

COMUNICACIÓN

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MITOCONDRIAL EN VARIAS RAZAS CANINAS

AMPLIFICATION AND SEQUENTIATION OF MITOCHONDRIAL ADN FRAGMENTS IN SEVERAL DOG BREEDS

Gómez, M.¹, A. Fullaondo², E. González-Txabarri³ y W.J. Ávila³

¹Servicio de Ganadería, Diputación Foral de Bizkaia. Avda. Lehendakari Agirre nº 9-2º. 48014 Bilbao. España.

²Departamento de Genética. Universidad del País Vasco. España.

³Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria U.C.Madrid. Avda Puerta de Hierro, s/n 28040 Madrid. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

PCR.

ADDITIONAL KEYWORDS

PCR.

RESUMEN

Los resultados aconsejan profundizar en los estudios sobre genes mitocondriales ante la posibilidad de que existan otros marcadores genéticos que permitan calcular el grado de divergencia de las razas caninas.

SUMMARY

The results suggest the convenience of further research on mitochondrial genes because of the possible existence of other genetic markers which allow to calculate the divergence degree of canine breeds.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se están realizando numerosos esfuerzos para identificar y recuperar razas caninas autóctonas en nuestro país.

Los modelos para la inclusión de un

animal dentro de una raza canina son muy estrictos, basándose en características morfológicas, tanto cualitativas como cuantitativas.

Aunque los datos morfológicos pueden reflejar los procesos históricos de una raza, se encuentran muy influidos por presiones de selección, al contrario de lo que ocurre con los datos bioquímicos (Crouan Roy, 1990).

Pero los estudios bioquímicos, aplicados sobre razas españolas, aportan resultados muy controvertidos (Jordana *et al.*, 1992). En este sentido, las técnicas de estudio del material genético están consideradas como un instrumento útil en los estudios de genética molecular evolutiva (Vawter y Brown, 1986), pudiendo inferir relaciones filogenéticas mediante la comparación de las secuencias de ADN mitocondrial (ADN mit).

A nivel mitocondrial, es de esperar que la tasa mutacional sea más alta. Por ésto, incidimos en la búsqueda de algún gen mitocondrial del que se podría esperar que aportase información filogenética a nivel molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de cuatro razas caninas: *Euskal Artzain Txakurra*, raza canina autóctona de Euskadi, con sus dos variedades: *Iletsua* (EATi) y *Gorbeiakoa* (EATg), *Gos d'Atura Catalá* (GAC), *Petit Berger des Pyrénées* (BP) y *Villano de Las Encartaciones* (VE), las tres primeras de aptitud de pastoreo y la última de presa. Estas razas fueron escogidas en base a su proximidad geográfica. Además se obtuvo otra muestra del lobo ibérico, *Canis lupus signatus*.

Las muestras de sangre se conservaron en tubos de EDTA hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

Tras la extracción del ADN mit de las muestras sanguíneas de los seis cánidos (cuatro razas caninas, una con dos variedades y el lobo ibérico), se comprobó la calidad del ADN, electroforéticamente sobre geles de agarosa para comprobar que no estaban contaminados con la presencia de ARN después del tratamiento con ARNasa.

Se procedió a la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN mit que codifica para el gen ARN 12s y el citocromo b (cyt b).

Los detalles del procedimiento están reflejados en Gómez, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los oligonucleótidos o *primers* utilizados, tanto el gen ARN 12s como el cyt b, son capaces de amplificar las muestras de las razas de cánidos estudiadas. El gen ARN 12s no presenta suficientes variaciones en la secuencia para distinguir unas razas caninas de otras. Al secuenciar con este gen las muestras correspondientes a *Canis lupus signatus*, no hemos encontrado ninguna sustitución puntual. La secuencia del cyt b ha sido más manifiesta, ya que se encontraron sustituciones específicas en las diferentes razas: el VE presenta 55 sustituciones respecto al EATi. No se encontraron diferencias significativas entre el EATi, el BP y el GAC. No fue posible amplificar con el cyt b el EATG. En definitiva, el cyt b se puede emplear para separar razas y agrupaciones raciales caninas.

Por otra parte, se procedió a comparar las secuencias obtenidas en estas razas caninas con la del Lobo Etíope (Gottelli *et al.*, 1994). Los porcentajes de sustitución (p. 100 de homología del ADN) obtenidos fueron: EATi vs. BP fue del 99,7 p.100, EATi vs. Lobo Etíope fue del 95,3 p.100 y del EATi vs. VE fue del 83,9 p.100.

Los resultados obtenidos con el ARN 12s no han permitido establecer diferencias moleculares, pudiendo deberse a una menor tasa mutacional con respecto a la separación de razas caninas.

En cambio, el cyt b ha marcado diferencias entre una agrupación canina típica de perro de presa, el VE, frente al resto de los perros de pastor, por lo que la amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN mit

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL EN RAZAS CANINAS

pueden considerarse como una herramienta eficaz de apoyo a la diferenciación de las razas. Estos resultados aconsejan profundizar en esta línea de

estudios ante la posibilidad de que existan más marcadores genéticos que nos permitan calcular el grado de divergencia de razas caninas

BIBLIOGRAFÍA

- Cruoan Roy, B. 1990. Evolutionary systemic of three species of troglobitic beetles: electrophoretic and morphological evidence. *Genetic Sel. Evol.*, 22: 189-203.
- Gómez, M. 1995. El Euskal Artzain Txakurra (Perro de Pastor Vasco): Descripción y tipificación racial. Tesis doctoral nº 24. Departamento de Industria, Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- Gottelli, D., C. Sillero-Zubiri, G.D. Applebaum, M.S. Roy, D.J. Girman, J. García Moreno, E.A. Ostrander and R.K. Wayne. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: The Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Mol Ecol.*
- Jordana, J., J. Piedrafita and A. Sánchez. 1992. Genetic relationships in Spanish dog breeds. The analysis of biochemical polymorphism. *Genetic. Selec. Evol.*, 24: 245-264.
- Vawter, L. and W.M. Brown. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparison reveal extra rate variation in the molecular clock. *Science* 234: 194-196