

DETECCIÓN DE VARIABILIDAD EN RAZAS CANINAS AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS MEDIANTE MARCADORES RAPD

VARIABILITY IN SPANISH DOG BREED DETECTED BY RAPD MARKERS

Morera Sanz, L., C.J. Barba Capote y J.J. Garrido Pavón

Unidad Mixta CSIC-UCO (Marcadores genéticos moleculares). Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara nº 9. 14005 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Marcadores moleculares.

ADDITIONAL KEYWORDS

Molecular markers.

RESUMEN

Se describe la variabilidad de razas caninas autóctonas españolas estudiada con marcadores RAPD previamente descritos para la detección de polimorfismo en razas caninas Galgo Español, Podenco, Perro de Agua (PAE) y Alanos, mostraron diferencias en el número y tamaño de las bandas amplificadas. Las mayores diferencias se obtuvieron al utilizar la pareja de iniciadores RAPD1+2, que detectan 4 bandas en Alanos (tamaños aproximados de 400, 500, 700 y 850 pb), 2 en PAE (\approx 400 pb y \approx 500 pb) y solamente una (\approx 400 pb) en Galgos y Podencos.

SUMMARY

We described the results obtained in a study in four dog Spanish breeds with RAPD markers, previously described as useful in detecting variability in dog populations. We have detected differences among breeds both in the number and size of amplified bands. The larger differences were detected using the pair of primers RAPD1+2, which detected 4 bands in Alanos, 2 in Perro de Agua and only one in Podenco and Galgo.

INTRODUCCIÓN

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la PCR, utilizando como iniciadores oligonucleótidos cortos (10-15 bases) de secuencia aleatoria, es una técnica para detectar polimorfismo genético. Desarrollada por Welsh y McClelland (1990) y conocida como RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), se basa en la utilización de condiciones poco restrictivas, en la etapa de unión de los iniciadores al ADN. Todas aquellas regiones del ADN en las cuales se produzca la unión de estos iniciadores en lugares suficientemente próximos y situados en cadenas opuestas, resultarán amplificadas. El resultado es la obtención de un conjunto de fragmentos amplificadas, cuyo número y tamaño (pb) son característicos del iniciador y del ADN molde utilizados. El polimorfismo (diferencias en el patrón de bandas) se produce por la existencia de diferencias entre individuos en

la secuencia de bases del lugar de unión de los iniciadores, causadas por mutaciones puntuales o estructurales, que permiten la unión en unos individuos pero no en otros.

Las ventajas de esta técnica sobre otras utilizadas para la detección de variabilidad genética, han favorecido su aplicación tanto en humanos como en perro (Rothuizen y van Wolferen 1993; Olivier *et al.*, 1999), vacuno (Gwakisa *et al.*, 1994), caballo (Bailey y Lear 1994) y ovino (Kantanen *et al.*, 1995), en los que se ha utilizado para la caracterización de razas, marcadores específicos de raza o la detección de enfermedades genéticas.

En este trabajo presentamos los resultados de un estudio para evaluar la utilidad de la técnica RAPD para detectar polimorfismo genético en poblaciones caninas autóctonas españolas. Para la amplificación hemos utilizado, mezclas de muestras de ADN, así como muestras individuales. La amplificación de una mezcla de muestras de ADN, ha sido utilizada en diversos trabajos (Gwakisa *et al.*, 1994; Bailey y Lear 1994) y permite evaluar de forma rápida la capacidad de un gran número de iniciadores para detectar polimorfismos específicos de razas o poblaciones. La amplificación de muestras individuales permite estimar, mediante la comparación de los patrones de bandas obtenidos en cada caso, la variabilidad genética entre razas y dentro de razas.

MATERIAL Y MÉTODOS

RAZAS Y MARCADORES

Se estudiaron individuos de las ra-

zas Galgo español, Podenco Andaluz, Perro de Agua Español (PAE) y Alanos, localizados en diferentes lugares de su zona de distribución. Se utilizaron seis marcadores RAPD previamente descritos como útiles para la detección de polimorfismo en razas caninas (Rothuizen y van Wolferen 1993).

DETECCIÓN

Veinte ng de ADN, obtenidos a partir de sangre fresca, o 5 ml de una dilución 1/20 de linfocitos congelados y descongelados, fueron amplificados

Tabla I. Marcadores RAPD para los que se detectaron diferencias entre las razas (bandas específicas) a partir de los análisis de mezclas de muestras. (RAPD markers for which breed differences were detected).

	Tamaño de las bandas (pb)					
	280	680	720	1020		
RAPD5	280	680	720	1020		
Galgos	+	+	-	-		
PAE	+	+	-	-		
Alanos	+	+	+	+		
RAPD1+2	400	500	700	850		
Galgos	+	-	-	-		
Podencos	+	-	-	-		
PAE	+	+	-	-		
Alanos	+	+	+	+		
RAPD1+4	210	280	400	450	500	620
Galgos	+	+	+	+	-	+
Podencos	+	+	+	+	-	+
PAE	+	+	+	+	+	+
Alanos	+	+	+	-	-	+
RAPD3+4	400	500	950	2000		
Galgos	+	+	+	+		
PAE	+	-	+	-		
Alanos	+	-	+	-		

+/- : presencia / ausencia de la banda correspondiente; PAE: perro de agua español.

Tabla II. Número de bandas (número medio entre paréntesis) y rango de tamaños (pb) observados para los marcadores RAPD en los que no se detectaron bandas específicas de raza, pero sí diferencias entre individuos. (Average number and range sizes of bands for markers with no breed specific bands but with individual differences).

	Número de bandas (media)	Rango de tamaños (pb)
RAPD2	5 - 9 (7,5)	280-1000
RAPD4	6 - 8 (7)	240-850
RAPD1+4	4 - 7 (6,5)	200-600
RAPD4+5	8 - 10 (9)	160-2000

por PCR (5 min a 95°, seguidos de 35 ciclos de 94°, 1min → 35°, 30 s → 72°, 1 min). Para la amplificación se usaron 125 μM de desoxinucleótidos, 2,5 mM MgCl₂, 1 μM de iniciador y 0,5 U de polimerasa Taq, en un volumen final de 25 μl. Se analizaron, para cada raza, muestras individuales y mezclas, hechas añadiendo cantidades iguales de ADN o linfocitos de 10 animales de la misma raza. 15 μl del producto PCR, mezclado con 3 μl de azul de bromofenol (0,25 p.100), se sometieron a electroforesis en agarosa 2 p.100, en tampón TBE 0,5x, durante 1 hora a 100 V. El revelado se hizo con Bromuro de etidio (0,5 μg/ml).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El índice de similitud del patrón de bandas se calculó según Lynch (1990), como $S = 2 N_{XY} / (N_X + N_Y)$, siendo N_{XY} el número de bandas comunes a los individuos A y B; N_X y N_Y el número

de bandas de los individuos X e Y. El valor medio del índice de similitud se calculó por $S = \sum S_i / n$, siendo S_i el valor del índice para el par i y n el número de comparaciones efectuadas. El error típico del índice de similitud se obtuvo mediante la expresión S.E.: $2S(1 - S)(2 - S)/N(4 - S)$, en la que N es el número medio de fragmentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rango de tamaños de las bandas observadas para el conjunto de los RAPDs fue de 160-2000 pb, algo diferente del obtenido (100-1500 pb) con estos marcadores (Rothuizen y van Wolferen, 1993), en animales de 16 razas no españolas (1 animal/raza). Esto indica que hemos amplificado bandas, ausentes en estas razas no españolas. Para cuatro marcadores RAPD o combinaciones de ellos, se han registrado posibles bandas específicas: presentes en una raza y ausentes en las otras (**tabla I**). La supuesta banda específica se mostró en cada uno de los 10 animales utilizados para hacer la mezcla, estando ausente en los demás. Las mayores diferencias entre razas se obtuvieron utilizando los marcadores 1 y 2 simultáneamente, (RAPD1+2): en este caso se observaron 4 bandas en Alanos (≈ 400, 500, 700 y 850 pb), 2 en PAE (≈ 400 y ≈ 500 pb) y una (≈ 400 pb) en Galgos y Podencos.

Para otros cuatro marcadores RAPD o combinación de ellos, aunque no se detectaron bandas específicas de raza, sí se obtuvieron patrones de bandas que mostraron diferencias entre individuos, entre y dentro de razas (**tabla II**). Para los marcadores en los que se

Tabla III. Índices de similitud media para los marcadores RAPD2, RAPD4, RAPD1+4 y RAPD4+5, entre y dentro de razas, obtenidos a partir de 15 comparaciones/marcador. Entre paréntesis se indican los errores típicos. (Average similitud index for the markers studied).

	Galgos	Podencos	PAE	Alanos
Galgos	0,91 (0,13)	0,88 (0,09)	0,86 (0,12)	0,85 (0,07)
Podencos		0,87 (0,12)	0,87 (0,12)	0,83 (0,08)
PAE			0,93 (0,10)	0,88 (0,09)
Alanos				0,89 (0,18)

detectaron diferencias individuales pero no bandas específicas de raza, el índice de similitud entre y dentro de razas, obtenido a partir de 15 comparaciones/marcador, no muestra diferencias significativas, ni entre ni dentro de razas (**tabla III**).

Los resultados obtenidos indican que la variabilidad genética detectada por estos marcadores RAPD en las razas estudiadas, es menor que la detectada, en estas mismas razas, utilizando microsatélites (Morera *et al.*, 1999 a y b).

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, E. and T.L. Lear. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RPAD markers. *Animal Genetics*, 25: 105-108.
- Gwakisa, P.S., S.J. Kemp and A.J. Teale. 1994. Characterization of zebu cattle breeds in Tanzania using RAPD markers. *Animal Genetics*, 25: 89-94.
- Kantanen, J., J. Vilkki, K. Elo and A. Maki-Tanila. 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation *Animal Genetics*, 26: 315-320.
- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 478-484.
- Morera, L., D.F. de Andrés, M. Barbancho, J.J. Garrido y C.J. Barba. 1999a. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano español. *Arch. Zootec.*, 48: 72-77.
- Morera, L., C.J. Barba, J.J. Garrido, M. Barbancho and D.F. de Andrés. 1999b. Genetic variation detected by five microsatellites in Spanish dog breeds. *Journal of Heredity*, 90: 654-656.
- Olivier, M., M.A. Meehl and G. Lust. 1999. RAPD sequences as markers for canine genetic studies. *Journal of Heredity*, 90: 78-82.
- Rothuizen, J. and M. van Wolferen. 1993. Randomly amplified DNA polymorphism in dogs are reproducible and display Mendelian inheritance. *Animal Genetics*, 25: 13-18.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, 18: 7213-7218.

Recibido: 5-2-01. aceptado: 5-2-01.

Archivos de zootecnia vol. 50, núm. 191, p. 382.