

ESTUDIOS DE PEDIGREE EN LA ESPECIE CANINA MEDIANTE LA UTILIZACION DE MICROSATELITES: EJEMPLOS PRACTICOS.

Aznar, M.P.; Zaragoza, P. & Zarazaga, I.

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza.

Introducción

Un campo de gran importancia en la veterinaria es la identificación genética y el establecimiento de pruebas de paternidad y/o maternidad, que sirvan como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos de las distintas razas.

Dentro de la especie canina la identificación se ha realizado utilizando métodos clásicos basados en grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. A mediados de los 80 aparecen marcadores de ADN (minisatélites) que se utilizan con éxito para la asignación de paternidades.

En la actualidad los marcadores de ADN de elección son los microsátélites debido a que son altamente polimórficos, numerosos y homogéneamente distribuidos por todo el genoma, se estudian a partir de pequeñas muestras que contienen material genómico (sangre, semen...). Asimismo con un número pequeño de marcadores es posible alcanzar un porcentaje de exclusión de paternidad superior al 99% con un pequeño número de microsátélites.

Objetivos

Para la realización del presente estudio hemos seleccionado previamente en nuestro laboratorio 11 microsátélites, en los que hemos estudiado la variación existente a nivel del ADN. Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Obtención del ADN correspondiente a 3 familias completas con asignaciones dudosas de los reproductores.
- Identificación genética de todos los individuos mediante los 11 marcadores.
- Determinación de la incompatibilidad/compatibilidad de los cachorros de las familias estudiadas.

Material y métodos.

Un total de 31 animales de la especie canina se han empleado para la realización de este estudio. Estos animales pertenecen a tres familias, de las que disponemos de una camada completa y en las que el padre, por distintas causas, es dudoso. Las razas a las que pertenecen son: Rotweiler (13 animales), Pointer (11 animales) y una familia perteneciente a individuos cruce de distintas razas (7 animales).

Para la realización de los estudios de pedigree se han utilizado una serie de marcadores (11 microsatélites): VIAS-D10 (Primmer y Matthews 1993), LEI 008 (Mellersh et al. 1994) 002, 004, 101 and 111 (Holmes et al. 1993), RVC1, RVC4, RVC8, RVC11 and RVCE (Molyneux y Batt 1994). Para la amplificación de los microsatélites se han utilizado oligonucleótidos diseñados previamente por estos autores. Los datos estadísticos (frecuencias alélicas, polimorfismo y probabilidad de exclusión individual y combinada) fué calculada previamente en nuestro laboratorio (Aznar et al., 1996).

Resultados

Familia Rotweiler.

Una hembra Rotweiler había sido inseminada artificialmente con tres machos de diferente valor genético. El dueño quería saber cual era el padre de los nueve cachorros. Se utilizaron los 11 marcadores para determinar la paternidad. En este caso el microsatélite determinante fue el RVC11 puesto que los cachorros eran heterocigotos para los alelos 1 y 4, mientras que la madre era homocigota para el alelo 1, por lo que el padre debía ser portador del alelo 4 y esto sólo sucedía en uno de los padres.

Familia Pointer.

En esta ocasión la hembra Pointer se cruzó con dos machos dando una camada de 8 cachorros, en los que se desconocía la paternidad. Se utilizaron los 11 marcadores, siendo uno de los machos incompatible para siete de los microsatélites mientras que el otro fué compatible para los 11 microsatélites.

Familia híbrida

En la tercera familia la camada resultante del cruce de una hembra con dos machos era solo de tres cachorros. Se procedió como en los casos anteriores a la identificación individual de todos los animales mediante los 11 microsatélites, para

posteriormente determinar la compatibilidad/incompatibilidad de los cruces. El microsatélite 111 resultó ser determinante en la asignación de la paternidad puesto que la madre es homocigota para un alelo, siendo todos los cachorros portadores de ese alelo y de otro que debía provenir del padre y que solo se encontraba en uno de los posibles machos.

La utilización de los 11 loci en su conjunto nos da una probabilidad de exclusión combinada del 99,9%, lo que indica una gran eficacia para el chequeo de parentesco y por tanto su utilidad en asignaciones dudosas.

Referencias

AZNAR M.P., OSTA, R., MARTIN-BURRIEL, I. & ZARAGOZA, P. (1996). Evaluation of microsatellites markers for parentage identification in dogs. *XXVth International Conference on Animal Genetics*. Tours (France), 21-25 July 1996.

HOLMES, N.G., MELLERSH, C.S., HUMPHREYS, S.J., BINNS, M.M., HOLLIMAN, A., CURTIS, R. & SAMPSON, J. (1993). Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics* **24**, 289-292.

MELLERSH, C., HOLMES, N., BINNS, M. & SAMPSON, J. (1994). Dinucleotide repeat polymorphism at four canine loci (LEI 003, LEI 007, LEI 008 y LEI 015) *Animal Genetics* **25**, 125.

MOLYNEUX, K. & BATT, R.M. (1994). Five polymorphic canine microsatellites *Animal Genetics* **25**, 379.

PEURA T., HYTTINEN J.-M., TURUNEN M. & JANNE J. (1991). A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction *Theriogenology* **35**(3), 537-545.

PRIMMER, C.R. & MATTHEWS, M.E. (1993). Canine tetranucleotide repeat polymorphism at the VIAS-D10 locus. *Animal Genetics* **24**, 332.