

## Evaluación de la utilidad de marcadores microsatélites en la población avícola rustipollos

### Evaluation of the utility of microsatellite markers in the poultry population rustipollos

Castro Liz\*, Gayozo Elvio \*\*, Méndez Natalia \*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n2.94961

#### RESUMEN

Los marcadores moleculares son una herramienta de gran utilidad para estudios de diversidad genética, que permite identificar poblaciones con características genéticas particulares, que soportan el establecimiento de programas de conservación y mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue evaluar el grado de información generada por un panel de 30 marcadores microsatélites en la población avícola Rustipollos. Se obtuvieron muestras de sangre de 50 individuos, la amplificación de fragmentos se realizó mediante PCR, utilizando 30 microsatélites recomendados por la FAO-ISAG para estudios de biodiversidad en gallinas. La estimación de los tamaños de los fragmentos se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 377. Fueron determinados el número de alelos por locus y el Contenido de Información Polimórfica (PIC), mediante el programa Microsatellite-Toolkit. El número total de alelos reportados fue de 99 en los 30 marcadores microsatélites, con un valor medio de  $3.3 \pm 1.06$  alelos por locus. La determinación del PIC registró un promedio de 0.46, con un rango de 0.18 a 0.76 en los marcadores MCW016 y ADL278, respectivamente. El 43% de los marcadores empleados resultaron altamente informativos para la población evaluada. En general, los marcadores microsatélites demostraron ser útiles para estudios genéticos en la población avícola Rustipollos.

**Palabras claves:** Contenido de información polimórfica, conservación, gallinas, Paraguay, variación genética.

#### ABSTRACT

Molecular markers are a very useful tool for genetic diversity studies, allowing the identification of populations with particular genetic characteristics, in order to establish conservation and genetic improvement programs. The objective of this study was to evaluate the degree of information generated by a panel of 30 microsatellite markers in the Rustipollos poultry population. Blood samples were obtained from 50 individuals, the fragments were amplified by PCR, using 30 microsatellites recommended by FAO-ISAG for biodiversity studies in chickens. The estimation of the fragment sizes was carried out in an ABI Prism 377 automatic sequencer. The number of alleles per locus and the Polymorphic Information Content (PIC) were determined using the Microsatellite-Toolkit.

\* Doctora en Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional de Asunción; Facultad de Ciencias Veterinarias, Dpto. Genética y Zootecnia, D. Postal: Campus Universitario Ruta Mariscal José Félix Estigarribia km. 10,5, San Lorenzo, Paraguay, N°111421; ORCID: 0000-0002-0475-8287, lcastro@vet.una.py

\*\* Licenciado en Biología. Master en Ciencias en Biotecnología; Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología; D. Postal: Campus Universitario Ruta Mariscal José Félix Estigarribia km. 10,5, San Lorenzo, Paraguay, N°111421; ORCID: 0000-0001-9309-7056, elviologo@gmail.com

\*\*\* Doctora en Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional de Asunción; Facultad de Ciencias Veterinarias; Dpto. de Recursos Faunísticos y Medio Natural; D. Postal: Campus Universitario Ruta Mariscal José Félix Estigarribia km. 10,5, San Lorenzo, Paraguay, N°111421; dmendez@gmail.com

program. The total number of alleles reported was 99 in the 30 microsatellite markers, with a mean value of  $3.3 \pm 1.06$  alleles per locus. The PIC determination registered an average of 0.46, with a range of 0.18 to 0.76 in the MCW016 and ADL278 markers, respectively. 43% of the markers used were highly informative for the population evaluated. In general, microsatellite markers proved to be useful for genetic studies in the Rustipollos poultry population.

**Keywords:** Polymorphism information content, conservation, chickens, Paraguay, genetic variation.

**Recibido:** Abril 9 de 2021    **Aprobado:** Diciembre 10 de 2021

## INTRODUCCIÓN

La producción avícola industrial ha aumentado considerablemente en los últimos años, con el propósito de abastecer la demanda de alimentos a nivel mundial, siendo las explotaciones intensivas las que contribuyen de manera directa. Sin embargo, este tipo de sistema requiere de la utilización de galpones controlados, balanceado comercial y líneas especializadas importadas, representando una actividad que implica una gran inversión económica, quedando limitada a un sector de la sociedad (Ventura, 2013; Friedmann & Weil, 2010).

Por otro lado, en países en vías de desarrollo existen los sistemas de traspatio o de subsistencia, que consiste en la cría de aves nativas, criollas o cruza, con mínimos requerimientos de alimento, alojamiento, manejo, caracterizadas por la rusticidad y habituadas a las diferentes condiciones ambientales (Castro *et al.*, 2015; Van Marle-Köster & Nel, 2000). Con la desventaja de presentar menores rendimientos productivos, lo cual ha propiciado la creación en centros, institutos o universidades estatales, de aves mejoradas adaptadas a las condiciones técnico productivas y culturales de las zonas rurales, como los pollos camperos del Instituto de Tecnología Agropecuaria de Argentina y las líneas caipiras de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria del Brasil (Dottavio & Di Masso 2010; Figueredo & Albino, 2004; Tadelle *et al.*, 2003).

En ese contexto, en el año 2001 fue originada en la División de Avicultura de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Paraguay la población avícola Rustipollos mediante cruzamientos dirigidos entre líneas parrilleras y rústicas o criollas, con la finalidad de obtener aves de doble propósito, capaces de contribuir con la economía rural (Castro *et al.*, 2019). Varios trabajos fueron realizados en dicha población, pero enfocados en parámetros productivos y reproductivos, como conversión alimenticia porcentaje de incubabilidad e inicio de postura (Amarilla, 2012; Torres, 2012; Gutiérrez, 2017).

Los avances en tecnologías moleculares han abierto nuevos horizontes para estimar la relación genética entre y dentro de poblaciones animales, los marcadores

moleculares pueden servir como una guía inicial importante, para desarrollar estrategias de conservación (Dávila *et al.*, 2009). Representando los marcadores microsatélites los de elección, debido a su elevado polimorfismo, presentan herencia codominante y se localizan a lo largo del genoma (Tautz, 1989), permitiendo identificar poblaciones con diversidad genética reducida y más vulnerables a un posible cambio ambiental y distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto para dirigir esfuerzos de conservación hacia éstas (González, 2003). Diversas investigaciones se han desarrollado utilizando marcadores microsatélites, en gallinas indígenas o nativas (Nxumalo *et al.*, 2020; Mudacheyi *et al.*, 2007), locales (Toalombo *et al.*, 2019; Abebe, Mikko & Johansson, 2015; Ceccobelli *et al.*, 2015; Huo *et al.*, 2014) y líneas comerciales (Choi *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 2013; Possamai *et al.*, 2015; Tadano, 2007).

En base a lo expuesto, y no existiendo datos genéticos publicados, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el panel de marcadores microsatélites en la población avícola Rustipollos, a modo de conocer los marcadores que sean más informativos para esta población.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Poblaciones y obtención de muestras***

Un total de 50 individuos de la población Rustipollos fueron seleccionados para el estudio. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena del ala, para posteriormente depositar 5 a 6 gotas en papel filtro tipo whatman. Fueron almacenadas en sobres de papel a temperatura ambiente hasta su procesamiento laboratorial.

### ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN se llevó a cabo empleando el método de resina Chelex®100 (Bio-Rad, USA), propuesto por Toalombo *et al.* (2019).

### ***Amplificación por PCR y Genotipificación***

Fue utilizado un panel de 30 marcadores microsatélites diseñados en siete múltiplex, 29 de ellos están incluidos en la lista de marcadores recomendados por la FAO-ISAG para estudios de biodiversidad en gallinas (FAO, 2011), en tanto que el marcador el MCW080, fue selec-

cionado de un trabajo de investigación realizado en pavos reales de Tailandia (Thawonwan *et al.*, 2009). La amplificación se realizó por PCR, en un volumen final de 23  $\mu$ l conteniendo 50 ng de ADN genómico, 200  $\mu$ M de dNTPs, 10 mM Tris HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq enzima polimerasa y 5 pmoles de cada marcador. Las temperaturas de hibridación se establecieron de acuerdo a las recomendaciones de la FAO (2011). La secuenciación de los productos de PCR se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). El tamaño de los alelos fue estimado utilizando un estándar de control interno GeneScan-400 HD ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La tipificación se realizó en base a estándares de alelos de poblaciones de referencias, utilizando el software GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **Análisis estadístico**

Los parámetros del número de alelos y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) fueron estimados usando el programa Microsatellite-Toolkit en Excel (Park, 2001).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los valores del número de alelos y del Contenido de Información Polimórfica, se observan en la Tabla 1. Fueron detectados 99 alelos en los 30 marcadores microsatélites, con un valor promedio de  $3.3 \pm 1.06$  alelos por locus. El número de alelos encontrados varió de dos alelos en los marcadores MCW0165, MCW0103, MCW0222, MCW0098, MCW080, MCW0078 y MCW0216, a seis alelos en el locus MCW104 (Figura 1).

Barker (1994) sugirió que el número promedio de alelos por locus debe ser como mínimo cuatro para reducir el error estándar en la estimación de las distancias genéticas. Teniendo en cuenta lo expuesto, 19 de los 30 microsatélites presentaron valores inferiores, evidenciando bajo número de alelos en la población Rustipollos, que podría estar relacionado con el sistema de apareamiento cerrado y la línea especializada de carne utilizada en su formación.

A su vez, valores superiores en el número de alelos fueron reportados en gallinas de Zimbabue (8.2) por Mudacheyi *et al.* (2007), y en líneas adaptadas sudafricanas (8.7) por Van Marle-Köster *et al.* (2000). En tanto, fue similar al reportado en reproductores de líneas parrilleras (3.6) por Hillel *et al.* (2003), y en gallinas italianas Ancona (3.26) y Livornese Bianca (3.11) por Ceccobelli *et al.* (2015). Las diferencias encontradas podrían rela-

cionarse con el tipo de cría en libertad, favoreciendo el flujo de genes entre bandadas y a la ausencia de selección para caracteres productivos, resultando en un mayor número de alelos dentro de estas poblaciones.

Con relación al Contenido de Información Polimórfica (PIC), la media fue de 0.46, observándose un rango de variación de 0.18 a 0.76 en los marcadores MCW016 y ADL278, respectivamente.

Resultados similares de PIC fueron descritos en poblaciones de gallinas de Sobrarde (0.45) y en líneas japonesas comerciales (0.46), por Monteagudo *et al.* (2011) y Pham *et al.* (2013), respectivamente. Sin embargo, fue inferior al reportado en gallinas indígenas de Rwanda (0.64) por Habimana *et al.* (2020), en poblaciones comerciales coreanas (0.68) por Choi *et al.*, 2015 y en líneas braileñas Paraíso Pedrês (0.79) y Rubro Negra (0.76) por Possamai *et al.*, 2015. Las variaciones podrían atribuirse al tamaño muestral y a la clase de marcadores utilizados, teniendo en cuenta que en la investigación desarrolla en gallinas brasileñas, se amplificaron microsatélites diferentes al de este trabajo, demostrando valores muy superiores, indicando quizás, que dicho panel resultará más informativo en líneas seleccionadas para características productivas.

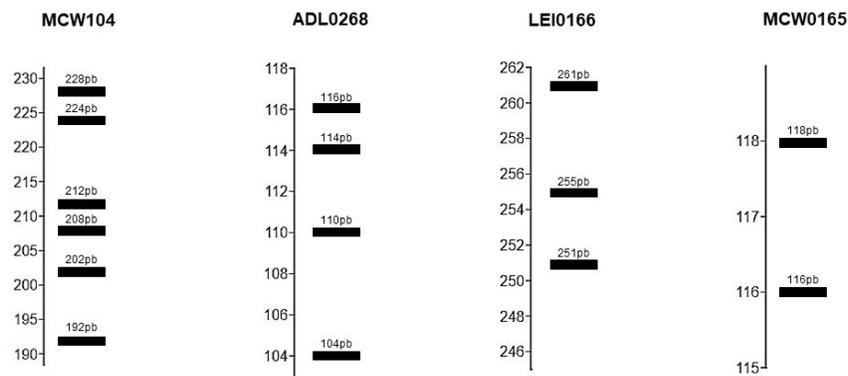
Los valores de PIC mayores a 0.50 indican marcadores altamente informativos, de 0.50 a 0.25 marcadores medianamente informativos y menores a 0.25 ligeramente informativos (Botstein *et al.*, 1980). Teniendo en cuenta lo expuesto, 13 marcadores fueron altamente informativos (ADL268, MCW206, LEI0166, MCW0081, MCW0014, MCW0183, ADL0278, MCW0067, MCW0104, MCW0123, MCW0111, LEI0234, MCW0037), 15 medianamente (MCW295, MCW330, MCW0165, MCW0069, MCW0248, MCW0020, MCW0034, MCW0103, MCW0222, MCW0216, MCW0098, LEI0094, MCW080, LEI0192, ADL0112) y 2 ligeramente informativos (MCW0016, MCW0078). Estos hallazgos demuestran que los alelos más comunes no difieren mucho en términos de frecuencia (Rosenberg *et al.*, 2001), evidenciándose en el bajo número de marcadores microsatélites con valores superiores a 0.5.

## **CONCLUSIONES**

La mayoría de los marcadores microsatélites analizados demostraron ser útiles en la población Rustipollos, siendo entre alta y medianamente informativos. Los datos obtenidos permitirán la utilización de un menor número de marcadores para determinar la variabilidad genética. El conocimiento de la diversidad genética nos aporta valiosa información acerca de los diferentes genotipos

**Tabla 1.** Marcadores microsatélites, ubicación en el cromosoma, rango de los alelos observados, número de alelos y Contenido de Información Polimórfica (PIC).

<b>Locus</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Rango de los alelos (pb)</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>PIC</b>
ADL0268	1	104 - 116	4	0.53
MCW0206	2	183 - 191	4	0.55
LEI0166	3	251 - 261	3	0.56
MCW0295	4	90 - 102	3	0.39
MCW0081	5	115 - 133	3	0.59
MCW0014	6	176 - 190	3	0.54
MCW0183	7	294 - 312	4	0.62
ADL0278	8	116 - 117	5	0.76
MCW0067	10	182 - 188	3	0.59
MCW0104	13	192 - 228	6	0.67
MCW0123	14	80 - 92	5	0.58
MCW0330	17	270 - 290	3	0.48
MCW0165	23	116 - 118	2	0.35
MCW0069	E60C04W23	156 - 168	3	0.32
MCW0248	1	215 - 223	3	0.47
MCW0111	1	98 - 106	4	0.65
MCW0020	1	179 - 185	3	0.38
MCW0034	2	220 - 230	4	0.42
LEI0234	2	218 - 310	4	0.63
MCW0103	3	266 - 270	2	0.29
MCW0222	3	222 - 226	2	0.33
MCW0016	3	140 - 178	5	0.18
MCW0037	3	156 - 158	3	0.55
MCW0098	4	263 - 265	2	0.37
LEI0094	4	257 - 279	4	0.47
MCW080	15	278 - 280	2	0.32
MCW0078	5	139 - 143	2	0.23
LEI0192	6	255 - 301	3	0.44
ADL0112	10	124 - 130	3	0.34
MCW0216	13	144 - 145	2	0.25
<b>Media</b>			<b>3.3</b>	<b>0.46</b>



**Figura 1.** Número de alelos encontrados en cuatro de los 30 microsatélites en la población Rustipollos. Los marcadores MCW104, ADL0268, LEI0166 y MCW165 reportaron seis, cuatro, tres y dos alelos, respectivamente. Las barras de color negro representan a cada uno de los alelos.

presentes en un grupo genético, los cuales podrán ser considerados para la selección de animales con aptitudes genotípicas, para futuros programas de cruzamientos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación (PINV15-54) fue financiado por el CONACYT (Paraguay) a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación-FEEI.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abebe, A., Mikko, S., Johansson, A. (2015). Genetic diversity of five local Swedish chicken breeds detected by microsatellite markers. *Plos One*, 10 (4): 1-13.

Amarilla, C. (2012). Evaluación de la ganancia de peso e inicio de postura de Rustipollos hembras. Tesis (Grado). San Lorenzo, Paraguay: Universidad Nacional de Asunción. 43p

Barker, J. (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. En: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> world congress on genetics applied to livestock production*, Ontario, 21: 501-508.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314-322.

Castro, L., Nuñez, L., Ramírez, L., Rodríguez, I., Florentín, A., Álvarez, R., Martínez-López, O. R. (2015). Biodiversidad de ecotipos de gallinas locales del Chaco Central y humedales del Ñeembucú, Paraguay. *Actas*

*Iberoamericanas de Conservación Animal*, 6 (1): 506-516.

Castro, L., Pérez-Estigarribia, P., Emiliano, L., Cecobelli, S., Quiroz, J., Díaz, S., Méndez, N., Fernández, J., Camacho, E., Martínez, A., Iglesias, G. (2019). Caracterización genética de la población avícola Rustipollos, empleando marcadores microsatélites. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 30 (1): 143-175.

Ceccobelli, S., Di Lorenzo, P., Lancioni, H., Monteagudo Ibañez, L., Tejedor, M., Castellini, C., Landi, V., Martínez Martínez A., Delgado Vermejo, J., Vega Pla, J., Leon Jurado, J., García, N., Attard, G., Grimal, A., Stojanovic, S., Kume, K., Weibeng, S., Lasagna, E. (2015). Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. *Livestock Science*, 175: 27-36.

Choi, N., Seo, D., Jemaa, S., Sultana, H., Heo, K., Jo, C., Lee, J. (2015). Discrimination of the commercial Korean native chicken population using microsatellite markers. *Journal of Animal Science and Technology*, 57 (5): 1-8.

Dávila, S., Gil, M., Resino-Talaván, P., Campo, J. (2009). Evaluation of diversity between different Spanish chicken breeds, a tester line, and White Leghorn population based on microsatellite markers. *Poultry Science*, 88 (12): 2518-2525.

Dottavio, A., Di Masso, R. (2010). Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 21 (2):1-10.

FAO. (2011). Molecular genetics characterization of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. Rome. N° 9.

- Figueredo, E. y Albino, J. (2004). Linhages comerciais de galinhas para corte y postura. Brasil: EMBRAPA, p. 8.
- Friedmann, A. y Weil, B. (2010). Paraguay vende. *Producción avícola*. USAID: 1-60.
- González, E. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59 (2-3): 377-388.
- Gutiérrez, J. (2017). Estudio comparativo de la incubabilidad de huevos de gallina Caipira versus huevos de gallinas Rustipollos. Tesis (Grado). San Lorenzo, Paraguay: Universidad Nacional de Asunción. 51p.
- Habimana, R., Otieno, T., Ngeno, K., Mboumba, S. Asami, P., Ahou, A., Tiampo, C., Nishimwe, K., Mahoro, J., Yao, N. (2020). Genetic diversity and population structure of indigenous chicken in Rwanda using microsatellite markers. *Plos One*, 15 (4): 1-17.
- Hillel, J., Groenen, M., Tixier-Boichard, M., Korol, A., David, L., Kirzhner, V., Burke, T., Barre-Dirie, A., Crooijmans, R., Elo, K., Feldman, M., Freidlin, P., Maki-Tanila, A., Oortwijn, M., Thomson, P., Vignal, A., Wimmers, K. Weigend, S. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, 35: 533-557.
- Huo, J., Wu, G., Chen, T., Huo, H., Yuan, F., Liu, C., Miao, Y. (2014). Genetic diversity of local Yunnan chicken breeds and their relationships with Red Junglefowl. *Genetics and Molecular Research*, 13 (2): 3371-3383.
- Monteagudo, L., Avellanet, R., Tejedor, M., Azón, R. (2011). Estudios genéticos en la gallina de Sobrarde mediante marcadores microsatélites. *XIV Jornadas de Producción Animal*, Tomo 2: 488-490.
- Mudacheyi, F., Eding, H., Wollny, C., Groeneveld, E., Makuza, S., Shamseldin, R., Simianer, H., Weigend, S. (2007). Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. *Animal Genetics* 38, 332-339.
- Nxumalo, N., Ceccobelli, S., Cardinalo, I., Lancioni, H., Lasagna, E., Winfred Kunene, N. (2020). Genetic diversity, population structure and ancestral origin of Kwazulu-Natal native chicken ecotypes using microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Italian Journal of Animal Science*, 19 (1): 1277-1290.
- Park, S. (2001). Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis (PhD). Dublin, IR: Universidad de Dublin.
- Pham, M., Chang, W., Bertouly-Salazar, C., Lin, D., Yungrahang, S., Wang, C., Lee, Y., Tixier-Boichard, M., Chen, C. (2013). Genetic characterization of Taiwan Commercial Native Chickens Ascertained by Microsatellite Markers. *Journal of Poultry Science*, 50 (4): 290-299.
- Possamai, M., Battilana, J., Paludo, E., Herkenhoff, E., Pértille, F., Lima Rosa, C. (2015). Genotypic characterization of ten microsatellite loci in two Brazilian free range (Caipira) chicken lines. *Ciência Rural*, 45 (5): 877-883.
- Tadano, R., Nishibori, M., Nagasaka, N., Tsudzuki, M. (2007). Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses. *Poultry Science*, 86 (11): 2301-2308.
- Rosenberg, N., Burke, T., Elo, K., Feldman, M., Freidin, P., Groenen, M., Hillel, J., Mäki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S. (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics Society of America*, 159 (2): 699-713.
- Tadelle, D., Million, T., Alemu, Y., Peters, K. (2003). Village chicken production systems in Etiopia: 2-Use patterns and performance valuation and chicken products and socio-economic functions of chicken. *Livestock Research for Rural Development*, 15 (1).
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17 (16): 6463-6471.
- Thawonwan, P., Meckvichai, W., Pinyopich, P. (2009). Genetic variation of green peafowls *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 in northern and western Thailand based on microsatellite DNA. *Journal of Wildlife in Thailand*, 16 (1): 72-82.
- Toalombo Vargas, P., León, J., Fiallos Ortega, L., Martínez, A., Villafuerte Gavilanes, A., Delgado, J., Landi, V. (2019). Deciphering the patterns of genetic admixture and diversity in the Ecuadorian creole chicken. *Animals*, 9 (9): 1-18.
- Torres, J. (2012). Evaluación de la ganancia de peso de Rustipollos machos destinados a la producción de carne. Tesis (Grado). San Lorenzo, Paraguay: Universidad Nacional de Asunción. 41p.
- Van Marle-Köster, E. y Nel, L. (2000). Genetic characterization of native southern African chicken populations: evaluation and selección of polymorphic microsatellite markers. *South African Journal Science*, 30 (1): 1-6.
- Ventura, M. (2013). Aves de corral y productos avícolas: riesgos para la salud humana, Mercadeo. En: FAO. Revisión del desarrollo avícola. País: FAO, Roma. 129 p.