UTILIZACION DEL POLIMORFISMO DE MICROSATÉLITES EN LA VERIFICACIÓN DE PATERNIDAD EN GANADO CAPRINO.

Giménez-Gamero I[1], Vega-Plá JL[2], Angulo-Heras C[1], Alonso-Moraga A[1], Muñoz-Serrano A[1], Serradilla JM[1], Falagan A[3] y Dorado-Pérez G[4]

[1] Lab. Fisiogenética, Dep. Producción Animal, ETSIAM, Univ. Córdoba.
[2] Lab. de Grupos Sanguíneos, Servicio de cria caballar, Córdoba.
[3] De. de Zonas Aridas, Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, La Alberca, Murcia
[4] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Univ. Córdoba.

En los paises desarrollados el ganado caprino tiene una repercusión económica importante y ya se está utilizando la selección a nivel génico en reproductores potencialmente interesantes para proteinas lácteas tales como la caseina α_{s1} **(1)**. Por ello, una correcta asignación de paternidad en grupos interreproductores es un requisito previo para llevar a cabo un programa de mejora. Las pruebas convencionales de paternidad permiten resolver muchos casos, aunque no todos; el tiempo y el coste económico que implican, nos han llevado a utilizar el polimorfismo genético a nivel de ADN basado en loci de repeticiones en tántem de motivos nucleotídicos simples (microsatélites o VNRTP) en el ganado caprino como rutina.
Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología específica para la detección alélica de 5 microsatélites ya descritos en cabras **(2, 3, 4)** utilizando PCR multiplex y realizando la genotipificación de cada individuo en un secuenciador Perkin-Elmer ABI y aplicando el programa GENESCAN de la misma casa comercial, en el Servicio de Secuenciación de Proteínas y Acidos Nucleicos de la Universidad de Córdoba. Al mismo tiempo hemos clonado y secuenciadp 9 nuevos microsatélites caprinos, 5 de los cuales podrían ser hipervariables y que en la actualidad nos disponemos a caracterizar poblacionalmente. Ambas baterías de microsatélites nos permitirán asignar paternidades con una probabilidad de error negligible.

Material animal: Se han caracterizado 6 ganaderías de la raza Murciano-Granadina todas ellas en control lechero pertenecientes a la Asocación de Criadores de Raza Murciano-Granadina (ACRIMUR) de Murcia, cuya estructura de cruce aprioríatica es parcialmente conocida, para los 5 microsatélites ya descritos **(2, 3, 4)**. Se usan muestras de sangre completa congelada para las extracciones y purificaciones de ADN **(5)**, aunque rutinariamente trabajamos con sangre diluida 1:20 **(6)**.

Características de los microsatélites estudiados: Se han escogido todos los loci microsatélites del tipo (gt)n modificados **(2, 3, 4)**.

PCR multiplex: Se ha utilizado un termiciclador de ADN (Perkin-Elmer) con un ciclo de 10' 94°C ("hot start")**(7)**; A los 5' se añaden 0'7 unidades de polimerasa; 35x(30'' a 94°C, 30'' a 53°C, 3='' a 72°C) 10' a 72°C. La concentración de cada pareja de oligonucleótidos es: 20nM para el SR-CRSP-1; 200nM para SR-CRSP-5; 35nM para SR-CRSP-8; 50nM para SR-CRSP-9; 16nM para INRA-011-C. El volumen de reacción fue de 25 ul de sangre diluida 1:20 y 2'5nM de Cl_2Mg. El tampón fue suministrado por Biometra Ltd. versión 2.0.

Genotipificación de microsatélites: Los productos de PCR son desnaturalizados, mantenidos en hielo y posteriormente cargados en un gel de secuenciación estándar de acrilamida desnaturalizante aplicadoa un secuenciador ABI 373. Las señales fluorescentes de los productos de PCR marcados con los fluorocromos (JOE, TAMRA y FAM) son analizados por el programa GENESCAN 672. Los tamaños de cada producto de PCR son asignados por referencia con el estándar interno (ROX) añadido antes de la desnaturalización.

Protocolo de búsqueda de los 9 nuevos microsatélites: El ADN genómico ha sido obtenido según Wang et al **(5)**. Para la construcción de una genoteca parcial de ADN caprino hemos llevado a cabo una digestión completa con *Sau*3A1, posterior recuperación de fragmentos (200-400 pb) e inserción en el plásmido pUC18 previamente linearizado con *Bam*H1 **(6)**. La exploración de la genoteca así construida se ha llevado a cabo transfgormando células competentes (Pharmacia), y transfiriendo y fijando los transformantes a membranas de nylon; la sonda usada para detección de clones portadores de microsatélites es un oligonucleótido (tg)7t marcado con digoxigenina **(6)**. De los

clones positivos hemos extraido y purificado los plásmidos cuya secuenciación es directa con los cebadores universales del fago M13. Los programas PrimerSelect (DNASTAR) v 3.03 y Oligo (National Biosciences Inc.) v 4.05 nos han permitido diseñar las parejas de cebadores para cada uno de los 9 microsatélites encontrados.

Resultados y Discusión: La tabla 1 proporciona las frecuencias de cada microsatélite rastreado en las 6 ganaderías estudiadas, el parámetro denominado contenido de información polimórfica (PIC), la heterozigosidad esperada en el equilibrio (H) así como la probabilidad de exclusión de cada locus (PE) **(8)**. En la Tabla 2 detallamos las secuencias de los 9 nuevos microsatélites encontrados cuyos códigos de acceso al GenBank son U80587, U80588, U80589, U80590, U80591, U80592, U80593, U80594 y U80595 para los microsatélites que hemos denominado CHIRUCO1, CHIRUCO2, CHIRUCO3, CHIRUCO4, CHIRUCO5, CHIRUCO6, CHITUCO7, CHIRUCO8 y CHIRUCO9 respectivamente.

Tabla 1.- Valores de frecuencias alélicas en 5 ganaderías diferentes para los 5 loci microsatélites estudiados. PIC: contenido de información polimórfica. H: heterozigosidad esperada en el equilibrio. PE: probabilidad de exclusión de paternidad.

Locus	*Alelos(frecuencias)*	*N*	*Ganadería*	*PIC*	*H*	*PE*
SR-CRSP-1	137(.34)139(.02)141(.03)143(.14) 145(.05)147(.32)151(.1)	78	OC.ACRIMUR	0.71	0.75	0.53
INRA011	99(.13)113(.023)115(.19)117(.09) 119(.17)121(.08)131(.02)133(.007) 135(.03)137(.08)139(.02)141(.11) 143(.02)147(.03)	64	VI.ACRIMUR	0.87	0.88	0.75
SR-CRSP-5	166(.1)168(.11)170(.02)172(.008) 174(.12)176(.44)178(.05)180(.11) 182(.033)184(.009)	106	WS.ACRIMUR	0.73	0.75	0.48
SR-CRSP-8	217(.3)219(.14)221(.15)225(.005) 237(.33)239(.06)241(.015)	94	EP.ACRIMUR	0.71	0.75	0.55
SR-CRSP-9	120(.08)128(.25)130(.2)132(.28) 134(.007)136(.085)138(.049) 140(.042)144(.007)	71	OR.ACRIMUR	0.77	0.80	0.57

Una primera aproximación a la evaluación de los microsatélites estudiados en la verificación de paternidad nos ha proporcionado 26 parejas madre-hija erróneamente atribuidas de un total de 250. La probabilidad de exclusión de parentesco conjunta que proporcionan los 5 loci analizados en las cinco ganaderías mostradas de raza Murciano-Granadina resulta ser igual a 0.99. Por otra parte podemos suponer que cinco de los nueve nuevos microsatétlites clonados por nosotros pueden ser hipervariables por lo que una vez reastreadas las poblaciones para un total de 10 loci, podemos estimar que la probabilidad de exclusión de parentesco supere el valor 0.999 (utilizando los datos promedio obtenidos de los indicadores de variabilidad PIC, H y número de alelos para 10 loci). Por tanto los resultados obtenidos nos afirman en nuestra primera idea de la necesidad de un número no muy elevado de microsatélites para poder realizar controles de paternidad en ganaderías completas.

Referencias:

(1) Leroux et al 1990 Anim. Genet. 21:341-351. **(2)**Arevalo et al 1994 Anim. Genet. 25:202. **(3)**Linn et al 1994 Anim Genet. 25:203. **(4)**Pèpin et al 1995 Heredity 74:53-61. **(5)**Wang et al 1994 Nuc.Acids Res. 22(9):1774-1775. **(6)**Vega-Pla 1996 Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. **(7)**Chou et al 1992 Nuc. Acids Res. 20:1717-1723 **(8)**Jamieson 1994 Anim. Genet. 25:37-44.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por el INIA (Proyecto de demostración PD 95-010)

Tabla 2.- Secuencias de los 9 fragmentos de ADN con microsatélites clonados por nosotros en poblaciones de la raza Murciano-Granadina.

```
LOCUS       CHU80587      290 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 aaagcaaqtg aggaagtaga gccctactga ttgcactaaa tctatttagaa tctctctaat
  61 tcattcctta agggctctgt gatggcccat ggtatgttct atcataattt attcaggctt
 121 tcactagtga tgagtatttg ctttgttttc tcttttgtct ttaaaaatag gctataatga
 181 acattctata cttccccaac ctacatagtg tgtatgtgtg tctgtgtcca tctttagttg
 241 tttagtagct aagttgtgtc tgactctttg ccaaccccat aaacagtagc

LOCUS       CHU80588      580 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 tgatatcatt cacttgtagt gcagaactat aggcagtgct ttatctcagt atcttttctt
  61 gcatttgttt cctttctatta attatattaa tctatattgc agactggata gctacccacc
 121 aaactcaagc tgtgtttctc agctttcttt gctatagagt ggattctttac caatagaatg
 181 taagtagaat tgatgggtgt aactttctca ctgtggcaat taagaagtag atgtatacct
 241 tcttttattt tctaacctgc tggctgcata cagagagata gcacaaagcc acaatatgga
 301 agcagcctag gtcctcaaaa gactatccac caaccagaaa tcccttgtgtt ggatgttccc
 361 atttacagca aaactttcac tttgatccac tgtattttga tcatttgttg caacatttta
 421 cataactttt ctcaaaactt caacttcttc tgaattatct aatctccttt gtagagtttc
 481 agatacacac acacacacac acacacacac acacggttca ttttgttact gataatttgt
 541 gaaagtataa tgaatgaaag ggcttccttg cctggagaat

LOCUS       CHU80589      367 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 aactgaggtc attttattga gctcctgcat tcagctgtac ctaaaaccac actattcttg
  61 gatatttcca tgactttagc ctacacttta tctgtttcca tcatctatct tttattttta
 121 ctcattagtc actttgacatt agaatatagt tattttgact ttttatccag tgatatctta
 181 tttatttaaa atcttgatta atgtttttgt ttttaaaatt ttttccagct ctcatctata
 241 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgcacatt cagttgtgtc tattctttg tgacccctg
 301 aactgtagcc cgccaggctc tcctgtccat ggaattttcc aggcaagaac tttggagtgg
 361 gttgcca

LOCUS       CHU80590      239 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 gatcattcca gtgcacctac taaacattaa aaaaaaaaat tatatttcaa ctggttgtgt
  61 gtgtgtgtgt gtgtgagtgt gtgtgtatgt gtgtgtgtgt gtatgtgtgt gtgtgtgttc
 121 agttgctcag tttgtgtctga cccttttgcta ccccatggac tgtagtcagg ctcctccatc
 181 catggaattt tccagccaag aatactgcag tgggtagcca tttccatctc cagttgatc

LOCUS       CHU80591      251 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 gatcaaatta aaccccaagc tactggaaag tcaggtggtg cctcaggaaa gacaaagtca
  61 ctagaattag ttaaagacag actgcccagg gttgtgtgta tatgtgtgtg tgtgtgtatc
 121 tgtgtgtgtc tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc tatgtgtgtg tatgtctgtg tctgtatgtg
 181 tgtgtctgtg tctgtgtgtg tgtgtgtatg tgtgtgtgtg tgttatcaag gggtggaggt
 241 gcagacagat c

LOCUS       CHU80592      256 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 gatcaaaacc ttgcaaaggt ctaggtagag ttgatggaag caaacagcag atgtagatgg
  61 aggcggaggc taagaatttc agggagttat cactaccttt gtacctgctg ctgctgctgc
 121 ttactgctgc taagttgctt cagttgtgtc tgactctgtg catcccccata gacagcagcc
 181 caccaggctt cccgctcct ggaatttctcc aggcaagaac attggagtgg gttgccattt
 241 tcttctccag gggatc

LOCUS       CHU80593      377 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 gggaggcctc ccttggacta ctaaggtgag aagagaaccc tgccatttctg tgttattgca
  61 ctcccatttt tttctttcat ttgtttacc agttttataat ttctattcat ctataagttt
 121 gcttgactaa tgccttcaag ctctcctccc ttgtgtgtgt ttattagtca tgtcctactc
 181 tttgtggtct gttattaagc atgtaaatgt cccttctcat tttcaagcct ctatccaaat
 241 gctcccctct ctagtgccct tacccctacc tcccccaacc ctaagtagtt actgcccttt
 301 gcactctcac tgtaacttgg ctacaccttt gtgtcccagg ttcatcaatc gtaactaatt
 361 tacatgtctc tctttccc

LOCUS       CHU80594      442 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 atattatttgt catcatatgt cctagctatg acagtggttt attatctctt tggtgacaga
  61 tttattgaga tataatttgc ttacctataq ttcacccatt tgaagtaata taattcaata
 121 tttcaaatgt atccaaagtg ttctgcaacc atcatcacaa ttaatttaaa aactgtaaat
 181 caaggttggt gcgggggggtg gggggggcgg gaaacagata caaacacaca cacacaaatg
 241 tcattgatat ttaactatgt agttaacttt actggtcatt ttatttcttc attaaatttaa
 301 aatttttgt tctttcattt cagcctgaag gattccctcc ttgctgcggc tcacacccca
 361 cccagactag tttttgtgtc tcccaccagg gtctttgctt agcaagtgat tctatatgaa
 421 gcccaccttt taatttcaac cc

LOCUS       CHU80595      360 bp    DNA             MAM       01-JUN-1997

   1 gatcaaatgc ttttcttttc ctctgacaaa attagatttt gttcatttgg gtgtgtgtgt
  61 gtgtatttgg ggagggtggg tgttgcaagt ggatgctaca ttcaaaacag aaaatacttа
 121 caaaagtgtg actctttgta tcaaaggaaa atctcttttct ctttgaacaa gttagttctc
 181 agtaatctat ccccatcaac atccctgtag gccaagaaag tattgactca cccaccagcc
 241 tcgtgttccc ctccctttgct ttcctaagaa ggaggaatcta accagcttttg aaaaatatca
 301 tatattaatg cattcccttag tggctcagat ggtaaagtgt ctgtctacag tgcgagagac
```