

DETECCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA POR MICROSATÉLITES EN EL ALANO ESPAÑOL

MICROSATELLITE VARIATION IN SPANISH ALANO DOGS

Morera, L., D.F. de Andrés, M. Barbancho, J.J. Garrido y C.J. Barba

Grupo de Investigación *Marcadores genéticos moleculares en animales domésticos*. Facultad de Veterinaria. Departamento de Genética. Avda. Medina Azahara, 9. 14005 Córdoba. España.
E-mail: gm1mosal@lucano.uco.es

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

PCR. Perros. Marcadores genéticos. Pruebas de paternidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

PCR. Dogs. Genetic markers. Parentage testing.

RESUMEN

En una muestra de 35 alanos españoles se investigó la utilidad de los microsatélites para detectar variabilidad genética y para el control de paternidad. Los 4 microsatélites utilizados, descritos ya en la bibliografía, resultaron polimórficos, con un número medio de 5 alelos/*locus* y una heterocigosis media (H), de $0,70 \pm 0,06$, similar a la de otras razas caninas. Se ha detectado una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg para dos microsatélites debida a un déficit de heterocigotos. En un microsatélite se han detectado alelos inexistentes en otras razas españolas, por lo que podrían ser específicos de raza. La probabilidad acumulada de exclusión de paternidad es superior al 90 p.100, por lo que podrían ser eficaces para estas pruebas en alanos.

SUMMARY

We have studied a sample of 35 spanish alano dogs in order to estimate the level of genetic variability that can be detected by using

microsatellites and the efficiency of these genetic markers as tools for parentage testing in this canine population. We have used 4 microsatellites previously described in the literature. All of them were polymorphic, with an average number of 5 alleles/*locus* and an average gene diversity (H) of $0,70 \pm 0,06$, similar to the figures reported in others breeds. Two of the microsatellites showed disa-greement with Hardy-Weinberg proportions, due to a deficit of heterozygotes. We have found in one of the microsatellites alleles that could be breed specific, as they have not been detected in other spanish breeds. The combined exclusion probability detected is higher than 90 percent, suggesting the possibility of using efficiently microsatellites in parentage testing in the spanish alano population.

INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son regiones del genoma eucariótico en las que una

Arch. Zootec. 48. 63-70. 1999.

secuencia corta (2-6 pb) se repite cierto número de veces. A partir de la demostración de la existencia de variabilidad genética en estas regiones y la posibilidad de su detección mediante amplificación por PCR (Weber y May, 1989), los microsatélites se han convertido en la principal fuente de marcadores genéticos, ya que son abundantes, están distribuidos regularmente en el genoma, se heredan de forma codominante y poseen un elevado grado de variabilidad en las poblaciones. Debido a ello, están adquiriendo una importancia creciente en los últimos años en estudios sobre análisis de variabilidad genética y relaciones entre especies y razas, así como para controles de paternidad o identificación de muestras (Buchanan *et al.*, 1994; Marklund *et al.*, 1994; Sergio *et al.*, 1994; Vega Pla *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1997; Moazami-Gouadarzi *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997).

Con respecto al genoma canino, en los últimos años se han publicado resultados sobre identificación de microsatélites (Primmer y Mathews, 1993; Ostrander *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1993 y 1995), así como sobre su utilización para el desarrollo del mapa de ligamiento del genoma canino (Mellers *et al.*, 1997), estudios de diferenciación genética entre especies o razas (Fredholm y Winter, 1995; Pihkanen *et al.*, 1996) y controles de paternidad (Zajc *et al.*, 1994; Usha *et al.*, 1995; Fredholm y Winter, 1996).

Existe actualmente un creciente interés en las Asociaciones de criadores y en organismos oficiales en mejorar la gestión de los libros genealógicos de las razas caninas españolas (Anónimo, 1997). Para ello es necesario dis-

poner de marcadores genéticos que permitan la identificación individual y la realización de controles de paternidad. Los microsatélites, tanto por sus características mencionadas, como porque se ha demostrado su capacidad de detectar polimorfismo genético aún en especies en las que los marcadores clásicos no son capaces de hacerlo (Petit *et al.*, 1997), son los marcadores más adecuados para ello.

Recientemente se han iniciado trabajos sobre análisis de variabilidad genética, por medio de microsatélites, en poblaciones caninas de varias razas españolas: podenco andaluz, perro de agua, galgos y manetos, habiéndose detectado variabilidad en las cuatro razas, con un número de alelos entre 4-10/*locus*, una heterocigosidad entre 0,51-0,85 y una probabilidad de exclusión de paternidad que varía, para los diferentes microsatélites, entre 0,29-0,70 (Morera *et al.*, 1997).

En este trabajo se trata de estimar el grado de variabilidad genética que es posible detectar en la población de perros alanos españoles utilizando microsatélites, así como su eficacia para pruebas de control de paternidad en esta población.

MATERIAL Y MÉTODOS

El alano español es un perro de mediano tamaño y aspecto fornido, rústico y primitivo, de origen moloisoide, encuadrado entre los perros de presa. La alzada a la cruz es de 56-60 cm y el peso medio de 30-35 kg. El pelo es corto y abundante y la capa es generalmente atigrada o barcina, desde la gama más clara a la más oscura.

VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL ALANO ESPAÑOL

Tabla I. Características de los microsatélites. (Characteristics of the microsatellites).

Microsatélite	Sec. repetitiva	Alelos ¹	PIC ²	Ta	Mg	Referencia
AHT 101	(GT) ₂₃	7	0,72	56°	1 mM	Holmes <i>et al.</i> , 1993
VIAS-D10	(CATA) ₁₄	6	0,71	52°	1,5 mM	Primmer y Matthews, 1993
CXX.30	(GT) ₄ (CA) ₁₃	?	0,77	60°	1,5 mM	Ostrander <i>et al.</i> , 1993
CXX.140	(GT) ₁₅	?	0,76	60°	1,5 mM	Ostrander <i>et al.</i> , 1993

¹número de alelos descritos por los autores referenciados. ?: datos no disponibles.

²Valores PIC obtenidos por los autores en muestras compuestas por animales de varias razas.

Ta: temperatura de annealing; Mg: concentración de magnesio utilizada en la amplificación.

Reactivos: 200 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada primer y 0,5 unidades de Taq polimerasa, en un volumen final de 25 ml. La amplificación se realizó a partir de una dilución 1/100 de un lisado de linfocitos, obtenidos de las muestras de sangre y mantenidos a -20°C hasta su utilización.

Amplificación: 8 min a 95°, seguidos de 30 ciclos de 1 min / 94°, 1 min / Ta, 1 min / 72°, finalizando con 10 min a 72°.

Electroforesis: 5 ml del producto PCR más 5 ml de formamida, calentados 5 min a 95° y cargados en geles de acrilamida 6 p.100, 7M Urea.

Revelado: Tinción de plata, según Budowle (1991) y Vega Pla (1996).

Asimismo son muy comunes las capas leonadas o bayas, desde las tonalidades claras a las encendidas. La población está compuesta por unos 200 individuos (Sanz y Marín, 1982).

El trabajo se ha realizado con un grupo de 35 animales, localizados en diferentes lugares (Huelva, Sevilla y León) del área de distribución de la población. Cinco de ellos eran medio hermanos y el resto, según los datos conocidos, no emparentados. De cada animal se obtuvieron de 5-7 ml de sangre total, en tubos Vacutainer (EDTA-K). Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su traslado al laboratorio, dentro de las 24 horas siguientes a la extracción. De cada muestra se obtuvieron linfocitos, para la amplificación por PCR, mediante centrifugación (10 min, 10.000 rpm) en gradiente de densidad de Ficoll-

Hypaque. En la **tabla I** se indican los microsatélites utilizados, elegidos entre los descritos por su grado de variabilidad, así como los detalles de la técnica seguida para su detección.

La heterocigosidad esperada (He) para cada *locus* y la promedio para los cuatro *loci* se han calculado según Nei (1987). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg se ha realizado utilizando tests exactos mediante el método de cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992). Todos estos cálculos se han realizado con el programa TFPGA (Miller, 1997). Este programa también proporciona los datos relativos a las frecuencias alélicas y a la heterocigosis observada, por recuento directo, a partir del archivo base de datos. Los errores típicos correspondientes a las frecuencias alélicas y a la heterocigosis se han calculado, igualmente,

según Nei (1987). El déficit o exceso de heterocigotos para cada *locus* (f_i) y el déficit promedio para los cuatro *loci* (f) se han calculado mediante $f_i = (H_e -$

$H_o)/H_e$, ($H_o =$ heterocigosis observada) y $f = \sum f_i n_i (k_i - 1) / \sum n_i (k_i - 1)$, (n : número de animales, k : número de alelos, respectivamente, del *locus* i) (Kidd *et*

Tabla II. Resultados obtenidos para los microsatélites utilizados en el estudio de la muestra de perros alanos. (Results obtained in the study of the sample from spanish alano dogs).

<i>Locus</i>	Alelos	frecuencia ± error típico	<i>Locus</i>	Alelos	frecuencia ± error típico
AHT101 (n = 34)	1	0,021 ± 0,017	CXX.30 (n = 35)	1	0,148 ± 0,042
	2	0,229 ± 0,050		2	0,222 ± 0,049
	3	0,625 ± 0,058		3	0,093 ± 0,035
	4	0,125 ± 0,039		4	0,056 ± 0,027
				5	0,056 ± 0,027
				6	0,241 ± 0,051
				7	0,185 ± 0,046
Rango de tamaños (pb): 136 - 130 He ± e.t.: 0,559 ± 0,053 $f_i = 0,527$ Test H-W (p ± e.t.): 0,004 ± 0,003 PIC = 0,50 P.E. = 0,297			Rango de tamaños (pb): 173 - 151 He ± e.t.: 0,833 ± 0,017 $f_i = 0,005$ Test H-W (p ± e.t.): 0,75 ± 0,025 PIC = 0,80 P.E. = 0,645		
<i>Locus</i>	Alelos	frecuencia ± error típico	<i>Locus</i>	Alelos	frecuencia ± error típico
VIAS-D10 (n = 35)	1	0,065 ± 0,029	CXX.140 (n = 34)	1	0,357 ± 0,059
	2	0,210 ± 0,049		2	0,446 ± 0,060
	3	0,290 ± 0,054		3	0,179 ± 0,046
	4	0,306 ± 0,055			
	5	0,113 ± 0,038			
	6	0,016 ± 0,015			
Rango de tamaños (pb): 133 - 109 He ± e.t.: 0,775 ± 0,021 $f_i = -0,032$ Test H-W (p ± e.t.): 0,51 ± 0,022 PIC = 0,72 P.E.: 0,538			Rango de tamaños (pb): 143 - 139 He ± e.t.: 0,637 ± 0,025 $f_i = 0,308$ Test H-W (p ± e.t.): 0,03 ± 0,003 PIC = 0,55 P.E.: 0,337		
n = número de animales estudiados. Ho: heterocigosis observada, He: estimación insegada de la heterocigosis. e.t.: error típico; P.E.: probabilidad de exclusión de paternidad; PIC: contenido informativo del polimorfismo.					

al., 1980). La probabilidad de exclusión de paternidad para cada *locus* (PE), así como la probabilidad combinada de exclusión para los cuatro *loci* (PEG), se han calculado según Jamieson y Taylor (1997). Los valores PIC se han calculado según Botstein *et al.* (1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla II** se recogen los resultados obtenidos para cada uno de los cuatro microsatélites estudiados, en cuanto a los estadísticos descriptivos básicos, equilibrio Hardy-Weinberg y probabilidad de exclusión de paternidad. La **figura 1** muestra los alelos

detectados para uno de los microsatélites estudiados: VIAS-D10.

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

Los cuatro *loci* son polimórficos en la población de alanos. La variabilidad genética detectada, estimada por el número de alelos y la heterocigosis para cada *locus*, es bastante alta. El número de alelos varía entre 3 (*locus CXX.140*) y 7 (*locus CXX.30*), con un número medio de 5 alelos/*locus*. El rango de tamaños de los alelos, obtenido por comparación con un marcador de tamaños (pBR322 DNA, digerido con *MspI*), se muestra en la **tabla II**. La heterocigosis para cada *locus* oscila entre $0,55 \pm 0,053$ (*locus AHT101*) y $0,83 \pm 0,017$ (*locus CXX.30*), siendo

Figura 1. Alelos detectados para el microsatélite VIAS-D10 por electroforesis en geles de poliacrilamida 6 p.100-7 M Urea de 5 ml del producto de la amplificación por PCR y tinción de plata. (Alleles detected at the *locus* VIAS-D10. PAGE 6 percent-7M Urea and silver staining).

la heterocigosis media de $0,70 \pm 0,06$. Los valores PIC oscilan entre 0,50 (AHT101) y 0,80 (CXX.30), con un valor promedio de 0,64.

La variabilidad detectada por estos microsatélites en el alano español, comparada con la encontrada por los autores correspondientes en una muestra de animales de diversas razas (**tabla I**), es similar para los *loci* VIAS-D10 y CXX.30 e inferior para AHT101 y CXX.140. Respecto a la variabilidad hallada por otros autores en otras razas caninas, con microsatélites diferentes, nuestros valores son similares a los descritos por Pihkanen *et al.* (1996) en German Shepherd (5 alelos/*locus* y una heterocigosis media de 0,60), y algo superiores a los encontrados por Fredholm y Wintero (1995) en Flat-coated Retriever (4,5 alelos/*locus* y una heterocigosis media de 0,52) y Dachshlund (5,6 alelos/*locus* y una heterocigosis media de 0,55).

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Dos de los *loci* estudiados (VIAS-D10 y CXX.30) se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), mientras que otros dos se apartan de esta situación, debido en ambos casos a un déficit estadísticamente significativo de heterocigotos: AHT101 ($p < 0,01$) y CXX.140 ($p < 0,05$). El déficit promedio para el conjunto de los cuatro *loci* es estadísticamente no significativo ($f = 0,132$; $p > 0,05$). Diferentes factores pueden conducir a un déficit de heterocigotos, entre ellos la consanguinidad y la subestructuración poblacional (efecto Whalund). Un estudio más amplio, incorporando nuevos *loci* y aumentando el número de muestras de cada una de las áreas de

distribución de la población sería necesario para confirmar o descartar la existencia de un déficit global de heterocigotos en esta población y analizar sus posibles causas.

COMPARACIÓN CON OTRAS RAZAS ESPAÑOLAS

La comparación de los resultados descritos en alanos con los obtenidos previamente en otras cuatro razas españolas: galgo español, manetos, perro de agua español y podenco andaluz (Morera *et al.*, 1997), indica que el perfil genético detectado por estos microsatélites en la población de alanos es distinto al de las otras cuatro razas, lo que se pone manifiesto en la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias de los alelos comunes, así como en la existencia en uno de los *loci*, CXX.30, de alelos que aparecen, en el grupo de animales estudiado, como específicos de raza (alelos 1 y 3) o como prácticamente exclusivos de esta raza (alelo 2, que sólo se ha detectado, además de en los alanos, en los manetos y con una frecuencia inferior al 2 p.100).

Por otra parte, la población de alanos aparece como más homogénea genéticamente que las otras razas españolas. Esto se manifiesta en que tanto el número de alelos detectados como los valores de heterocigosis son, en general, menores. Esta situación puede ser debida, al menos en parte, a un efecto de deriva genética, causado por la drástica reducción de tamaño sufrida por esta población en el pasado siglo, hasta el extremo de llegar a ser considerada como extinta (Sanz y Marín, 1982). Pérdidas de polimor-

VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL ALANO ESPAÑOL

fismo genético en otras poblaciones caninas españolas, debidas a este efecto de deriva genética, han sido descritas en Perdiguero de Burgos, Ca de Bestiar y Podenco Canario (Jordana *et al.*, 1991).

PROBABILIDADES DE EXCLUSIÓN DE PATERNIDAD

Se ha estimado la posibilidad de realizar eficazmente pruebas de paternidad en la población de alanos, calculando la probabilidad *a priori* de exclusión de paternidad para cada microsatélite (**tabla II**). La probabilidad de exclusión acumulada para los cuatro *loci*, (0,92), indica que esto es factible. La realización de este tipo de pruebas requeriría, sin embargo, aumentar el número de microsatélites utilizados, tanto para alcanzar valores significativamente mayores de la probabilidad de exclusión acumulada, superiores al 99 p.100, como para evitar exclusiones incorrectas debidas a

mutación (Jamieson y Taylor, 1997).

En conclusión, dado que los microsatélites que hemos utilizado en este trabajo fueron elegidos sin un conocimiento previo de su valor como detectores de polimorfismo en la población de alanos, y que los cuatro han resultado polimórficos, poniendo de manifiesto un alto grado de variabilidad, nuestros resultados muestran la posibilidad de realizar eficazmente en ella, utilizando microsatélites, estudios de diferenciación genética respecto de otras razas, así como identificación de individuos y controles de paternidad.

AGRADECIMIENTOS

A todos los criadores, y especialmente a la Unión de Criadores del Alano Español, que han colaborado para la obtención de las muestras de sangre. Igualmente agradecemos su colaboración a BIOVET-UCO.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 1997. *Información Veterinaria*. (Cons. Gen. Col. Veterinarios de España). 187: 34.
- Botstein D., R. White, M. Skolnik and R.W. Dawis. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-31.
- Buchanan, F.C., L.J. Adams and R.P. Littlejohn. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 22: 397-403.
- Budowle, B. 1991. AMPFLPS-Genetic markers for forensic identification. *Crime Laboratory Digest*, 18: 134-136.
- Fredholm, M. and A.K. Wintero. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family. *Mammalian Genome*, 6: 11-18.
- Fredholm, M. and A.K. Wintero. 1996. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Animal Genetics*, 27: 19-23.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Holmes, N.G., C.S. Mellers and J. Sampson. 1993. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics*, 24: 289-292.
- Holmes, N.G., H.F. Dickens, H.L. Parker and J.

- Sampson. 1995. Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics*, 26: 132-133.
- Jamieson, A. and St.C.S. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28: 397-400.
- Jordana, J.J., J. Piedrafita y A. Sánchez. 1991. Variabilidad genética en diez razas caninas españolas. *Arch. Zootec.*, 40: 115-129.
- Kidd, K.K., W.H. Stone, C. Crimella, C. Carezzi, M. Casati and G. Rognoni. 1980. Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*. 11: 21-38.
- Marklund, S., H. Ellegren, S. Ericsson, K. Sandberg and L. Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 25:19-23.
- Mellers, C.S., A.A. Langston, G.M. Acland, M.A. Flemming, C.D. Aguirre and E.A. Ostrander. 1997. A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 46: 326-336.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Dpt. of Biological Sciences-Box 5640. Northern Arizona University.
- Moazami-Goudarzi, K., D. Laloë, J.P. Furet and F. Grosclaude. 1997. Analysis of genetics relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics*, 28: 338-345.
- Morera, L., E. Berlanga, D. de Andrés, J.J. Garrido, M. Barbancho y C.J. Barba. 1997. Microsatélites caninos: variabilidad en razas españolas. I Congreso de la S.E.G. Valencia. 163.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press
- Ostrander, E.A., F.G. Sprague and J. Rine. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics*, 16: 207-213.
- Petit, E., S. Aulagnier, D. Vaiman, C. Bouissou and B. Crouau-Roy. Microsatellite variation in a introduced mouflon population. *Journal of Heredity*, 88: 517-520.
- Pihkanen, S., R. Väinölä and S. Varvio. 1996. Characterizing dog breed differentiation with microsatellite markers. *Animal Genetics*, 27: 343-346
- Primmer, C.R and M.E. Matthews. 1993. Canine tetranucleotide repeat polymorphism at the VIAS-D10 locus. *Animal Genetics*, 24: 332.
- Sanz, J.M. y H. Marín. 1982. Los molosos de presa españoles. En: I Symposium Nacional de Razas Caninas Españolas, Marzo 19-21. Universidad de Córdoba, España, 187-95.
- Sergio, D., J. Pena and R. Chakraborty. 1994. Paternity testing in the DNA era. *Trends in Genetics*. 10 : 204-209.
- Usha, A.P., S.P. Simpson and J.L. Williams. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*, 26: 155-161.
- Vega Pla, J.L. 1996. Polimorfismo de ADN equino. Obtención de marcadores moleculares y su aplicación al control de filiación. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Vega Pla, J.L., J.J. Garrido, G. Dorado and D.F. de Andrés y Cara. 1996. Three new polymorphic equine microsatellites: HML2, HML3, HML5. *Animal Genetics*, 27: 215.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
- Williams, J.L., A.P. Usha, B.G.D. Urquhart and M. Kilroy. 1997. Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *Veterinary Record*, 140: 446-449.
- Zajc, I., C. Mellers, E.P. Kelly and J. Sampson. 1994. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Veterinary Record*, 135: 545-547.

Recibido: 30-4-98. Aceptado: 25-11-98.