

Identificación genética y control genealógico en equinos mediante secuencias microsatélites de ADN

J.A. Bouzada^{*,**}, J.M. Lozano^{*,**}, M.R. Maya^{*,**}, B. Ossorio^{*,**}, A. Trigo^{*,**}, M. Estévez^{*,**}, T. Mayoral^{**}, E. Anadón^{**}, C. Gómez-Tejedor^{**}

* Sanidad Animal y Servicios Ganaderos, S.A. (TRAGSEGA). Dirección de estudios y consultoría. C/ Conde de Peñalver 84, 28006 Madrid

** Laboratorio Central de Veterinaria. Ctra. de Algete, km 8. 28110 Algete Madrid

E-mail: jbouzada@mapa.es

Resumen

El Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV) ha sido nombrado centro de referencia para la realización de análisis de marcadores genéticos y la homologación de las técnicas para la identificación y el control de filiación en équidos, con el fin de garantizar las genealogías de los animales inscritos en los libros genealógicos (Real Decreto 662/2007). A partir de ese momento, se ha desarrollado un protocolo de trabajo que cubre la totalidad de los pasos a seguir desde la recogida de muestras en el campo hasta la recepción final de los resultados por parte de la asociación de ganaderos. La metodología empleada utiliza los medios más avanzados y tiene establecidos una serie de puntos de control para poder detectar los errores que pudieran producirse tanto en la recogida de muestras como en la transmisión de la información que a éstas debe acompañar para su posterior análisis. La optimización de la metodología empleada posibilita procesar un número elevado de muestras en un corto espacio de tiempo con una gran fiabilidad en los resultados obtenidos. El análisis al que se someten las muestras incluye 18 marcadores microsatélite de ADN, amplificados en una reacción única de PCR, elegidos de la lista propuesta por la ISAG (International Society for Animal Genetics). Se dispone, además, de dos paneles adicionales compuestos de 22 y 8 nuevos marcadores respectivamente, que son utilizados en los casos en que se necesita una mayor capacidad de exclusión o para llevar a cabo estudios de genealogías con datos de progenitores procedentes de otros laboratorios donde utilicen estos marcadores, algo bastante habitual en las razas equinas en las que existe gran movimiento de animales entre distintos países.

Palabras clave: Mejora genética, Microsatélites, Probabilidad de exclusión, ISAG

Summary

Genetic identification and pedigree control on horses through microsatellite DNA sequences

Central Veterinary Laboratory of Algete (LCV) has been appointed as a referral center for the analysis of genetic markers and certification of techniques for the identification and genealogical control in horses, in order to guarantee the genealogies of the animals entered in studbooks (Royal Decree 662/2007). Since then, it has developed a working protocol covering all the steps to follow from the collection of samples in the field until receipt of the final results by the breeders' association. The methodology uses the most advanced and has established a series of checkpoints in order to detect any errors that may occur in both the sample collection and transmission of information that must accompany them for later analysis. The optimization methodology enables to process a large number of samples in a short time with great reliability in the results. The analysis that the samples are submitted includes 18 microsatellite DNA markers, amplified in a single PCR reaction, chosen from the list proposed by the ISAG (International Society for Animal Genetics). It also provides two additional panels composed of 8 and 22 new markers, respectively, which are used in cases where there is a need for increased capacity of exclusion or to conduct studies pedigrees with data from parents from other laboratories where use these markers, which is quite common in horse races where there is great movement of animals between countries.

Key words: Genetic improvement, Microsatellites, Exclusion probability, ISAG

Introducción

La veracidad de los registros de los libros genealógicos es, habitualmente, uno de los puntos más débiles a la hora de llevar a cabo un programa de mejora genética. Muchas veces esta información no está contrastada o simplemente no es correcta. Es recomendable disponer de un sistema que permita certificar las relaciones genealógicas para evitar que existan animales incorrectamente filiados o cuya filiación no sea conocida. Otras veces, existe también la necesidad de asegurar la correcta identificación de los animales a lo largo de toda su vida o la trazabilidad de los productos a los que pueda dar origen (carne, células germinales, etc.). Ambas necesidades son especialmente importantes en las razas ganaderas de alto valor económico y cuyo propietario cambia con cierta frecuencia, entre las que se encuentran las razas equinas.

Con la publicación, el 25 de mayo, del Real Decreto 662/2007, el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV), del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, ha sido designado centro de referencia para la realización de análisis de marcadores genéticos y la homologación de las técnicas para la identificación y el control de filiación en équidos, con el fin de garantizar las genealogías de los animales inscritos en los libros genealógicos. Por este motivo se ha desarrollado un completo protocolo de trabajo que comienza con la extracción y envío de muestras desde las distintas ganaderías y termina con la recepción final de los resultados por parte del ganadero. Se han robotizado todos los procesos que ha sido posible con el fin de poder realizar un número elevado de análisis en un corto espacio de tiempo asegurando una total fiabilidad en los resultados obtenidos. Se han puesto a punto en el laboratorio la totalidad de los marcadores microsatélites de ADN que usan los laboratorios de todo el mundo que se dedican a este tipo de análisis para que, en los

casos necesarios, se pueda compartir la información, sin importar en qué laboratorio ha sido obtenida.

El laboratorio ha puesto a punto 48 marcadores microsatélites equinos, todos ellos presentes en la lista propuesta en los Test de Comparación Internacional de ADN Equino 2005/2006 coordinados por la ISAG (International Society for Animal Genetics) y entre los que se incluyen los 9 *loci* designados como el *set internacional mínimo* recomendado para los estudios de genotipado en los animales de la especie equina. Del total disponible, 18 de ellos se analizan en todas las muestras recibidas, amplificados en una reacción única de PCR. Existe un pequeño número de casos en los cuales es difícil llevar a cabo un estudio de filiación a partir de la información obtenida por estos marcadores para lo cual se han puesto a punto dos paneles auxiliares constituidos por 22 y 8 marcadores, respectivamente, y que puede ser empleada tanto para resolver los casos dudosos como en estudios de caracterización genética.

La capacidad de exclusión de las relaciones de paternidad mal asignadas es muy elevada cuando se llevan a cabo utilizando el panel principal, pero para los casos en que puedan existir dudas en los estudios de filiación se dispone de 30 marcadores que harán más fiable la decisión tomada.

En el presente trabajo se describe la metodología llevada a cabo en este laboratorio. Se muestran, además, los resultados obtenidos hasta este momento, después de haber analizado el grupo de 18 marcadores genéticos elegidos en más de 18.000 animales de la raza equina Pura Raza Española.

Material y métodos

El objetivo fundamental a la hora de llevar a cabo este trabajo, ha sido el desarrollo de

una metodología que permita una alta capacidad de procesamiento de muestras, total trazabilidad durante todo el proceso de análisis y alta fiabilidad de los resultados obtenidos, para ello se han robotizado la mayor parte de las etapas por las que deben pasar las muestras, y se ha informatizado la transferencia de información a lo largo las distintas etapas del análisis.

Material biológico

La recogida de muestras debe hacerse siguiendo un protocolo preestablecido para poder proceder a la posterior robotización de su tratamiento en el laboratorio. También es muy importante la correcta vinculación entre la muestra recién extraída y el animal del que procede. Se ha establecido el envío de muestras de sangre entera recogidas en tubos con un conservante de material biológico (*Magic Buffer*[®] de *BIOGEN Diagnóstica*). Este tipo de tubos presenta la ventaja de poder mantener las muestras a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo sin sufrir degradaciones indeseables, lo que facilita considerablemente su manipulación, envío y conservación posterior. Los tubos deben ir identificados de la forma: EQ#AAA0000 junto con su correspondiente código de barras que permitirá la lectura en el laboratorio. En casos excepcionales, en este tipo de tubos se pueden enviar muestras de semen, raíces de pelo o tejidos de diferente origen. El laboratorio contempla también la posibilidad del envío de muestras de sangre entera fijada en tarjetas *FTA*[®] (*Flinders Technology Associates*), formato recomendable para las muestras remitidas desde el extranjero. Este tipo de soporte ofrece, entre otras, la ventaja de poder ser transportado más fácilmente que la sangre líquida y la posibilidad de poder ser conservado durante largo tiempo a temperatura ambiente.

La recogida de información relacionada con los animales recién muestreados se realiza

mediante una terminal tipo PDA y se descarga posteriormente en las aplicaciones informáticas de las que disponen las distintas asociaciones de ganaderos desde donde es enviada de forma telemática al LCV e incorporada en una base de datos, *Filus*, diseñada específicamente para gestionar el flujo de información durante todo el proceso de análisis así como el envío final, a los ganaderos, de los resultados obtenidos.

Alicuotado y almacenamiento de muestras

Las muestras son identificadas a través de la lectura de su código de barras y alicuotadas, sin necesidad de abrir los tubos en que son recibidas mediante la *GENESIS Workstation 150* de *Tecan*. Una alícuota se utiliza en el proceso de análisis llevado a cabo en el laboratorio y el otro se mantiene en un banco de muestras disponible para usos futuros. El almacenamiento de las muestras se realiza en tubos *micronic*[®], cuya identificación se puede hacer mediante lectores ópticos automáticos debido al código matricial que llevan impreso y su ubicación queda recogida en *Filus*. El resultado final es la organización de los tubos individuales de muestras en placas de análisis de 96 pocillos (identificadas con un código del tipo EQ000AA) generando un fichero informático con la posición de cada una de ellas.

Extracción de ADN

Se lleva a cabo en las placas de 96 pocillos generadas en el proceso anterior en un *BioSprint 96* utilizando el *BioSprint 96 Blood Kit* (*Qiagen*), basado en la tecnología *MagnaAtract*[®].

Amplificación de secuencias

Se ha establecido un protocolo general basado en la amplificación, en una única

PCR *multiplex*, de 18 secuencias de tipo microsatélite, elegidas de la lista propuesta por la ISAG en el Test de Comparación Internacional de ADN Equino 2005-06 que será utilizado en los análisis habituales de exclusión de paternidad. Para la puesta a punto de esta reacción de tipo *multiplex* se han diseñado cebadores específicos para algunos marcadores intentando mejorar su rendimiento conjunto en esta reacción. En algunos casos se han utilizado cebadores específicos para evitar la existencia de alelos silentes que aparecen con los publicados con anterioridad. En esta reacción se incluyen: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, LEX33 y VHL20. Se han puesto a punto además, otros dos protocolos de análisis para casos donde es preciso aumentar la capacidad de exclusión. El primero analiza, también mediante una única PCR *multiplex*, 22 marcadores microsatélite entre los que se incluyen los 15 propuestos por *Tozaki et al.* (2001), junto con otros 7 usados internacionalmente. Algunos cebadores fueron modificados para evitar alelos solapantes. Las secuencias analizadas son: AHT29, AHT39, HMS8, LEX22, LEX27, TKY19, TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374, TKY394 y UCDEQ405. Por último, el tercer protocolo de análisis se basa en 8 secuencias microsatélites usadas también en otros laboratorios de todo el mundo: HMS18, HMS20, HMS5, HTG15, HTG3, TKY598, UM010 y UM011.

Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR, en los tres casos, se llevaron a cabo con: 2 µl de ADN extraído según se ha indicado, 7,5 µl de *Qiagen® Multiplex PCR kit (Qiagen)*, 4 µl de Agua estéril ultrapura y 1,5 µl de una mezcla maestra de

cebadores donde están contenidas las parejas de oligonucleótidos necesarias para amplificar el conjunto de secuencias propuestas. La mezcla de componentes ha sido llevada a cabo en un *Aquarius 96 MultiPipettor (Tecan)*. El protocolo de amplificación consistió en: 15' a 95 °C (por estar utilizando una *Taq Hot Start*); 35 ciclos de: 30" a 95 °C, 1:30' a 58 °C y 1' a 72 °C; y por último una fase de elongación final de 30' a 72 °C. El proceso ha sido llevado a cabo en un *GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)*.

Electroforesis capilar

Las muestras amplificadas en el proceso anterior fueron analizadas mediante electroforesis capilar de fragmentos de ADN marcados por fluorescencia, en el analizador genético *ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer*. Las muestras estuvieron constituidas por: 9,8 µl de Formamida (*Applied Biosystems*), 0,2 µl de *GeneScan™ 500LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems)* y 1,5 µl de ADN resultado de la reacción de PCR anterior (diluido con 75 µl de agua). La mezcla de componentes ha sido llevada a cabo automáticamente en un *Aquarius 96 MultiPipettor (Tecan)*.

Análisis de los polimorfismos

La interpretación de los resultados obtenidos se llevó a cabo empleando el software de análisis *GeneMapper™ de Applied Biosystems* en el cual, previamente se definieron las denominaciones de los distintos alelos siguiendo la nomenclatura ISAG.

Estudios de filiación

El laboratorio cuenta con una aplicación informática, *Filus*, diseñada específicamente para almacenar toda la información relacio-

nada con cada una de las muestras recibidas, poder seguir todo el proceso de análisis al que es sometida cada una de ellas y por último, una vez interpretados los resultados obtenidos en los análisis a que han sido sometidas en el laboratorio, poder dar un respuesta, vía telemática, a las solicitudes planteadas por los ganaderos. Los análisis solicitados, en estos momentos, pueden ser: genotipado de microsatélites, control de identidad y control de filiación. La base de datos permite estudiar las solicitudes de análisis recibidas de manera automatizada y a partir de ello emitir el dictamen correspondiente. Las distintas asociaciones pueden conocer en qué punto del proceso de análisis se encuentra cada muestra en un momento concreto, o conocer el resultado final, si éste ya ha sido obtenido, a través de un acceso web habilitado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para tal fin usando una clave secreta.

Estudios estadísticos

A partir de los datos obtenidos se han calculado los siguientes parámetros de variabilidad genética: Heterocigosidad (H) (Ott, 1992), el Contenido de Información Polimórfica (PIC), calculado según la fórmula de Botstein *et al.* (1980), la Probabilidad de Exclusión de cada marcador (PE) según la expresión propuesta por Jamieson y Taylor (1997) y la global (PEG) del conjunto de los 18 marcadores utilizados en este laboratorio.

Resultados y discusión

El LCV ha puesto a punto la amplificación de 48 secuencias microsatélites de ADN equino elegidas de la lista propuesta por la ISAG, distribuidas en 3 reacciones de PCR de tipo *multiplex*. De ellos, 4 (LEX3, LEX227, LEX27 y TKY598) están ubicados en el cromosoma X,

algo a tener en cuenta a la hora de seguir su transmisión de padres a hijos. Estos marcadores son útiles, además, para detectar errores en la asignación del sexo en los animales analizados. Para lograr su amplificación conjunta, ha sido necesario, en algunos casos, utilizar cebadores distintos a los publicados en la bibliografía, a veces modificando los rangos de distribución alélica y otras simplemente buscando una mayor eficiencia en su amplificación en una reacción *multiplex* (AHT5, LEX3, LEX33 y TKY394). También se han utilizado cebadores con nucleótidos degenerados para poner de manifiesto alelos silentes de algunos de los microsatélites usados y que de no ser corregidos, darían lugar a falsas incompatibilidades de las genealogías propuestas (ASB2, HTG10 y HMS3).

Los análisis habituales de filiación han sido llevados a cabo usando 18 marcadores, el resto han sido utilizados únicamente para poder resolver filiaciones dudosas con los marcadores habituales. La nomenclatura usada para la denominación alélica ha sido la consensuada internacionalmente por la ISAG. En los marcadores con nomenclatura no estandarizada, los alelos se han nombrado mediante su longitud en pares de bases (AHT29, AHT39, HMS8, UCDEQ405, UM010 y UM011). Se han detectado microsatélites con alelos que no siguen la pauta normal de longitud (AHT29 y UM011), en cuyo caso se ha seguido estrictamente el criterio de su longitud en pares de bases como forma de nomenclatura.

En la tabla 1 se presentan los resultados generales para cada uno de estos 18 loci microsatélite del panel principal, después de analizar más de 18.000 equinos de Pura Raza Española. Se muestra el número de alelos encontrados en cada uno de ellos y el número medio para las secuencias estudiadas que, en este caso, es de 10,33 (con unos valores que oscilan entre los 6 encontrados en el HTG7 y los 15 del ASB17). Se observa



Tabla 1. Resultados obtenidos analizando los marcadores del panel principal en equinos de Pura Raza Española

Table 1. Results obtained by analysing the main panel markers in horses Pure Spanish Bred

Locus (Cromosoma)	Nº de alelos	Rango	H	PIC	PE
AHT4 (24)	9	144-162	0,74104	0,69943	0,51405
AHT5 (8)	9	126-147	0,74011	0,70655	0,53103
ASB17 (2)	15	96-127	0,83761	0,81871	0,68134
ASB2 (15)	13	220-257	0,79697	0,76621	0,59780
ASB23 (3)	13	183-212	0,70749	0,65814	0,46589
CA425 (28)	10	230-251	0,47560	0,45420	0,29292
HMS1 (15)	9	174-191	0,57806	0,48772	0,28955
HMS2 (10)	10	217-240	0,71467	0,66908	0,47954
HMS3 (9)	9	146-170	0,76942	0,73574	0,56220
HMS6 (4)	9	159-172	0,75179	0,71139	0,52527
HMS7 (1)	9	172-187	0,67866	0,63314	0,44110
HTG10 (21)	12	94-105	0,78598	0,75664	0,59215
HTG4 (9)	8	126-139	0,65937	0,60489	0,41061
HTG6 (15)	11	81-105	0,60747	0,53059	0,33024
HTG7 (4)	6	120-132	0,30399	0,27236	0,14574
LEX3 (X)	12	139-164	0,80183	0,77470	0,61343
LEX33 (4)	11	194-221	0,77410	0,74243	0,57349
VHL20 (30)	11	87-108	0,74774	0,72058	0,55277
Media:	10,33				PEG:0,999995

H: Heterocigosidad, PIC: Contenido de información polimórfica, PE: Probabilidad de exclusión, PEG: Probabilidad de exclusión global.

que, en esta raza, la mayoría de los marcadores elegidos presentan valores de PIC (*Contenido en Información Polimórfica*) superiores a 0,5 lo que los hace altamente informativos. Sólo están por debajo de esta cifra, el CA425, HMS1 y HTG7. Otros paneles propuestos que contienen parte de las secuencias microsatélites aquí analizadas han demostrado tener también alta capacidad de exclusión en otras razas equinas, como la Pura Raza Galega (Bouzada et al., 2004), la Pura Raza Española (Bouzada et al., 2007), el Asturcón (Royo et al., 2005), la Mallorquina y la Menorquina (Azor et al., 2007). Algunos de estos marcadores han sido usados también en estudios con razas asnales españolas como la Catalana, Mallorquina, Encartaciones, Zamorano-

Leonesa o Andaluza (Aranguren-Méndez et al., 2001), dando como resultado también elevados valores de PIC.

Los 18 marcadores analizados en los animales de la raza equina Pura Raza Española proporcionan una probabilidad de exclusión global (PEG) del 99,9995%, por lo tanto, una alta capacidad de excluir genealogías incorrectamente asignadas. La mayor probabilidad de exclusión individual la proporciona el ASB17, que además es también el microsatélite que ha presentado mayor número de alelos, 15, no superando ninguno de ellos el 15% de frecuencia alélica. La menor probabilidad de exclusión la aporta el HTG7, que a su bajo número de alelos, 6, el hecho de que uno de ellos presente una frecuencia

próxima al 82%. Estos valores son similares a los encontrados en trabajos de este tipo, aunque analizando un número menor de animales, realizados en otras razas equinas españolas e italianas (Bouzada et al., 2004; Royo et al., 2005; Marletta et al., 2006).

A pesar de la alta capacidad de exclusión que ofrece el panel principal de marcadores se ha considerado interesante disponer de un panel adicional para resolver casos en los que, por alguna razón, se necesite una mayor capacidad de exclusión. Dentro de este grupo se sitúan 30 marcadores, 15 de los cuales son usados en muchos laboratorios del mundo (Tozaki et al., 2001). Estos microsatélites ofrecen una alta capacidad de exclusión en las razas equinas en las que han sido estudiados, además de presentar una distribución de rangos de tamaño muy adecuada para su organización en una reacción *multiplex* de PCR.

Bibliografía

- Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gómez M, 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 433-442.
- Azor PJ, Valera M, Gómez MD, Goyache F, Molina A, 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 37-42.
- Botstein D, White M, Skolnik M, Dawis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Gen.*, 32, 314-331.

Bouzada JA, Fernández A, Prado C, Areán H, Pose H, Rivero G, Fernández M, Viana JL, 2004. Análisis de marcadores moleculares de tipo microsatélite para el control genealógico del Caballo de Pura Raza Galega. IV Congreso ibérico sobre Recursos Genéticos Animales.

Bouzada JA, Lozano JM, Maya MR, Ossorio B, Trigo A, Anadón E, Mayoral T, Gómez-Tejedor C, 2007. Control genealógico en el caballo de Pura Raza Española mediante análisis de 18 marcadores microsatélites de ADN. I Congreso Nacional de Zootecnia.

Jamieson A, Taylor StCS, 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28, 387-400.

Marletta D, Tupac-Yupanqui I, Bordonaro S, García D, Guastella AM, Criscione A, Cañon J, 2006. Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.*, 123, 315-325

Ott J, 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Gen.*, 51, 283-290.

Royo LJ, Álvarez I, Fernández I, Gutiérrez JP, Martínez JL, Gómez E, Goyache F, 2005. Análisis preliminar de dos poblaciones de pony céltico de Asturias usando marcadores microsatélites. XI Jornadas sobre Producción Animal.

Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, Miura N, Choi-Miura N, Tomita M, 2001. Population study and validation of paternity testing for throughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 1191-1197.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)