiza en matorrales y gobernadora y bosques de encino. El destino de la producción es el consumo local, aunque los caprinos se comercializan en el mercado regional de Matehuala. La Huasteca se caracteriza por la producción bovina y no caprina.

La población caprina se encuentra localizada principalmente en zonas áridas y semiáridas explotándose más en las zonas Media y Altiplano del estado. Los principales productos caprinos son la carne (cabritos) y la leche para la elaboración de queso y dulces. La producción de carne se comercializa principalmente en cabritos en pie cuyo destino de consumo son Monterrey, Guadalajara y el Distrito Federal. No obstante, San Luis Potosí pasó de ser el primer productor caprino en 1990 con más de 1,200,000 cabezas a ocupar el tercer lugar nacional con menos de 960,000 animales debido a que los sistemas de producción caprina predominantes, la ganadería extensiva y semi-extensiva, ocasionan que la mayoría de los apareamientos en el ganado se den en el campo, con escaso o nulo control y propician la ausencia de registros de paternidad confiables, lo que trae como consecuencia la disminución en el control y calidad reproductiva y en el valor económico del animal. El programa de Ganado Mejor ha sido un factor muy importante que ha permitido el mejoramiento genético de los hatos en general y aplicándose a cabras se prevé que el crecimiento de la

ganadería caprina se mantendrá por lo menos al mismo nivel en los próximos años ([www.siea.sagarpa.gob.mx](http://www.siea.sagarpa.gob.mx)).

La caprinocultura mejoraría sustancialmente con programas de mejoramiento genético que incrementen la producción y la productividad ganadera, los cuales requieren:

1. La identificación y selección de animales genéticamente sobresalientes que transmitan sus cualidades a la descendencia y
2. Sistemas de pedigrí que aseguren un progreso suficiente y eviten la endogamia excesiva.

Este trabajo atiende al segundo aspecto y pretende iniciar un sistema de pedigrí basado en el uso de la huella genética de microsatélites en el ganado caprino. Se realizó también para subsanar la falta de información que hay en el país y en nuestra entidad sobre la genética molecular y en particular sobre las pruebas de paternidad en caprinos.

Esperamos que esta información sea útil para apoyar futuros programas de mejoramiento genético, y otorgue ventajas a los ganaderos entre las cuales se encuentran:

1. Pastar varios sementales en el mismo campo, al permitir una identificación individual precisa de las crías.
2. Requerir una sola prueba por animal.
3. Facilitar la compra-venta de animales garantizados.
4. Facilitar acciones legales en casos de robo, muerte y otros aspectos de medicina forense.

### 3. Descripción del trabajo

Desarrollamos un sistema de huella genética para ganado caprino basado en la amplificación de microsatélites, y probamos su utilidad mediante la comparación de las huellas genéticas obtenidas en individuos de tríos conocidos (i.e., padre, madre, hijo) de dos diferentes razas caprinas.

El trabajo se desarrolló en seis etapas:

1. La primera en colaboración con el Centro de Selección y Reproducción Caprina del Estado de San Luis Potosí que, con la finalidad de estandarizar la técnica, nos proporcionó las muestras de animales con registro confiable de montas.
2. La segunda etapa implicó la selección del método más rápido y adecuado para la obtención del material genético de cada animal.
3. La tercera etapa consistió en amplificar los microsatélites de cada animal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estandarizamos las condiciones para ocho primers específicos de locus microsatélites caprinos (SR CRSP), concentración de  $MgCl_2$  y temperatura de alineamiento.
4. En la cuarta etapa separamos los productos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida para encontrar las condiciones apropiadas para visualizar y analizar los alelos de microsatélites amplificados en cada muestra.
5. En la quinta etapa capturamos las huellas genéticas de los animales estudiados mediante un fotodocumentador con el software Quantity One (versión 4.5 de Bio Rad) que permitió analizar los alelos de microsatélites encontrados.
6. Con los alelos amplificados determinamos el perfil de cada individuo y comparamos los resultados con los registros de paternidad del hato control de las razas Nubia y Boer incluidas en el estudio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo fue iniciado en marzo del 2003 y concluyó en mayo del 2004 en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), en colaboración con el Centro de Selección y Reproducción Caprina de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Estado de San Luis Potosí, ubicado en el municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

### **Selección y obtención de muestras**

Para la selección del hato utilizamos el método no probabilístico de conveniencia (Thrusfield, 1995), incluyendo animales que contaban con registro exacto de montas para estandarizar las técnicas de laboratorio. Un total de 20 animales fueron muestreados: 8 hembras, 8 crías, 4 sementales. Raza Nubia: 4 hembras, 4 crías, 1 semental. Raza Boer: 4 hembras, 4 crías, 3 sementales. De cada animal se tomaron 3 ml de sangre mediante venipunción yugular con un tubo vacutainer adicionado con etilendiamino-tetraetil acetato de potasio. Las muestras fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio y almacenadas a -16°C hasta el momento de ser usadas.

### **Extracción del DNA**

Para la extracción del DNA utilizamos tres métodos: 1) el de Miller et al. (1998), 2) el de Miller con un lavado final con fenol y 3) UltraClean DNA BloodSpin (MO BIO Laboratories, Inc No. de catalogo 12200-S). El DNA purificado fue disuelto en TE (Tris-HCl 10Mm pH 7.5, EDTA 1mM pH 8) y almacenado a -16°C.

## PCR

Los oligonucleótidos (“primers”) utilizados se indican en la Tabla 1. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador TECHNE “Touchgene gradient”, bajo el siguiente programa: 95°C por 2 min; 35 ciclos que constaron de: desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 50°C, 52°C o 55°C por 60 seg, extensión a 70°C por 60 seg y extensión final de 70°C por 5 min (Innis *et al.*, 1999). Los datos de los primers se puntualizan en los anexos A, B y D. Todos los reactivos utilizados para PCR fueron adquiridos de *InVitrogen*.

## Análisis de los productos de PCR

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en cámaras de electroforesis Protean II (Bio Rad), utilizando TBE (Tris-HCl 0.9M, Ácido bórico RA H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.88M, EDTA 2mM pH 8) como amortiguador de corrida. El buffer de carga fue preparado con formamida (formamida 96%, xilen-cianol 2% y orange G 2%). Las corridas iniciaron con 200 volts por 10 min. y se mantuvieron a 175 volts por 120 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 15 min. Las bandas fueron detectadas por transiluminación UV con el fotodocumentador Gel Doc EQ (Bio Rad) equipado con el software Quantity One (versión 4.5). El cálculo del tamaño de las bandas se hizo por comparación con una colección de bandas que difieren en tamaño en 50 pares de bases (Fermentas life sciences).



---

## RESULTADOS

### Extracción de DNA

Para obtener el DNA para la PCR probamos tres métodos de extracción: el de Miller (1998), Miller-Fenol, y Mo Bio Kit. Obtuvimos el DNA de suficiente calidad con el Mo Bio Kit y Miller-fenol, pero mas eficientemente con el Mo Bio Kit a partir de muestras mas pequeñas (Tabla 2).

La extracción con el Mo Bio Kit nos permitió obtener DNA de suficiente calidad para la amplificación por PCR y lo utilizamos para el resto del trabajo.

### PCR

A fin de establecer la concentración óptima de  $MgCl_2$  para las diferentes parejas de primers llevamos a cabo la PCR con una sola muestra de DNA, variando la concentración de esa sal en el rango de 0.5 a 4.0mM. Con las parejas de primers 3 y 9 elegidas para esta prueba, observamos un incremento en el número de bandas al aumentar la concentración de  $MgCl_2$  (Figuras 1 y 2). La concentración recomendada por Arévalo *et al.* (1994) (1.5 mM de  $MgCl_2$ ) resultó adecuada para la PCR.

También probamos si el uso de enzimas diferentes afectaba el patrón de bandas amplificadas. Las dos enzimas utilizadas Taq DNApol<sup>®</sup> y Taq Platinum<sup>®</sup> (*InVitrogen*) generaron un patrón de bandas similar con la misma muestra de DNA caprino M94 y dos parejas de primers (Figura 3). Para las reacciones subsecuentes empleamos solamente Taq Platinum<sup>®</sup>.

Para establecer las condiciones de la PCR con los primers seleccionados, probamos la temperatura de alineamiento (annealing) de cada pareja, mediante un gradiente basado en las temperaturas recomendadas para los primers SR CRSP (Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994) (Anexo C). Un total de diez temperaturas

(48.8; 50.1; 51.8; 53.5; 55.2; 56.4; 58.4; 60.3; 62 y 63.6°C) fueron probadas para cada pareja de primers utilizando DNA caprino del macho P52 de raza Nubia.

Para la pareja de primers SR CRSP-1 el mejor patrón de bandas lo obtuvimos a 50°C y 48°C (Figura 4). Con las parejas de primers SR CRSP -2, -3 y -9 observamos una disminución en la intensidad de las bandas al aumentar la temperatura de alineamiento (Figuras 4 y 5). Para las parejas SR CRSP-5 y -6, el patrón de las bandas amplificadas no cambió significativamente al variar la temperatura (Figura 5). Nosotros consideramos el rango térmico de 48.4°C a 53.5°C, como apropiado para la amplificación de las parejas SR CRSP-2, -3 y -9, y un rango de 50.1°C a 58.4°C para las parejas SR CRSP-5 y -6,(Figura 5). Para todas las parejas mencionadas decidimos trabajar con la temperatura recomendada por Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994. Con la pareja SR CRSP-4 observamos bandas en número e intensidad decreciente al aumentar la temperatura y solamente 48.4°C, 50.1, y 51.8°C fueron consideradas convenientes, para no seleccionar las temperaturas de los extremos decidimos utilizar 50.1°C como temperatura de alineamiento la cuál es diferente a la recomendada por Arévalo *et al.* (1994)

Tomando como referencia las temperaturas recomendadas en estudios previos para llevar a cabo la amplificación de microsatélites en el ganado caprino (Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994) (Anexo C), definimos las temperaturas adecuadas para todas las parejas de primers SR CRSP bajo nuestras condiciones experimentales y modificamos ligeramente una de las temperaturas, la correspondiente a la pareja SR CRSP-4 (Tabla 3).

### **Alelos microsatélites obtenidos con las parejas SR CRSP**

Para identificar los alelos microsatélites generados con las parejas SR CRSP, las muestras amplificadas fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 8% (19:1). (Anexo B). Adecuamos las condiciones para obtener una resolución de bandas

suficiente que nos permitiera optimizar el proceso de identificación de los alelos en nuestra muestra.

Colocamos 10  $\mu$ l de cada muestra más 7  $\mu$ l de buffer de carga preparado con formamida al 96%. La corrida inicial fue a 300 volts por 10 min. Transcurrido este tiempo bajamos el voltaje a 175 volts por 120 min.

Identificamos los alelos de microsatélites para los hatos caprinos de las dos razas incluídas en el trabajo a partir de los patrones de bandas específicos para cada animal según la pareja de primers SR CRSP utilizada (Figuras 6-12).

Analizamos las bandas para determinar cuántos y de qué tamaño eran los alelos de microsatélites amplificados con los diferentes primers para las dos razas examinadas, considerando bandas iguales las que presentaban una diferencia de  $\pm 3$  pb (margen de incertidumbre = 5%, estimada con el programa Quantity One de Bio Rad). Los resultados indicaron la presencia de cinco alelos con las parejas de primers SR CRSP-3, -4 y -5. El mayor número de alelos fue de 11 con la pareja SR CRSP-1. Seis, siete y nueve alelos de microsatelites fueron amplificados con las parejas SR CRSP-2, -6 y -9, respectivamente. (Tabla 4). El tamaño de los alelos varió según la región amplificada; encontramos los alelos de menor tamaño para el locus 3 ((TG)<sub>6</sub>(TA)<sub>2</sub>(TG)<sub>11</sub> TTT(GT)<sub>3</sub>) y los de mayor tamaño para el locus 4 ((GT)<sub>17</sub>) (Tabla 4).

Para definir los alelos microsatélites, compararlos y corroborar la paternidad ya conocida de las crías analizadas, ordenamos los datos por raza y pareja de primers (Tablas 5 y 6).

En la raza Nubia, con la pareja de primers 1 los alelos tuvieron tamaños de 133, 139, 141, 143, 147 y 152 pb. Con la pareja 5 los alelos fueron de 165, 175, 179 y 185 pb y con la pareja 6 de 141, 150, 157, 159, 162 y 169 pb. Las tres parejas anteriores nos permitieron corroborar la paternidad para todos los tríos analizados (Tabla 5). Con la pareja de primers 2 los alelos fueron de 145, 152, 163 y 169 pb, y con la pareja 4 fueron de 184, 194, 199, 208 y 216 pb. Los resultados obtenidos con estas parejas también concuerdan con los registros de paternidad y nos permiten corroborarla en todos los tríos, pero se presentaron tres casos en

dónde las crías fueron homocigotas, los primeros dos casos resultaron para la cría del trío 1 que fué homocigota para los alelos de 163 y 194pb amplificados con las parejas de primers 2 y 4 respectivamente. El tercer caso resultó para el alelo de 194pb amplificado también con la pareja 4 en la cría del trío 9. Con las parejas de primers restantes los tamaños de 114 y 124 pb fueron registrados para la pareja 3 de primers mientras que 133, 136, 140 y 145 pb se registraron con la pareja 9. Con ambas parejas sólo en dos casos logramos determinar cuál alelo procedía del padre y cuál de la madre, ya que en el resto, aunque estaban presentes los alelos de ambos progenitores, no logramos determinar de quién procedía cada alelo, ya que los dos alelos microsatélites amplificados en la cría son iguales a los amplificados en los padres (Tabla 5).

En la raza Boer, los alelos de microsatélites con la pareja 1 fueron de 141, 145, 152, 154, 158, 164 y 165 pb y con la pareja 6 de 150, 154, 157, 159, 162 y 169 pb; con estas dos parejas los casos analizados concordaron con los registros de paternidad, pero en tres de los casos los dos alelos registrados para la cría eran del mismo tamaño que los registrados para el padre y la madre, como se observó en los tríos 2 y 6 con la pareja de primers 1 y en el trío 7 con la pareja de primers 6. Con la pareja 2 los alelos fueron de 143, 145, 152, 157, 163 y 169 pb, mientras que para la pareja 3 fueron de 118, 119, 124 y 132 pb y aunque en todas las crías estuvieron presentes los alelos paternos y maternos no fue posible determinar cuáles procedían del padre y cuáles de la madre.

Con la pareja 4 los alelos fueron de 184, 194, 199, 208 y 216 pb; los resultados obtenidos concuerdan con el registro de paternidad, pero sólo en el trío 10 pudimos determinar la procedencia de los alelos de ambos progenitores, mientras que las crías de los tríos 2 y 4 portaban los mismos alelos que los progenitores, restando la cría del trío 6 homocigota para el alelo de 194 pb. Fueron amplificados alelos de 158, 165, 175, 179 y 185 pb con la pareja 5 y de 122, 125, 128, 130, 133, 136, 140 y 145 pb con la pareja 9 y en todas las crías encontramos la presencia de los alelos paternos; solo los alelos amplificados con

la pareja 9 en el trío 7 fueron de igual tamaño en el padre, en la madre, y en la cría, y nos resultaron tres casos discordantes en el alelo materno en los tríos 4 y 6 amplificados con la pareja 9, y en el trío 2 amplificado con la pareja 5, debido a que la pobre definición de las bandas con estas parejas en las muestras maternas impidió realizar la correcta lectura del tamaño de los alelos. (Figura 10) (Tabla 6).

### **Análisis comparativo**

Realizamos un análisis comparativo para determinar si los alelos encontrados en las crías correspondían a los alelos de los progenitores, y si eran útiles para el diagnóstico de paternidad de las crías analizadas.

En ambas poblaciones encontramos casos donde no logramos definir con exactitud cuál de los alelos presentes en la cría era el paterno, aunque los resultados no son discordantes con la paternidad. Este fenómeno podría deberse a la alta endogamia existente en la muestra la cuál limita la variabilidad de los alelos.

En la raza Nubia todos los resultados obtenidos concuerdan con los registros de paternidad. En la raza Boer los resultados fueron mas ambiguos y aunque permitieron corroborar la paternidad, los tres casos que resultaron indeterminados con las parejas 5 y 9 disminuyen la precisión del análisis. Estos resultados indican que los marcadores microsatélites utilizados para este estudio son más útiles para el diagnóstico de paternidad en la raza Nubia que en la raza Boer. (Tabla 7)

El análisis también nos indicó que aunque las muestras fuesen amplificadas con la misma pareja de primers, los alelos obtenidos variaban de tamaño según la raza. Con la pareja 1 fue notorio encontrar alelos de mayor tamaño en la raza Boer que en la Nubia. Las dos razas sólo comparten dos alelos (el 1.141 y el 1.152 pb), lo cual sugiere que la pareja 1 amplifica un mayor número de alelos microsatélites.

Los resultados con las demás parejas de primers indican la presencia de alelos diferentes en la raza Boer que en la raza Nubia utilizando la misma pareja de primers, a excepción de la pareja 4 que genera alelos comunes en las dos razas (Tabla 8).

Al comparar los alelos encontrados en este estudio con los descritos por Arévalo *et al.* (1994) y Bhebhe *et al.* (1994) encontramos que con las parejas de primers 1, 2, 3, 6 y 9 se obtienen alelos únicos de la raza Boer y con las parejas de primers 1, 3 y 6 alelos únicos de la raza Nubia. Sin embargo, mientras que en nuestras muestras no resultaron alelos únicos con las parejas 4 y 5, Arévalo *et al.* (1994) y Bhebhe *et al.* (1994) sí encontraron algunos diferentes a los nuestros; sin embargo es difícil establecer la relevancia de estas comparaciones ya que dichos autores no especifican las razas con las que trabajaron (Tabla 9). Estos datos sugieren que el análisis de un mayor número de animales podría permitirnos establecer con certeza si los alelos considerados como únicos pueden diferenciar estas razas.

En otra comparación que realizamos con los datos de Arévalo *et al.* (1994) y Bhebhe *et al.* (1994) encontramos que los loci microsatélites amplificados por nosotros con la mayoría de las parejas de primers, se encuentran dentro del tamaño esperado, pero son diferentes a los descritos. Por otra parte, los alelos amplificados con la pareja 4 fueron de mayor tamaño a los esperados, y de todos los alelos encontrados solamente los de 150 y 133pb amplificados con la pareja 6 y 9, respectivamente, resultaron ser comunes en los tres grupos que comparamos. Encontramos también que alelos que ya se habían reportado eran comunes en el hato de raza Boer, pero no en el de raza Nubia (Tabla 9).

## DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó al establecimiento de un sistema de pedigree basado en la huella genética de microsatélites para el ganado caprino de las dos razas de mayor importancia en San Luis Potosí: la Nubia y la Boer.

La extracción del DNA con el Mo Bio kit fue más rápida y dió los mayores rendimientos.

La concentración de magnesio y la temperatura de alineamiento fueron analizadas para todos los primers SR CRSP. Confirmamos que la concentración óptima de  $MgCl_2$  es 1.5 mM. Las temperaturas fueron corroboradas en su mayoría, pero para la pareja 4 de primers 50°C resultó la mejor temperatura y difiere 2°C de la recomendada por otros autores (Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994).

Amplificamos alelos de microsatélites en todos los tríos con todas las parejas de primers SR CRSP utilizadas. La información generada nos permitió confirmar la paternidad de los tríos analizados. Hubo tres resultados contradictorios en la raza Boer, con las parejas 5 y 9; en estos tres casos la ausencia del alelo materno sugiere un error en el registro de tamaños de bandas y la resolución de los alelos en el gel no permitió la lectura correcta de las bandas.

Los patrones electroforéticos obtenidos por nosotros implican la amplificación de más alelos de microsatélites en la raza Boer que en la Nubia, y sugieren que los patrones obtenidos con animales de raza Nubia serán más confiables.

También encontramos casos con alelos de ambos progenitores y no pudimos determinar cuál alelo procedía del padre y de la madre. Esto ocurrió principalmente con las parejas de primers 2, 3 y 4 y podría explicarse de dos maneras alternas:

- 1) La primera es que aunque nosotros no reportamos el índice polimórfico y las frecuencias alélicas con las parejas de primers empleadas, estos datos han sido reportados por otros autores y los loci de microsatélites son considerados monomórficos en la muestra caprina descrita por Arévalo *et al.* (1994) lo cual significa que la población caprina analizada por nosotros con las parejas de primers 2, 3 y 4 tiene patrones monomórficos para los loci amplificados.
- 2) Las muestras pertenecen al Centro de Selección y Reproducción Caprina del estado, en donde a pesar de contar con un registro de montas no podemos descartar que los resultados similares puedan deberse a la endogamia. Es decir, dentro del registro existen animales emparentados, crías medios hermanos, lo cual no descarta la posibilidad de tener también hembras medias hermanas cruzadas con el mismo semental. Estos hechos son de importancia, porque las huellas genéticas obtenidas por nosotros detectan una endogamia más pronunciada en el hato de raza Boer que en el de la raza Nubia.

Al comparar los alelos de ambas razas con los reportados en otras poblaciones (Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994) encontramos 11 alelos únicos de la raza Boer y 7 de la raza Nubia. Esta diferencia puede ser explicada porque las huellas genéticas de los animales indicaron la existencia de más alelos microsatélites en la raza Boer que en la Nubia. Esta idea podrá ponerse a prueba analizando una muestra mayor de animales de cada raza, y menos emparentada que la analizada aquí.

Alelos encontrados en nuestras muestras han sido reportados por otros autores (Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994) pero para las parejas 1, 4 y 5 ningún alelo encontrado por nosotros es igual a los reportados. También confirmamos que el intervalo de tamaños de los alelos conocidos coincide con el encontrado por nosotros, con excepción de los loci de la pareja 4 donde los alelos que obtuvimos fueron de menor tamaño que los descritos. La explicación mas



simple de estas diferencias sería la disimilitud real de tales loci en los animales de nuestra muestra.

Con el método que hemos establecido se puede iniciar el diagnóstico de paternidad con muestras de tríos no registrados, y obtener las frecuencias alélicas y los índices polimórficos de los alelos detectados en este estudio en hatos de las mismas razas que no estén tan cercanamente emparentados, así como también iniciar el mapeo de marcadores microsatélites relacionados con la productividad de los animales.

Este trabajo representa el primer paso para el uso de la huella genética de microsatélites en un sistema de pedigree del ganado caprino en el estado de San Luis Potosí, y abre el camino para generar información local y regional sobre los microsatélites útiles para este efecto. Esta información será útil en programas de mejoramiento genético, con ventajas para los ganaderos y para nuestra entidad.

---

## Referencias

1. Allen RW, Traver M. DNA analysis in paternity case involving a triploid fetus. *Transfusion* 40(2): 240-244, 2000
2. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc. 1994: 519
3. Alvarez L, Arranz J, Hernández D, Dávila B. Análisis del cromosoma 6 para regiones genómicas con influencia sobre caracteres de producción de leche en la población española de frisona (online). 2000:1-3, Disponible en: <http://www.google.com.mx/search?hl=es&ie=UTF8&q=Weller+2000+y+ganado&btnG=B%C3%BAqueda&meta=pdf>.
4. Arbiza AS. *Producción de Caprinos*. México: AGT Editor 1986:4774
5. Arévalo E, Holder DA, Der JN, Bhebe E, Linn RA, Ruvuna F, Davis S K, Taylor JF. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP 1, SR-CRSP 2, SR-CRSP 3, SR-CRSP 4, and SR-CRSP 5 loci. *Animal Genetics* 25(3): 202, 1994
6. Berumen y Juárez 1999
7. Bhebe E, Kogi j, Holder DA, Arévalo E, Der JN, Linn RA, Ruvuna F, Davis SK, Taylor JF. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP 6, SR-CRSP 7, SR-CRSP 8, SR-CRSP 9, and SR-CRSP 10 loci. *Animal Genetics* 25(3): 203, 1994
8. Chakraborty R, Stivers DN. Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations. *Journal Forensic Science* 41(4): 671-677, 1996
9. Díaz GMO, Ochoa C. *Pequeños Rumiantes: Razas Caprinas*. ISBN-968-6194-99-19, México: Editorial Universidad Autónoma de San Luis Potosí 1996:9-10
10. Ferreira E and L, Monteagudo V. Populations genetics and paternity in breed aragonesa sheep using DNA fingerprinting. *Rev Vet Sci* 67(1): 2326, 1999

11. Gerluff U, Hartung B. Intracommunity relationships, dispersal pattern and paternity success in a wild living community of bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of fecal sample. Proc R Soc Lond Biol Sci 266(1424):1189-1195, 1999
12. Gomez J, Carracedo A. The 1998-1999 collaborative exercises and proficiency testing program on DNA typing of the Spanish and Portuguese working group of the international society for forensic genetics. Forensic Science International 114(1): 21-30, 2000
13. Gunn PR, Trueman K. DNA analysis in disputed parentage: the occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat (STR) loci, in the on child. Electrophoresis 18(9):1650-1652, 1997
14. Innis A. Michael, Gelfand H, Sninsky J. (1999) PCR Applications. Ed Academic Press EU. Pp. 355-364
15. Iolchiev BS. Genetics markers at goats. 2001, [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) (consulta: 4/IV/03)
16. Israel, C. Weller, J. I. Effect of Misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. The American Dairy Science Association 83:181-187, 2000
17. Koskinen MT. Microsatellite-based population structures within and between five Finnish dog breeds. 2001, [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) (consulta: 4/IV/03)
18. Luikart G, Biju-Duval MB, Ertugrul O, Zagdsuren Y, Maudt C, Taberlet P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplex for parentage testing in goats (*Capra hircus*). Animal Genetics 30:431-438, 1999
19. Miller, S.A. Dykes, D. D. Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16:1216, 1998

- 
20. Murray KR, Granner KD, Mayes AP, Rodwell WP. Bioquímica de Harper. México: Manual Moderno 2001:461 – 480
  21. Nechtelberger, C. Kaltwasser, I. Stur, J.-N. Meyer, G. Brem, M. Muller and S. Mueller. *Animal Biotechnology* 12(2):141-144, 2001
  22. Nurberg P, Saverman U. Paternity assessment in rhesus macaque (*Macaca mulatta*): multilocus DNA fingerprinting and PCR marker typing. *Am J Primatol* 44(1):1-8, 1998
  23. Pineda BL. DNA analysis for paternity testing and forensic identification. *Acta Científica Venezolana* 50(1):24-28, 1999
  24. Rouger P, Van Huffel. DNA polymorphism and paternity exclusions: analysis of 543 cases of paternity testing. *Transfus Clin Biol* 3(5):273-278, 1996
  25. Russel L ND, Ríos J, Erosa G. Genetic differentiation among geographically isolated populations of criollo cattle and their divergence from other *Bos taurus* breeds. *Journal of Animal Science* 78:2314-2322, 2000
  26. SAGARPA FEDERAL [www.siea.sagarpa.gob.mx](http://www.siea.sagarpa.gob.mx)
  27. SAGARPA SLP, [www.siea.sagarpa.gob.mx](http://www.siea.sagarpa.gob.mx)
  28. Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff. Genetic diversity in swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics* 30:36-41. 1999
  29. Stahlberg R, Harlizius B. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology* 53(6):1365-1373, 2000
  30. Tautz D. Hypervariability of sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471, 1989
  31. Thrusfield J. *Veterinary Epidemiology*. Blackweel Science. Second Edition. UKD: 1995:178-180

- 32.** Van Marle-Koster, L H Evans N. Genetic characterization of native southern African chicken populations: evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers. South African Journal of Animal Science 30:1-6, ISSN: 0375-1598, 2000
- 33.** Zajc I, Sampson J. DNA microsatellites in domesticated dogs: application in paternity disputes. Pflugers Arch 431(6):201-202, 1996
- 34.** Zhao S, Yang L. Analysis of genetic variation among five Chinese indigenous goat breeds by the next occurrence of each using bovine and ovine microsatellite. 2001, [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) (consulta: 4/IV/03)

Tabla 1. Tríos caprinos empleados

Trío	Raza	Padre	Madre	Cría	
				No.	Sexo <sup>a</sup>
1	NUBIA	P52	P20	17	H
8	NUBIA	P52	P35	15	M
9	NUBIA	P52	P1	23	M
10	NUBIA	P52	P38	10	H
4	BOER	S583	M99	7	H
6	BOER	S583	N171	13	H
2	BOER	641	M88	9	M
7	BOER	S604	N162	5	H

<sup>a</sup> M, macho. H, hembra

**Tabla 2. Rendimiento de DNA con tres métodos de extracción**

<b>Método</b>	<b>Muestras</b>	<b>Rendimiento</b>	
		<b>mg/ml de sangre</b>	<b>Relativo</b>
Miller	6	6.1	1.00
Miller-fenol	6	6.4	1.05
MO BIO kit	20	52.0	8.52

**Tabla 3. Secuencias de los primers, contenido de GC y temperaturas de annealing para la PCR<sup>a</sup>**

<b>Primer SR CRSP</b>	<b>Secuencia (5' ? 3')</b>	<b>%GC</b>	<b>Alineamiento °C</b>
1*1	TGCAAGAAGTTTTCCAGAGC	43	50
1*2	ACCCTGGTTTCACAAAAGG	47	50
2*1	TGCTGTATCCTGTGTAATATCTT	35	52
2*2	GCATAAACAGATTATTGTGATGAT	29	52
3*1	CGGGGATCTGTTCTATGAAC	50	55 <sup>b</sup>
3*2	TGATTAGCTGGGTGAATGTCC	48	55 <sup>b</sup>
4*1	CTTCACCTCTACTCCCCAGTCAA	52	50 <sup>b</sup>
4*2	CCTCCGACAAAGGAATGTAGCCT	52	50 <sup>b</sup>
5*1	GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG	50	55
5*2	TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	36	55
6*1	CATAGTTCATTCACAATATGGCA	35	52
6*2	CATGGAGTCACAAAGAGTTGAA	41	52
9*1	AGAGGATCTCTGGAAATGGAATC	44	50
9*2	GCACTGTTTTTCAGCCCTAATG	48	50

<sup>a</sup> Mezclas de reacción con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Concentración recomendada)

<sup>b</sup> Diferentes de las recomendadas por Arévalo *et al.* (1994), y Bhebhe *et al.* (1994)



**Tabla 4. Alelos de microsatélites amplificados con primers SRCRSP en el ganado caprino**

<b>Locus</b>	<b>Pareja de primers</b>	<b>Intervalo de tamaños (pb)</b>	<b>No. de alelos</b>	<b>Alelos<sup>a</sup></b>
1. (GT)24	1	133-165	11	1.165, 1.164, 1.158, 1.154, <b>1.152</b> , 1.147, 1.145, 1.143, <b>1.141</b> , 1.139, 1.133
2. (TG)15TGG(TG)2	2	143-169	6	<b>2.169</b> , <b>2.163</b> , 2.157, <b>2.152</b> , <b>2.145</b> , 2.143
3. (TG)6(TA)2(TG)11 TT(GT)3	3	114-132	5	3.132, <b>3.124</b> , 3.119, 3.118, 3.114
4. (GT)17	4	184-216	5	<b>4.216</b> , <b>4.208</b> , <b>4.199</b> , <b>4.194</b> , <b>4.184</b>
5. (AT)4(GT)16AT(GT)3	5	158-185	5	<b>5.185</b> , <b>5.179</b> , <b>5.175</b> , <b>5.165</b> , 5.158
6. (GT)15	6	141-169	7	<b>6.169</b> , <b>6.162</b> , 6.159, <b>6.157</b> , <b>6.150</b> , 6.154, 6.141
9. (GT)5(CA)16CG(CA)3	9	122-145	8	<b>9.145</b> , <b>9.140</b> , <b>9.136</b> , <b>9.133</b> , 9.130, 9.128, 9.125, 9.122

<sup>a</sup> El nombre del alelo se forma con el número de la pareja de primers utilizada seguido del punto el tamaño del alelo (pb). Las negritas indican alelos de igual tamaño en ambas razas.

Tabla 5. Alelos de microsatélites registrados en el hato de raza Nubia

Trío 1			Trío 8			Trío 9			Trío 10		
P	M	C	P	M	C	P	M	C	P	M	C
P52	P20	017	P52	P35	015	P52	P1	023	P52	P38	010
1.133	1.139	1.139 <sup>a</sup>	1.133	1.139	1.133 <sup>b</sup>	1.133	1.133	1.141 <sup>a</sup>	1.133	1.133	1.133 <sup>b</sup>
1.152	1.133	1.133 <sup>b</sup>	1.152	1.147	1.139 <sup>a</sup>	1.152	1.141	1.152 <sup>b</sup>	1.152	1.143	1.143 <sup>a</sup>
2.163	2.163	2.163 <sup>c</sup>	2.163	2.169	2.169 <sup>a</sup>	2.163	2.169	2.169 <sup>a</sup>	2.163	2.169	2.169 <sup>a</sup>
2.145	2.145		2.145	2.145	2.145 <sup>b</sup>	2.145	2.145	2.145 <sup>b</sup>	2.145	2.152	2.145 <sup>b</sup>
3.114	3.114	3.114 <sup>a</sup>	3.114	3.114	3.114 <sup>d</sup>	3.114	3.114	3.114 <sup>d</sup>	3.114	3.114	3.114 <sup>d</sup>
3.124		3.124 <sup>b</sup>	3.124	3.124	3.124 <sup>d</sup>	3.124	3.124	3.124 <sup>d</sup>	3.124	3.124	3.124 <sup>d</sup>
4.194	4.194	4.194 <sup>c</sup>	4.194	4.194	4.194 <sup>b</sup>	4.194	4.194	4.194 <sup>c</sup>	4.194	4.184	4.184 <sup>a</sup>
			4.216	4.208	4.208 <sup>a</sup>	4.216	4.216	4.199	4.216		4.216 <sup>b</sup>
5.165	5.175	5.165 <sup>b</sup>	5.165	5.175	5.175 <sup>b</sup>	5.165	5.175	5.165 <sup>b</sup>	5.165	5.165	5.175 <sup>b</sup>
5.175	5.179	5.179 <sup>a</sup>	5.175	5.185	5.185 <sup>a</sup>	5.175	5.185	5.175 <sup>a</sup>	5.175	5.179	5.179 <sup>a</sup>
6.150	6.157	6.150 <sup>b</sup>	6.150	6.150	6.150 <sup>a</sup>	6.150	6.141	6.141 <sup>a</sup>	6.150	6.150	6.150 <sup>a</sup>
6.162	6.169	6.157 <sup>a</sup>	6.162	6.157	6.162 <sup>b</sup>	6.162	6.162	6.162 <sup>b</sup>	6.162		6.162 <sup>b</sup>
9.133	9.133	9.133 <sup>c</sup>	9.133	9.140	9.133 <sup>b</sup>	9.133	9.133	9.133 <sup>d</sup>	9.133	9.133	9.133 <sup>d</sup>
9.140	9.145	9.136	9.140	9.145	9.140 <sup>a</sup>	9.140	9.140	9.140 <sup>d</sup>	9.140	9.140	9.140 <sup>d</sup>

P, padre. M, madre. C, cría.

<sup>a</sup> alelo procedente de la madre

<sup>b</sup> alelo procedente del padre

<sup>c</sup> animal homocigoto para el alelo

<sup>d</sup> alelo procedente del padre, la madre o ambos

Tabla 6. Alelos de microsatélites registrados en el hato de raza Boer

Trío 2			Trío 4			Trío 6			Trío 7		
P 641	M M88	C 9	P S583	M M99	C 7	P S583	M N171	C 13	P S604	M N162	C 5
1.141	1.141	1.141 <sup>d</sup>	1.158	1.152	1.158 <sup>b</sup>	1.158	1.158	1.158 <sup>d</sup>	1.145	1.154	1.154 <sup>b</sup>
1.152	1.152	1.152 <sup>d</sup>	1.165	1.165	1.165 <sup>a</sup>	1.165	1.165	1.165 <sup>d</sup>	1.154	1.164	1.164 <sup>a</sup>
2.163	2.163	2.163 <sup>d</sup>	2.157	2.157	2.157 <sup>d</sup>	2.157	2.157	2.157 <sup>d</sup>	2.169	2.169	2.169 <sup>d</sup>
2.145	2.145	2.145 <sup>d</sup>	2.143	2.143	2.143 <sup>d</sup>	2.143	2.143	2.143 <sup>d</sup>	2.152	2.152	2.152 <sup>d</sup>
3.118	3.118	3.118 <sup>d</sup>	3.118	3.118	3.118 <sup>d</sup>	3.118	3.118	3.118 <sup>d</sup>	3.119	3.119	3.119 <sup>d</sup>
3.132	3.132	3.132 <sup>d</sup>	3.132	3.132	3.132 <sup>d</sup>	3.132	3.132	3.132 <sup>d</sup>	3.124	3.124	3.124 <sup>d</sup>
4.194	4.194	4.194 <sup>d</sup>	4.194	4.194	4.194 <sup>d</sup>	4.194	4.184	4.194 <sup>c</sup>	4.184	4.199	4.199 <sup>a</sup>
4.216	4.216	4.216 <sup>d</sup>	4.216	4.216	4.216 <sup>d</sup>	4.216	4.194		4.208		4.208 <sup>b</sup>
5.175	5.158	5.175 <sup>e</sup>	5.179	5.175	5.175 <sup>a</sup>	5.179	5.175	5.175 <sup>a</sup>	5.165	5.175	5.165 <sup>b</sup>
5.179		5.179 <sup>e</sup>	5.185	5.179	5.179 <sup>b</sup>	5.185	5.179	5.179 <sup>b</sup>	5.175	5.185	5.175 <sup>a</sup>
6.159	6.154	6.154 <sup>a</sup>	6.150	6.157	6.157 <sup>a</sup>	6.150	6.157	6.157 <sup>b</sup>	6.150	6.150	6.150 <sup>d</sup>
6.169	6.169	6.169 <sup>b</sup>	6.157	6.169	6.169 <sup>b</sup>	6.157	6.169	6.169 <sup>a</sup>	6.162	6.162	6.162 <sup>d</sup>
9.122	9.133	9.122 <sup>b</sup>	9.122	9.133	9.122 <sup>e</sup>	9.122	9.122	9.128 <sup>e</sup>	9.125	9.125	9.125 <sup>d</sup>
9.133	9.140	9.133 <sup>a</sup>	9.128	9.145	9.128 <sup>e</sup>	9.128	9.130	9.133 <sup>e</sup>	9.136	9.136	9.136 <sup>d</sup>

P, padre. M, madre. C, cría.

<sup>a</sup> alelo procedente de la madre

<sup>b</sup> alelo procedente del padre

<sup>c</sup> animal homocigoto para el alelo

<sup>d</sup> alelo procedente del padre, la madre o ambos

<sup>e</sup> animal discordante en el alelo materno

**Tabla 7. Concordancia de huellas genéticas para los tríos registrados**

Locus	Raza Boer		Raza Nubia	
	Concordantes <sup>a</sup>	Indeterminados <sup>b</sup>	Concordantes <sup>a</sup>	Indeterminados <sup>b</sup>
<b>1</b>	4/4	-	4/4	-
<b>2</b>	4/4	-	4/4	-
<b>3</b>	4/4	-	4/4	-
<b>4</b>	4/4	-	4/4	-
<b>5</b>	3/4	1	4/4	-
<b>6</b>	4/4	-	4/4	-
<b>9</b>	2/4	2	4/4	-
<b>% total</b>	89.93%	10.07%	100%	0%

<sup>a</sup> Numero de crías en las cuales se confirma la paternidad

<sup>b</sup> Número de crías no confirmadas

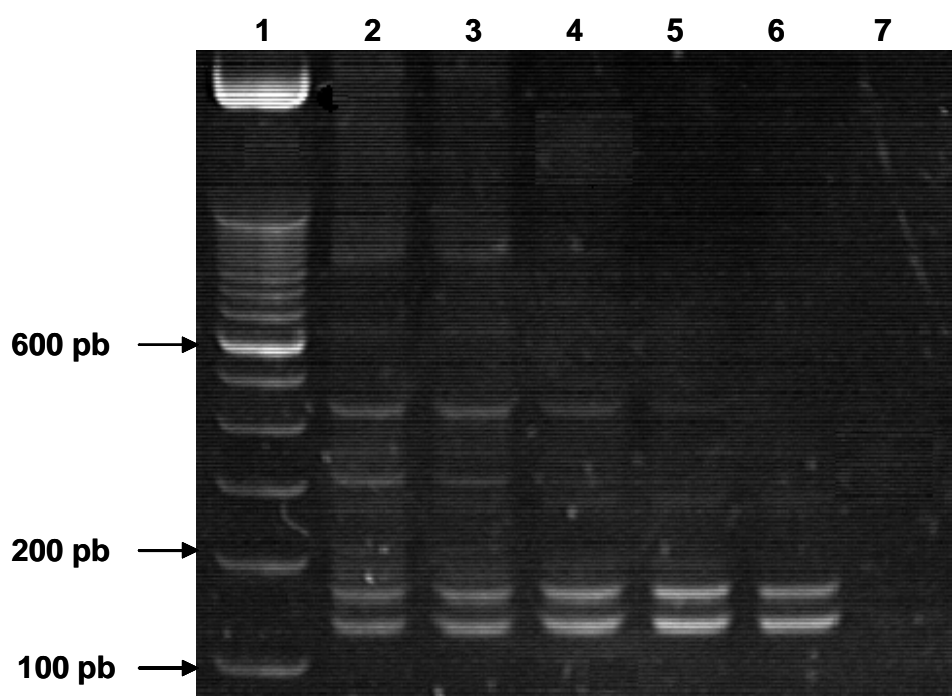
**Tabla 8. Alelos de microsatélites no compartidos y compartidos en hatos de razas Boer y Nubia**

Alelos no compartidos		Alelos compartidos por las dos razas
Raza Boer	Raza Nubia	
1.145, 1.154, 1.158, 1.164, 1.165 2.143, 2.157	1.133, 1.139, 1.143, 1.147 -	1.141, 1.152  2.145, 2.152, 2.163, 2.169
3.119, 3.132 -	3.114 -	3.118, 3.124 4.184, 4.194, 4.199, 4.208, 4.216
5.158	-	5.165, 5.175, 5.179, 5.185
6.154	6.141, 6.159	6.150, 6.157, 6.162, 6.169
9.122, 9.125, 9.128, 9.130	-	9.133, 9.136, 9.140, 9.145

**Tabla 9. Alelos de microsátelites no compartidos y compartidos en hatos de razas Boer, Nubia y los reportados por Arévalo *et al.* (1994)**

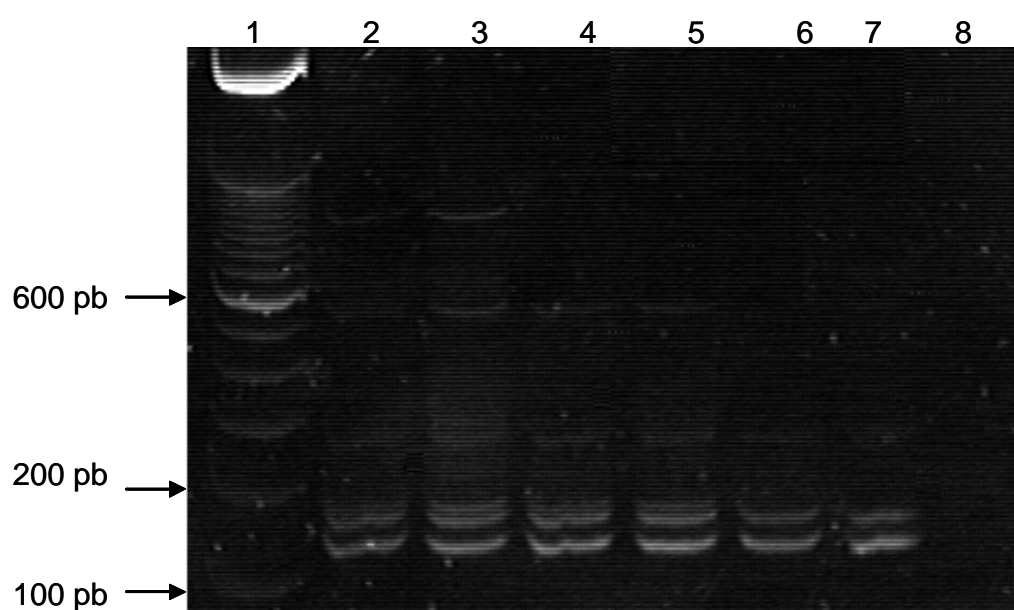
Alelos no compartidos		Alelos compartidos en los tres grupos	
Hato Boer	Hato Nubia	Alelos reportados	
1.145, 1.154, 1.158, 1.164, 1.165	1.133, 1.139, 1.143, 1.147,	1.138, 1.140, 1.142, 1.144, 1.146, 1.148, 1.150	-
2.143, <b>2.157</b> ,	-	2.151, 2.153, 2.155, <b>2.157</b>	-
<b>3.119</b> , 3.132	3.114	3.113, <b>3.119</b>	-
-	-	3.121, 3.123	-
5.158	-	4.249, 4.257, 4.259, 4.263	-
6.154	6.141, 6.159	5.160, 5.164, 5.166, 5.168, 5.170, 5.172, 5.174, 5.180	-
9.122, <b>9.125</b> , 9.128, 9.130,	-	6.136, 6.140, 6.142, 6.144, 6.146, 6.148	6.150
		9.119, 9.123, <b>9.125</b> , 9.127, 9.129, 9.131, 9.135, 9.137, 9.139, 9.141, 9.143	9.133

Las negritas indican los alelos compartidos entre los reportados y el hato de raza Boer.



**Figura 1. Gradiente de concentración de MgCl<sub>2</sub> para la pareja 3 de primers.**

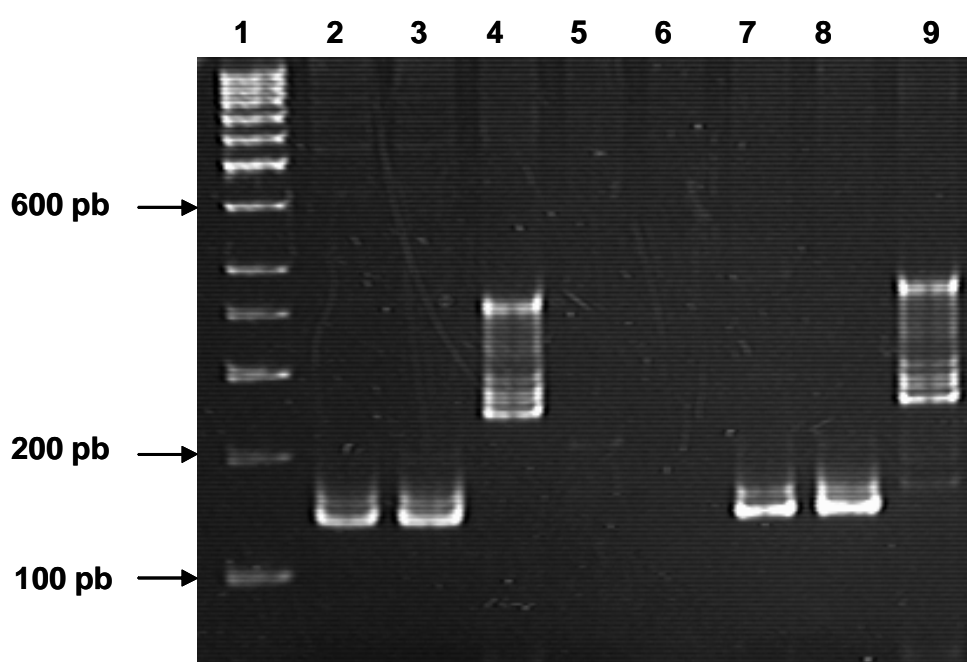
Poliacrilamida al 15% corrida a 65V por 95 min. En todos los carriles 5  $\mu$ l de muestra + 2  $\mu$ l de buffer de carga con formamida al 96%. (1) escalera de 100pb. (2) MgCl<sub>2</sub> 4 mM. (3) MgCl<sub>2</sub> 3 mM. (4) MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM. (5) MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. (6) MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM. (7) MgCl<sub>2</sub> 0 mM.



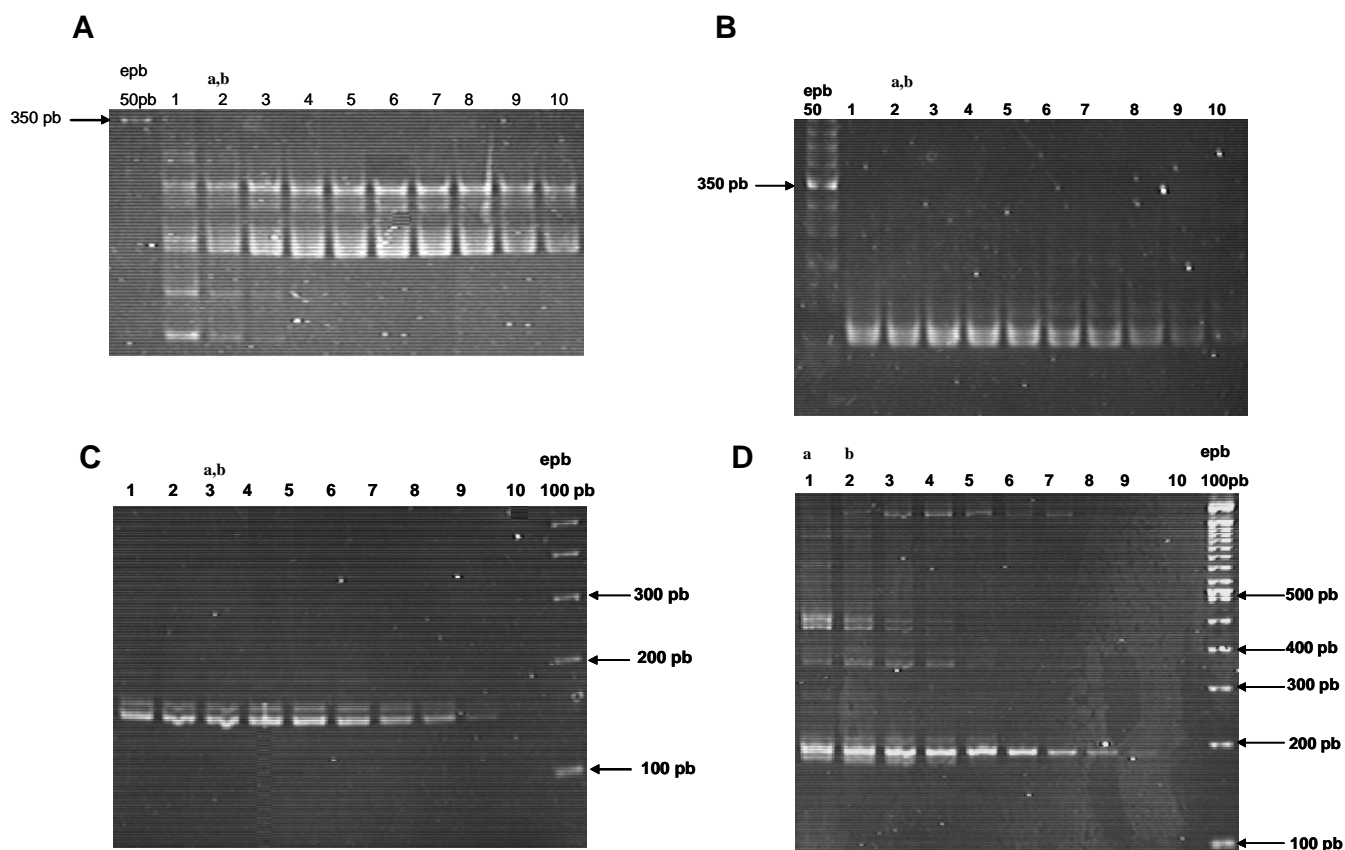
**Figura 2. Gradiente de concentración de MgCl<sub>2</sub> para la pareja 9 de primers.**

Poliacrilamida al 15% corrida a 65V por 95 min. En todos los carriles 5  $\mu$ l de muestra + 2  $\mu$ l de buffer de carga con formamida al 96%. (1) escalera de 100pb. (2) MgCl<sub>2</sub> 4 mM. (3) MgCl<sub>2</sub> 3 mM. (4) MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM. (5) MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. (6) MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM. (7) MgCl<sub>2</sub> 0 mM.





**Figura 3. Patrones de amplificación de DNA caprino (M94) con TaqDNApol y TaqPlatinum.** Poliacrilamida al 15%. Corrida a 65V por 95 min. En todos los carriles 5 $\mu$ l de muestra + 2 $\mu$ l de buffer de carga con formamida al 96%. (1) Escalera de 100pb. (2-4) TaqPlatinum. (5,6) Controles negativos (agua). (7-9) TaqDNApol. (2,3,7,8) Pareja de primers SR CRSP-3. (4,9) Pareja de primers SR CRSP-5.

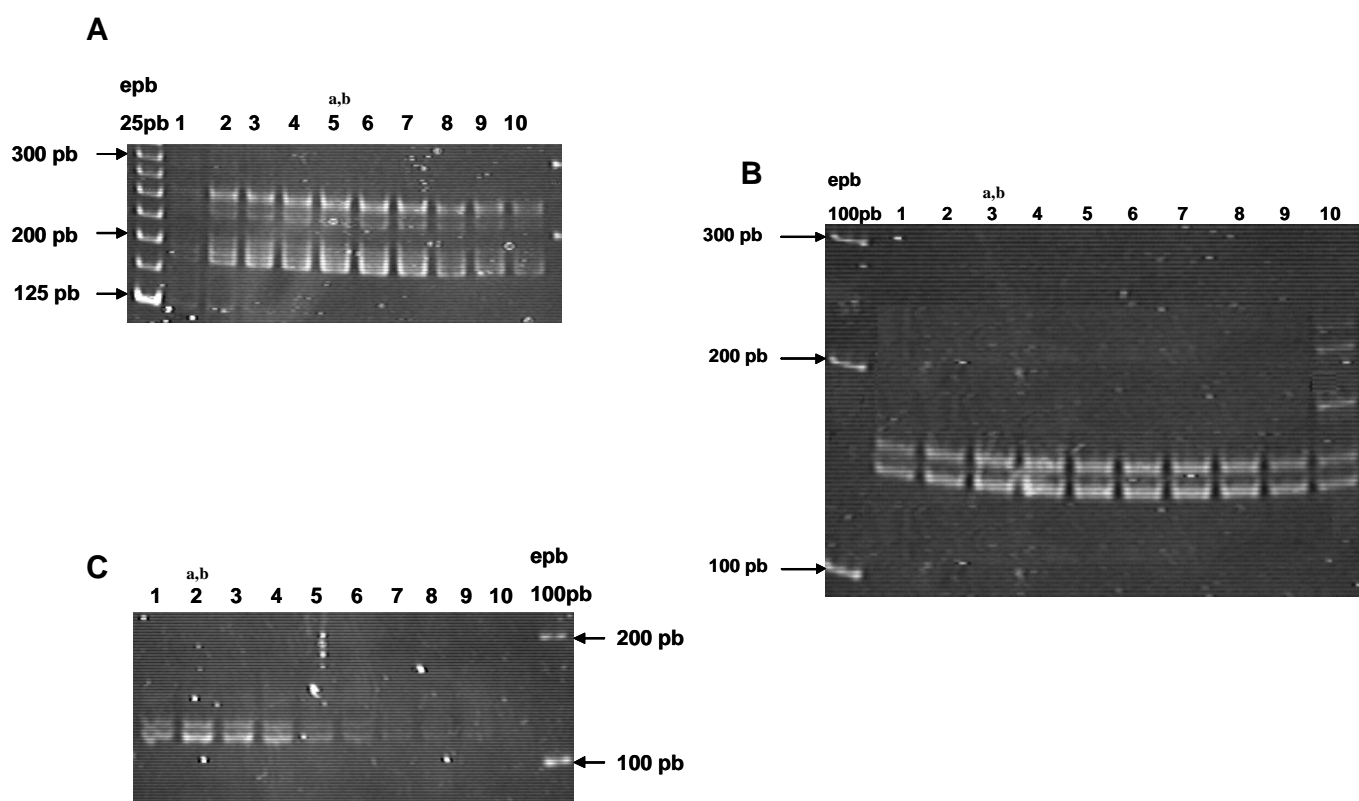


<sup>a</sup> Temperatura de “annealing” recomendada por Arévalo *et al.* (1994).

<sup>b</sup> Temperatura de “annealing” óptima para nuestra muestra.

**Figura 4. Gradientes de temperatura para las parejas de primers 1, 2, 3 y 4.**

Poliacrilamida al 6% (19:1), 150V 180min. En cada carril 10µl del producto de amplificación de una muestra de DNA de macho caprino (P52) raza Nubia. (A) pareja SR CRSP 1. (B) pareja SR CRSP 2. (C) pareja SR CRSP 3. (D) pareja SR CRSP 4. Claves en los carriles: epb, escalera de 50 o 100 pb. (1) 48.4°C. (2) 50.1°C. (3) 51.8°C. (4) 53.5°C. (5) 55.2°C. (6) 56.4°C. (7) 58.4°C. (8) 60.3°C. (9) 62°C. (10) 63.6°C.

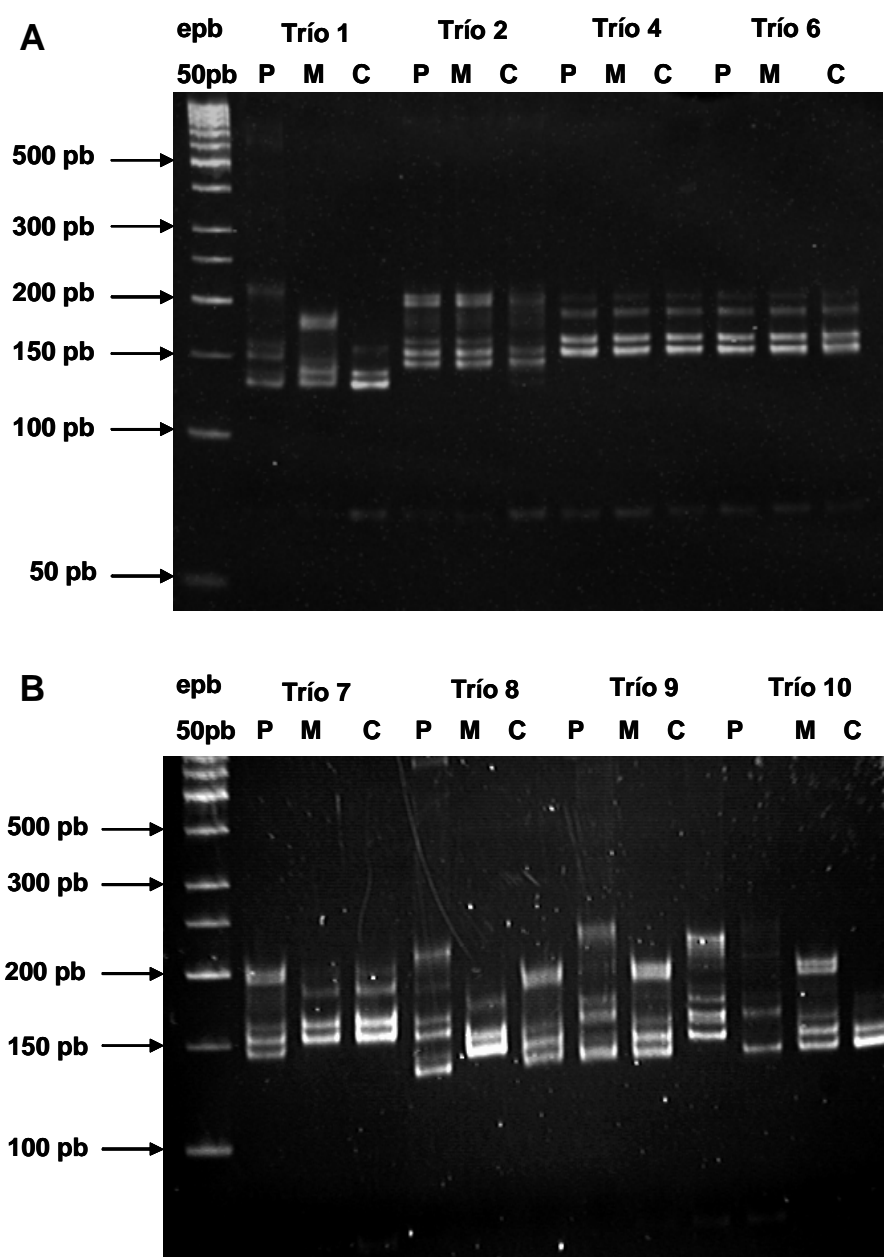


<sup>a</sup> Temperatura de “annealing” recomendada por Arévalo *et al.* (1994).

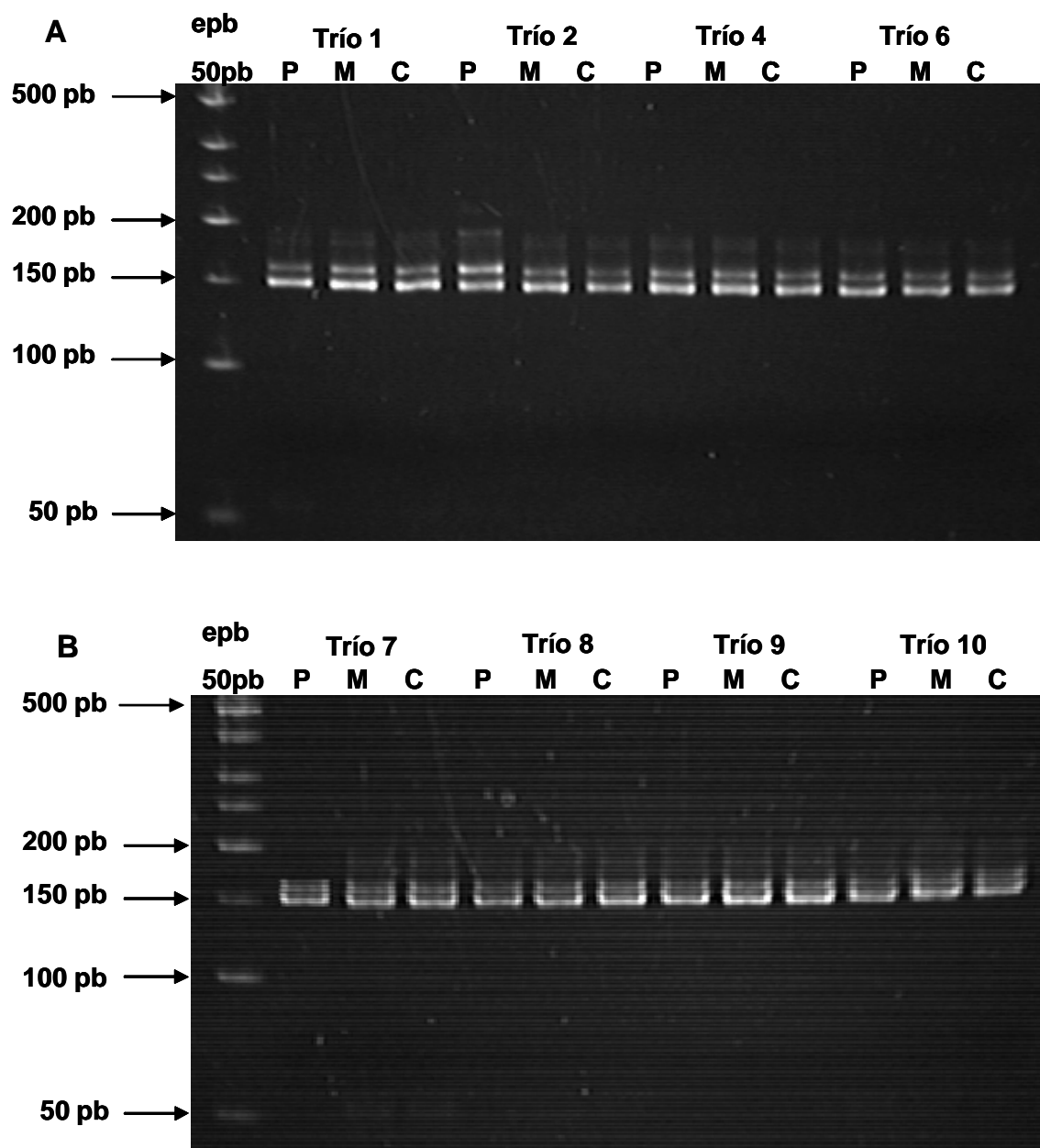
<sup>b</sup> Temperatura de “annealing” óptima para nuestra muestra.

**Figura 5. Gradientes de temperatura para las parejas de primers 5, 6 y 9.**

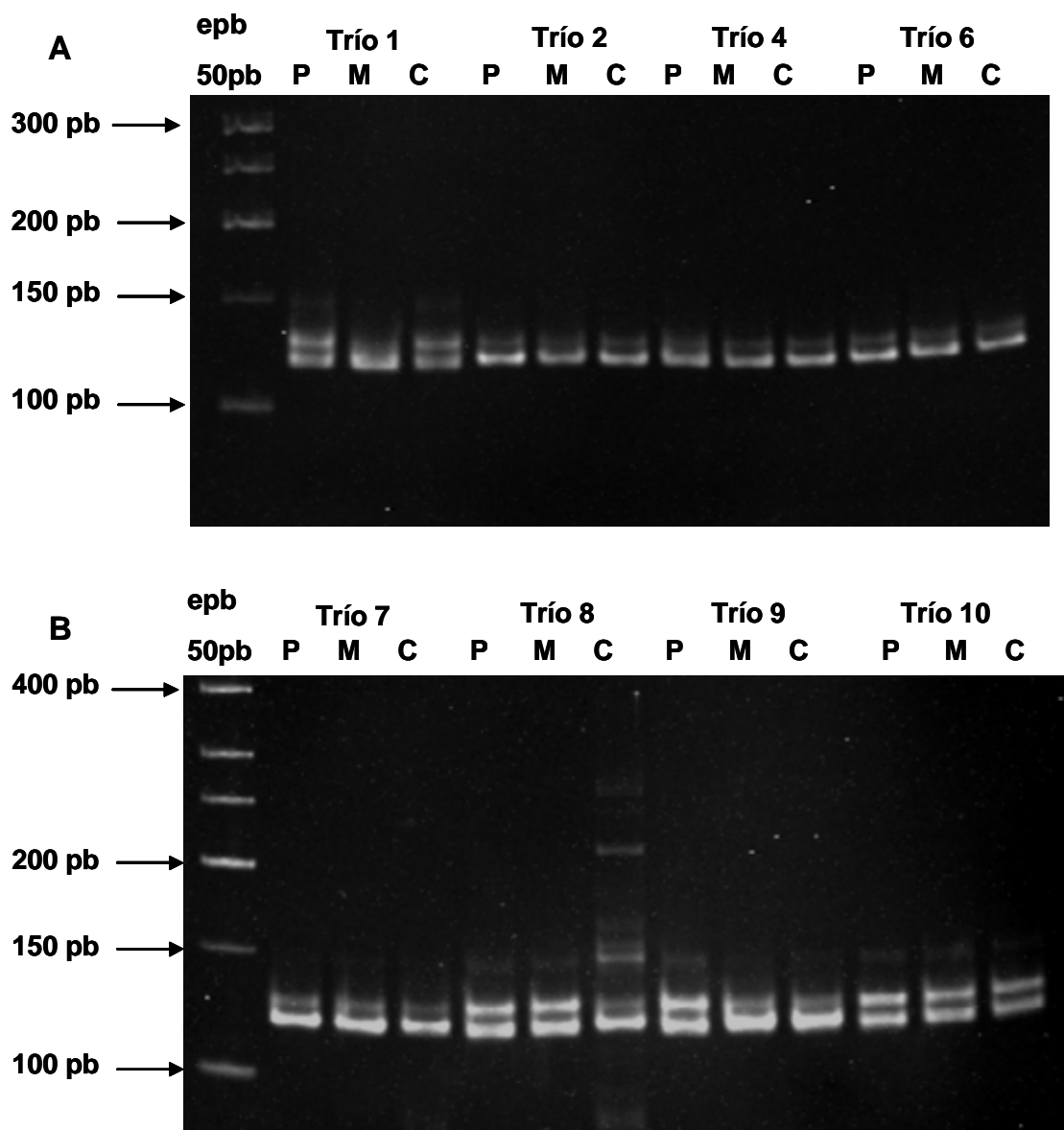
Poliacrilamida al 6% (19:1), 150V 180min. En cada carril 10µl del producto de amplificación de una muestra de DNA de macho caprino (P52) raza Nubia. (A) pareja SR CRSP 5. (B) pareja SR CRSP 6. (C) pareja SR CRSP 9. Claves en los carriles: epb, escalera de 50 o 100 pb. (1) 48.4°C. (2) 50.1°C. (3) 51.8°C. (4) 53.5°C. (5) 55.2°C. (6) 56.4°C. (7) 58.4°C. (8) 60.3°C. (9) 62°C. (10) 63.6°C.



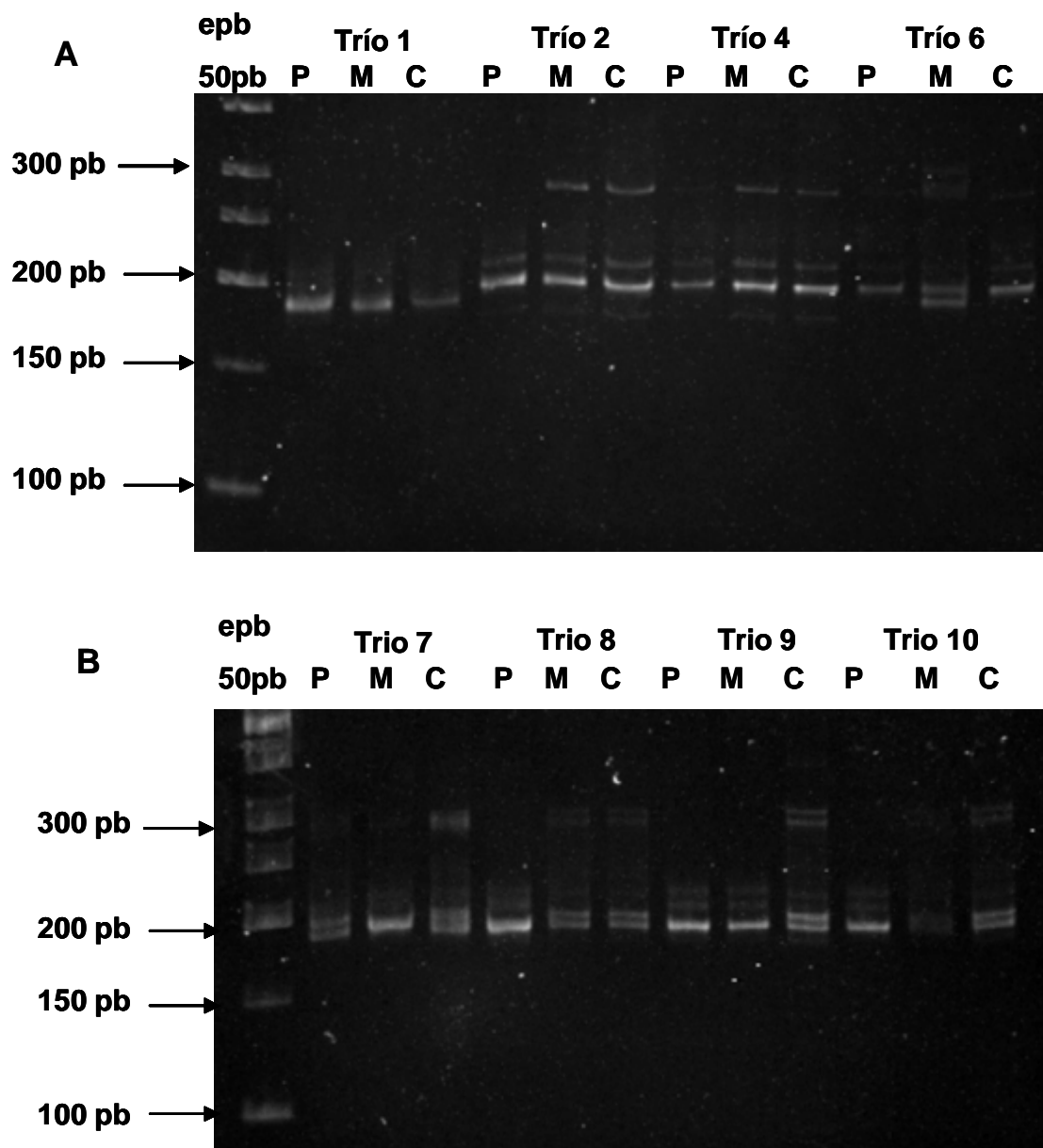
**Figura 6. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 1.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10 $\mu$ l de muestra y 7 $\mu$ l de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.



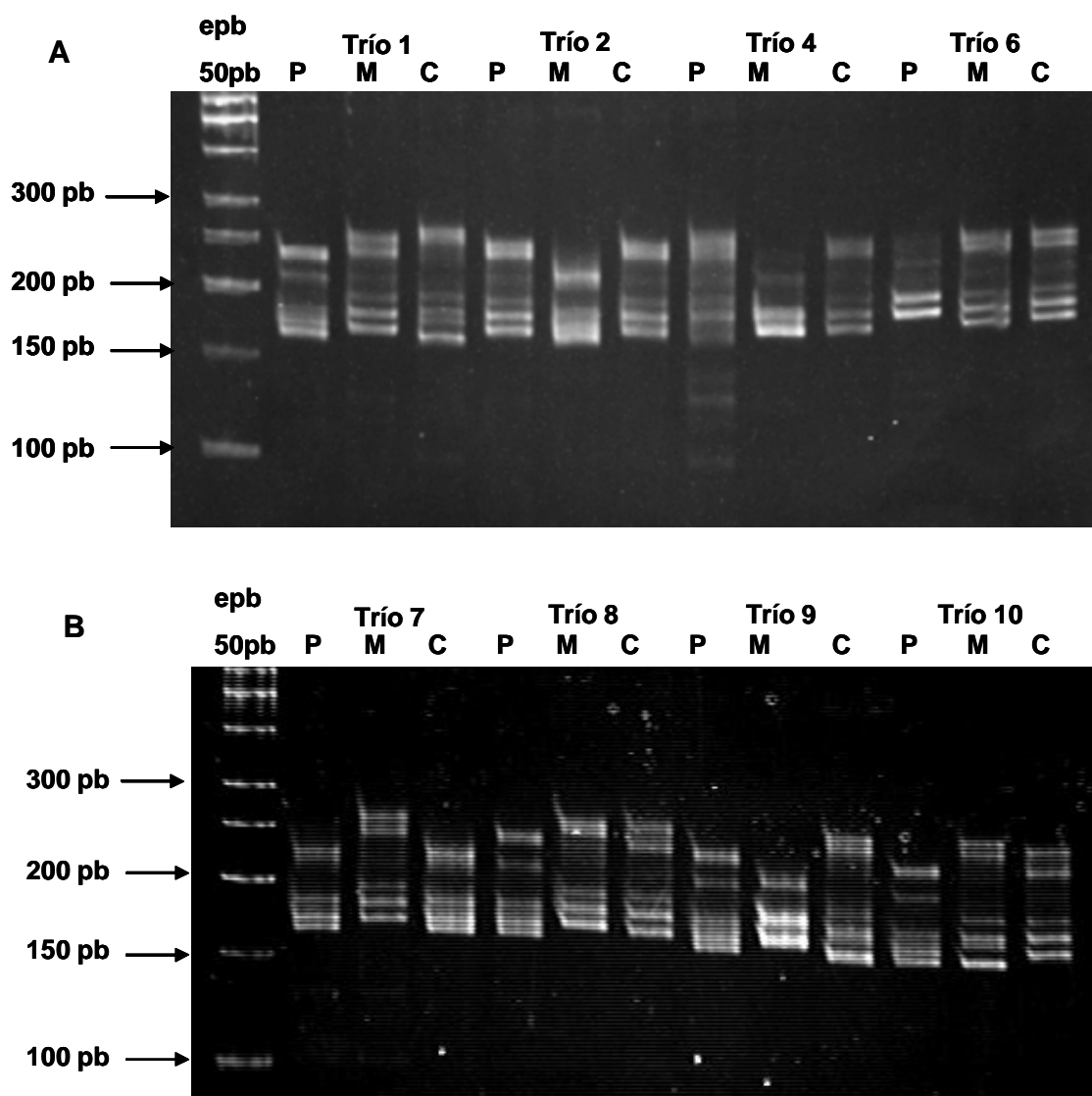
**Figura 7. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 2.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10µl de muestra y 7µl de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.



**Figura 8. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 3.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10µl de muestra y 7µl de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.

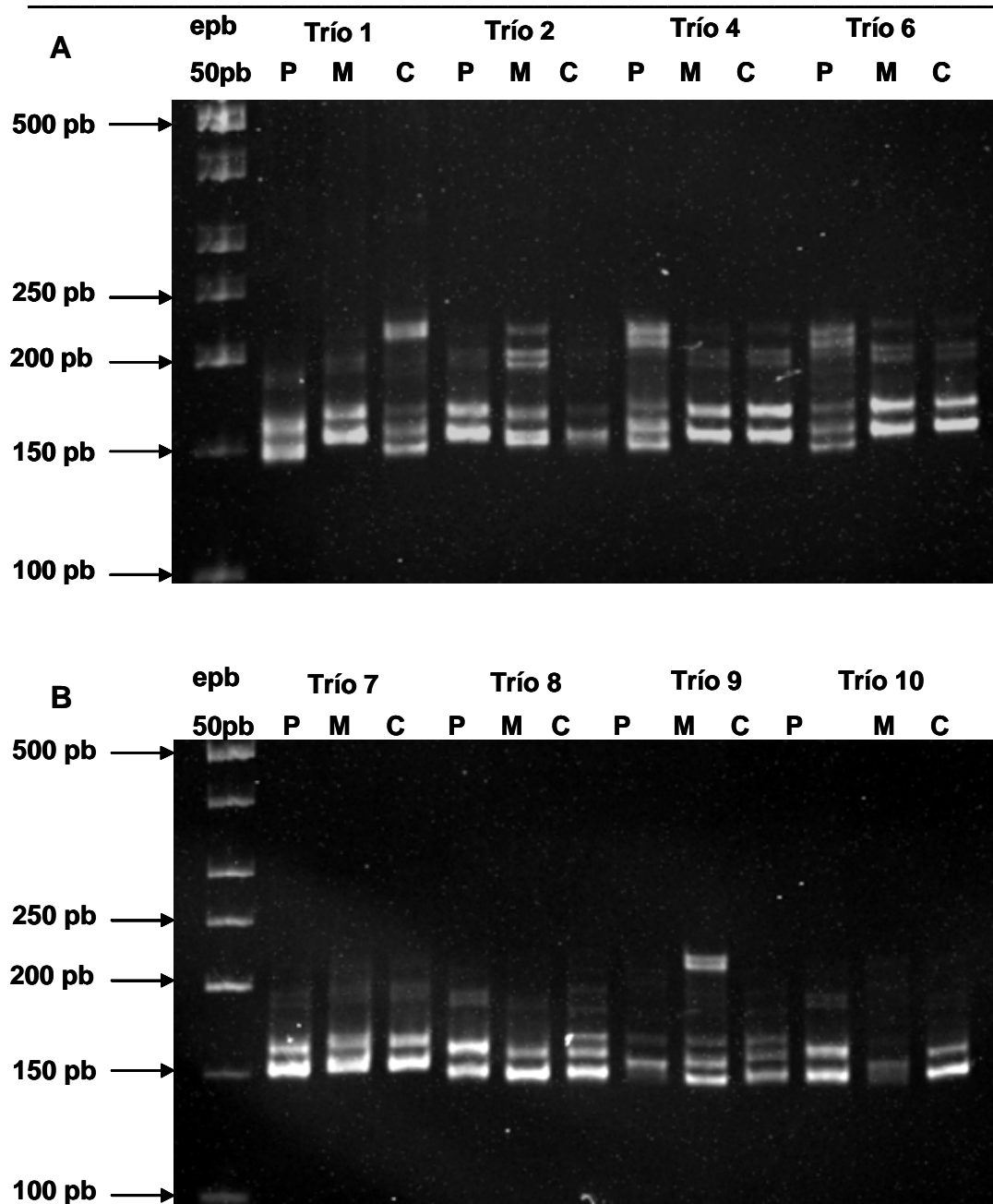


**Figura 9. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 4.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10µl de muestra y 7µl de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.

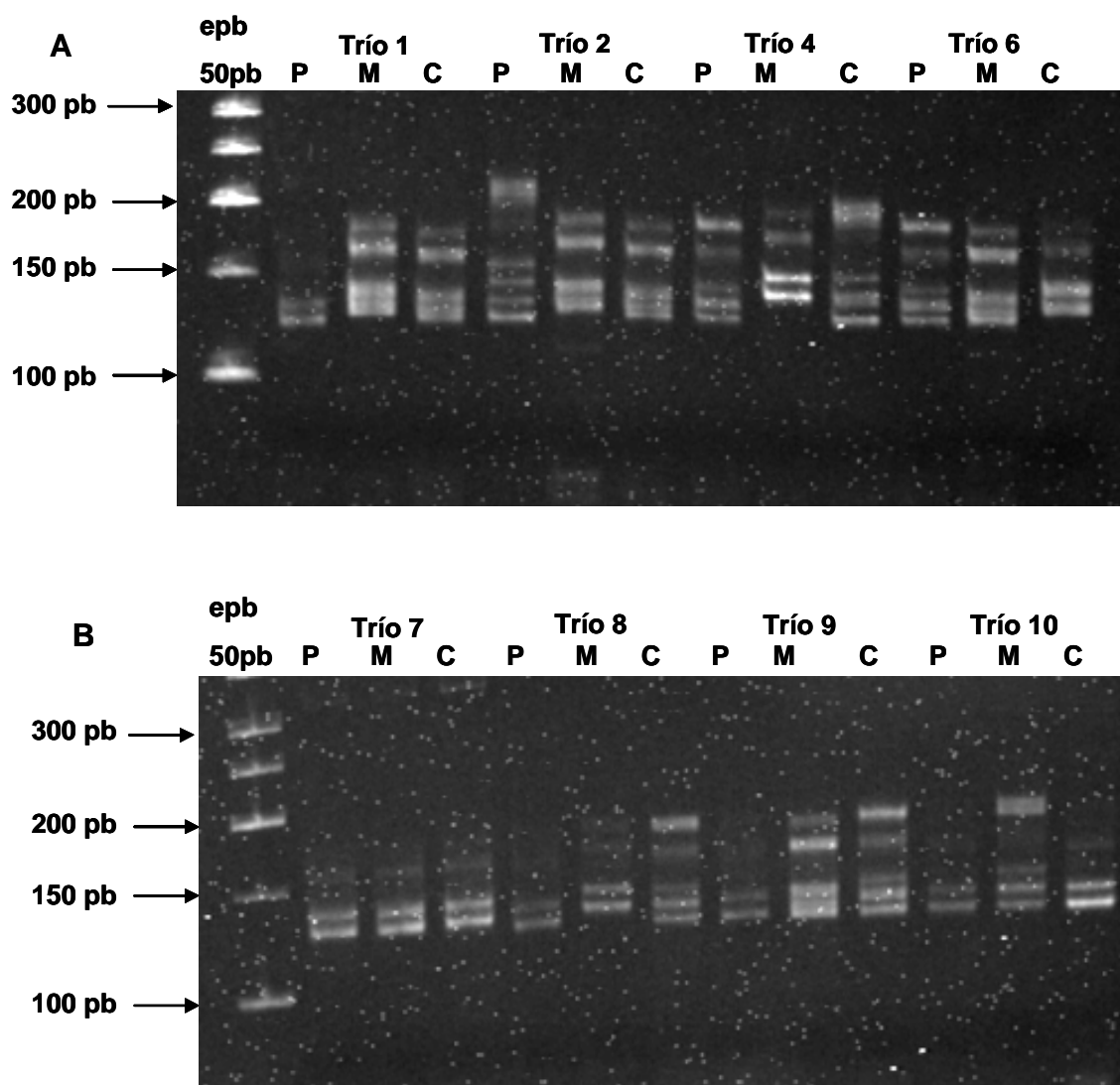


**Figura 10. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 5.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10 $\mu$ l de muestra y 7 $\mu$ l de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.





**Figura 11. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 6.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10µl de muestra y 7µl de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.



**Figura 12. Alelos microsatélites en tríos caprinos amplificados con la pareja de primers 9.** Poliacrilamida 8% proporción 19:1, 175V 120min. En cada carril 10µl de muestra y 7µl de buffer de carga con formamida 96%. (epb) escalera de referencia de 50 pb. P, padre. M, madre. C, cría. (A) Trío 1 raza Nubia, Tríos 2,4 y 6 raza Boer. (B) Trío 7 raza Boer, Tríos 8,9 y 10 raza Nubia.

**Anexo A****Componentes para una mezcla de PCR (25 $\mu$ l)**

<b>No.</b>	<b>Componente</b>	<b><math>\mu</math>l</b>	<b>Concentración final</b>
1	Agua	14.12	-
2	Bufers 10 $\times$	2.5	Tris HCl 20mM, KCl 50mM, pH 8
3	MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5mM
4	dNTPs	0.5	200 $\mu$ M
5	Primer 1	2.5	1 $\mu$ M
6	Primer 2	2.5	1 $\mu$ M
7	Taq pol	0.12	0.025U/ $\mu$ l
8	DNA (25ng/ $\mu$ l)	2	2ng/ $\mu$ l

**Anexo B****Componentes del gel de poliacrilamida para la cámara Protean II (Bio Rad)**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Mezcla total	110mL
Poliacrilamida 30% (19:1)	21.4 mL
TBE 10?	11 mL
Agua	77.6 mL
Persulfato de amonio al 10%	1100 ?l
TEMED	88 ?l

## Anexo C

## Parejas de oligos SR CRSP y temperaturas de annealing recomendadas

Primer	Secuencia 5' ? 3'	%GC	Annealing °C
1*1	TGCAAGAAGTTTTTCCAGAGC	43	50
1*2	ACCCTGGTTTCACAAAAGG	47	50
2*1	TGCTGTATCCTGTGTAATATCTT	35	52
2*2	GCATAAACAGATTATTGTGATGAT	29	52
3*1	CGGGGATCTGTTCTATGAAC	50	50
3*2	TGATTAGCTGGGTGAATGTCC	48	50
4*1	CTTCACCTCTACTCCCCAGT CAA	52	48
4*2	CCTCCGACAAAGGAATGTAGCCT	52	48
5*1	GGA CTCTACCAACTGAGCTACAAG	50	55
5*2	TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	36	55
6*1	CATAGTTCATT CACAATATGGCA	35	52
6*2	CATGGAGTCACAAAGAGTTGAA	41	52
7*1	TCTCAGCACCTTAATTGGTCT	45	50
7*2	GGTCAACACTCCAATGGTGAC	52	50
8*1	TGCGGTCTGGTCTGATTTAC	52	55
8*2	CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAC	48	55
9*1	AGAGGATCTCTGGAAATGGAATC	44	50
9*2	GCACTGTTTT CAGCCCTAATG	48	50
10*1	ACCAGTTTGAGTATCTTGCTTGGG	46	50
10*2	AGGAAGTTTATTGGACAGTGCTGG	46	50

Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994

### Anexo D

#### Alelos de microsatélites amplificados con las 10 parejas SR CRSP empleadas

Locus	No. de alelos	Tamaño (pb)
1. (GT)24	10	130-150
2. (TG)15TGG(TG)2	4	151-157
3. (TG)6(TA)2(TG)11 TTT(GT)3	4	113-123
4. (GT)17	4	249-263
5. (AT)4(GT)16AT(GT)3	9	158-180
6. (GT)15	7	136-150
7. (CT)7(AT)8ATTAC (AT)4	5	120-128
8. (GT)22	11	209-235
9. (GT)5(CA)16CG(CA)3	12	119-143
10. (GT)4(AT)14	4	115-121

Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994

## Anexo E

**Tamaño de los alelos, frecuencias alélicas, heterocigocidad de la muestra (H), contenido de información polimórfica (PIC), y temperatura de “annealing” para los loci de 10 microsatélites caprinos SR CRSP**

Locus	Alelos (pb) (frecuencia)	H	PIC	Annealing °C
SR CRSP 1	150(0.036); 148(0.036); 146(0.063); 144(0.073); 142(0.109); 140(0.094); 138(0.120)	0.950	0.866	50
SR CRSP 2	157(0.55); 155(0.143); 153(0.044); 151(0.758)	0.458	0.371	52
SR CRSP 3	123(0.091); 121(0.497); 119(0.244); 113(0.167)	0.856	0.605	50
SR CRSP 4	263(0.056); 259(0.072); 257(0.035); 249(0.838)	0.311	0.275	48
SR CRSP 5	180(0.052); 174(0.030); 172(0.107); 170(0.250); 168(0.052); 166(0.102); 164(0.258); 160(0.127); 158(0.025)	0.893	0.806	55
SR CRSP 6	150(0.042); 148(0.090); 146(0.239); 144(0.124); 142(0.145); 140(0.299); 136(0.059)	0.941	0.772	52
SR CRSP 7	128(0.005); 126(0.080); 124(0.318); 122(0.176); 120(0.422)	0.717	0.626	50
SR CRSP 8	235(0.100); 231(0.038); 227(0.076); 225(0.124); 223(0.143); 221(0.043); 219(0.317); 217(0.014); 215(0.067); 213(0.014); 209(0.010)	0.914	0.783	55
SR CRSP 9	143(0.049); 141(0.044); 139(0.029); 137(0.064); 135(0.089); 133(0.138); 131(0.079); 129(0.103); 127(0.198); 125(0.133); 123(0.069); 119(0.005)	0.931	0.875	50
SR-CRSP 10	121(0.128); 119(0.255); 117(0.352); 115(0.265)	0.775	0.673	50

Arévalo *et al.* 1994; Bhebhe *et al.* 1994