DISEÑO DE UN SISTEMA "MULTIPLEX" PARA EL CONTROL DE PARENTESCO EN RUMIANTES DOMÉSTICOS

P. Bragança, J. J. Arranz y F. San Primitivo
Dpto. Producción Animal I, Facultad de Veterinaria
Universidad de León, 24071 León

INTRODUCCIÓN

Los distintos tipos de polimorfismos de DNA se han mostrado como los marcadores más útiles para el control de parentesco y la identificación individual, tanto en seres humanos (Alford *et al.*, 1994), como en animales domésticos (Pepin *et al.*, 1995). Entre ellos, los empleados con mayor frecuencia, son los microsatélites o secuencias STR (Simple Tandem Repeats), debido a que pueden ser analizados mediante PCR y por lo tanto, la prueba de parentesco se realiza de una manera fácil, rápida y con unas necesidades mínimas de material biológico. La gran variedad de microsatélites descritos en las distintas especies de animales domésticos, permite diseñar reacciones de amplificación para varios marcadores ("multiplex"), de modo que con una sola manipulación laboratorial se analizan varios *loci* independientes de forma simultánea y se alcanza un alto poder de resolución de genealogías dudosas (Heyen *et al.*, 1997).

Además, se ha observado una elevada conservación de este tipo de marcadores STR entre especies filogenéticamente cercanas, especialmente entre las distintas especies de rumiantes (Forbes *et al.*, 1995; Pepin *et al.*, 1995), de forma que un mismo marcador puede ser amplificado en individuos de especies distintas.

El propósito del presente trabajo es diseñar un sistema de control genealógico, basado en técnicas "multiplex", que pueda utilizarse en las tres especies de rumiantes domésticos (vaca, oveja y cabra) indistintamente y que alcance un poder de exclusión *a priori* superior al 99,9%.

MATERIAL Y MÉTODOS

El DNA se ha obtenido a partir de muestras de sangre o semen, utilizando el procedimiento de Miller *et al.* (1988).

Los marcadores utilizados y su localización cromosómica, así como las condiciones de PCR en cada reacción "multiplex" se detallan en la tabla 1.

Los productos de la reacción de PCR se mezclaron en las proporciones siguientes: 1 (Fam); 1,3 (Hex), 2 (Tet) y 5,7 de H_2O, respectivamente. Previamente a la migración electroforética se añadió 1 µl de la mezcla anterior, 0,5 µl del estándar de tamaño (GENESCAN-350®), 4 µl formamida y 0,5 µl de tampón de carga (25 mM EDTA, 50 mg/ml azul dextrano). La mezcla final se desnaturalizó durante 4 minutos a 94°C y se hizo migrar sobre un gel de secuenciación (4,25% poliacrilamida, 7M de urea), durante 2 horas, en un secuenciador automático ABI377. Los productos se analizaron con los programas de Applied-Biosystem: GeneScan para el análisis de tamaños y Genotyper 2.1 para la asignación de los alelos.

Los parámetros de variabilidad se han estimado a partir 32 muestras de ganado vacuno y otras tantas de ganado ovino, en ambos casos procedentes de 4 razas diferentes; además de 52 muestras de ganado caprino pertenecientes a un solo rebaño de raza Saanen. El cálculo del poder de exclusión en un problema de

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto AGF96-0819-CP)

parentesco se realizó utilizando las expresiones P_E para individuos elegidos al azar en la población y P_{Sn} para individuos emparentados, propuestas por Jamieson (1994). Para el contenido en información del polimorfismo (PIC) se ha empleado la fórmula de Botstein *et al.* (1980). El cómputo de exclusión conjunta $\boldsymbol{P_C}$ para varios polimorfismos se ha calculado utilizando la expresión: $P_C = 1 - \prod_{i=1}^{n} P_{Ei}$

Donde $\boldsymbol{P_{Ei}}$ es la probabilidad de exclusión de cada marcador y **n** el número total de marcadores.

Tabla 1. Marcadores utilizados, localización cromosómica, condiciones de PCR y composición de las reacciones "multiplex"

Multiplex	*Locus*	Cromosoma	Fluorocromo	Tm-ciclos	µM primers
	BM8125	17V, 17O, 17C	FAM	58ºC-30X	0,225
M1	*CSSM31*	24V, 23O, 24C	FAM	58ºC-30X	0,225
	ILSTS5	10V, 7O, 10C	FAM	58ºC-30X	0,115
	BM1818	23V, 20O, 23C	FAM	58ºC-30X	0,275
	INRA6	3V, 1O, 3C	TET	56ºC-30X	0,225
M2	*CSSM66*	14V, 9O, 14C	TET	56ºC-30X	0,225
	ILSTS11	14V, 9O, 14C	TET	56ºC-30X	0,225
	McM53	6V, 6O, 6C	HEX	58ºC-30X	0,225
M3	*RM006*	7V, 5O, 7C	HEX	58ºC-30X	0,225
	BM6526	27V, 26O, 27C	HEX	58ºC-30X	0,225

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se incluyen los porcentajes de exclusión P_E y P_{Sn}, así como el contenido en información del polimorfismo (PIC), que ha presentado cada marcador por separado y los valores P_C para cada reacción "multiplex" y para el total de reacciones.

Tabla 2. PIC y porcentaje de exclusión de parentesco: P_E entre individuos elegidos al azar; P_{SN} entre individuos emparentados, P_C exclusión conjunta.

		VACUNO			OVINO			CAPRINO		
Mult.	*Locus*	P_E	P_{Sn}	*PIC*	P_E	P_{Sn}	*PIC*	P_E	P_{Sn}	*PIC*
	BM8125	27,06	44,64	46,00	58,57	62,28	75,40	61,31	63,39	77,40
M1	*CSSM31*	51,74	59,70	70,50	79,10	69,22	88,60	71,37	65,09	83,50
	ILSTS5	18,38	39,70	36,80	61,21	63,22	77,10	52,57	34,02	70,40
	BM1818	45,23	55,82	64,40	72,96	67,30	84,90	41,54	51,06	58,50
	P_C(M1)	***84,26***	***94,06***		***99,09***	***98,60***		***96,93***	***95,87***	
	INRA6	63,72	64,41	79,20	49,85	59,03	69,30	64,88	64,53	79,70
M2	*CSSM66*	73,06	61,41	85,10	72,97	67,53	85,20	50,18	57,97	68,80
	ILSTS11	50,42	56,70	65,60	51,52	58,35	68,70	53,20	60,20	71,50
	P_C(M2)	***95,15***	***94,05***		***93,43***	***94,46***		***91,81***	***94,07***	
	McM53	79,80	69,53	98,20	73,34	67,56	85,30	61,44	62,81	76,70
M3	*RM006*	61,79	63,14	77,20	72,20	67,27	84,70	76,12	68,47	87,00
	BM6526	72,07	66,88	84,10	67,78	65,82	81,90	82,65	70,36	90,70
	P_C(M3)	***97,84***	***96,28***		***97,61***	***96,37***		***98,40***	***96,52***	
	P_C	**99,983**	**99,986**		**99,996**	**99,992**		**99,996**	**99,991**	

La información, expresada como PIC, indica que la variabilidad de cada marcador es, en general, elevada en todas las especies, oscilando entre el 65% y el 85% en la mayoría de los marcadores. En el caso de BM8125 y ILSTS5 se detectan valores bajos en ganado vacuno (36-46%) y altos en ganado ovino y caprino, reflejo de la diferencia en el número de alelos identificados en cada especie.

Por lo que se refiere al poder de exclusión entre individuos elegidos al azar "P_E", los marcadores se comportan de manera muy diversa en función de la especie elegida. En el contexto de las reacciones "multiplex" la que se muestra más eficaz en el conjunto de las especies es la M3 ya que, aunque la M1 contiene 4 marcadores, dos de ellos, mencionados en el párrafo anterior, (BM8125 y ILSTS5) presentan porcentajes de exclusión muy bajos en el ganado vacuno.

El poder de exclusión de los 10 microsatélites en conjunto, ya sea entre individuos elegidos al azar o entre individuos emparentados, se considera muy satisfactorio, siendo en todos los casos mayor del 99,9%. Hay que tener en cuenta que los índices de exclusión se calculan en función de las frecuencias génicas de cada población y los que aquí se presentan están estimados a partir de una mezcla racial de individuos no relacionados entre sí (en el caso del ganado vacuno y ovino). Esto supondría una mayor diversidad alélica y, en consecuencia, una sobrestimación del poder de exclusión real en condiciones de campo (análisis de individuos pertenecientes al mismo rebaño y con alto grado de parentesco entre ellos). De todas formas, los análisis realizados en nuestro laboratorio (Arranz *et al.*, 1995), en rebaños pertenecientes a diversas razas de vacas y ovejas, indican que el poder de exclusión no se ve disminuido en condiciones de campo, salvo en casos muy excepcionales de varias generaciones de endogamia. Resultados similares se observan también en el caso del ganado caprino analizado en el presente estudio, donde la muestra pertenece a un rebaño "real" de producción de leche y los poderes de exclusión son muy elevados.

De los 10 marcadores empleados, dos de ellos (CSSM66 y ILST11) se encuentran ligados en las tres especies animales con distancias superiores a 20 cM, por lo que, el efecto del ligamiento sobre el poder de exclusión resulta prácticamente inapreciable (Chakrabarty & Li, 1983).

A la vista de estos resultados, el sistema que proponemos puede ser considerado útil en el proceso rutinario de diagnóstico de parentesco en cualquiera de las tres especies de rumiantes domésticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alford, R.L., Hammond, H., Coto, I. & Caskey, C. (1994). *Am. J. Human Genet.*, **55**: 190-195.

Arranz, J.J., Ftirich, A., Tascón, C.D., Bayón, Y., y San Primitivo, F. (1995). *ITEA*, **16(A)**: 303-305.

Botstein, D. White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R. (1980). *Am. J. Human Genet.*, **32**: 314-331.

Chakrabarty, A. & Li, C.C. (1983). *Probabilities in parentage testing.* Pp 411-420. Am. Asso. Blood Banks, Arlington, Virginia, USA.

Forbes, S.H., Hogg, J.T., Buchanan, F.C., Crawford, A.M. & Allendorf, (1995). *Mol. Biol. Evol.*, **12**:1106-1113.

Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Evert, R.E., Green, C. Bates, S.R.E., Ziegle, J.S. & Lewin, H.A. (1997). *Anim. Genet.*, **28**: 21-27.

Jamieson, A. (1994). *Anim. Genet.*, **25 (Supp1)**: 37-44.

Miller, S. A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988). *Nuc. Acids Res.*, **16**:1215.

Pepin, L., Amigues, Y., Lépingle, A., Berthier, J.L., Bensaid, A. & Vaiman, D. (1995). *Heredity*, **74**:53-61.