

# Evaluación del polimorfismo de un panel de marcadores microsatélites para uso en identificación y parentesco en alpacas (*Lama pacos*)

Juan Agapito<sup>1,\*</sup>, Jorge Rodríguez<sup>2</sup>, José Espinoza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear

<sup>2</sup> Universidad Peruano Cayetano Heredia

## Resumen

Un panel de diez microsatélites designados para alpacas y llamas (Lang *et al.*, 1996; Penedo *et al.*, 1998 y Penedo *et al.*, 1999) fueron evaluados en 200 alpacas no emparentadas provenientes de Huancavelica (105) y Junín (95) mediante amplificación en una reacción de PCR múltiple. Todos los microsatélites fueron altamente polimórficos, con un número de alelos promedio por locus de 14,5, heterocigosidades observadas y comprendidas entre 0,696 y 0,887, probabilidades de exclusión que variaron entre 0,436 y 0,866 y una probabilidad de exclusión acumulada de 0,99999; sugiriendo la efectividad de su uso en identificación y validación de parentesco en alpacas.

**Palabras clave:** Alpaca, Microsatélites, Parentesco.

## Abstract

A panel of ten microsatellites designed for alpacas and llama (Lang *et al.*, 1996; Penedo *et al.* 1998 and Penedo *et al.* 1999) they were evaluated in 200 not related alpacas from Huancavelica (105) and Junin (95) by means of amplification in a reaction of PCR multiple. All the microsatellites were highly polymorphic, with a number of alleles average by locus of 14,5, heterozygosity observed and understood between 0,696 and 0,887, probability of exclusion that varied between 0,436 and 0,866 and a probability of exclusion accumulated of 0,99999; suggesting the effectiveness of its use in identification and validation of relationship in alpacas.

**Keywords:** Alpaca, Microsatellites, Parentage.

## 1. Introducción

La alpaca (*Lama pacos*) constituye un recurso de importancia económica para un vasto sector de la población altoandina peruana. El Perú cuenta con la mayor población de alpacas a nivel mundial, llegando a cifras sobre los 3 millones de ejemplares (CONACS, 2003). El estado peruano ha creado un programa multidisciplinario para la mejora de la productividad en la alpaca, constituyéndose la creación de un libro de registro nacional como el punto inicial y crítico para dicho propósito. Sin embargo, la validez de los libros de registro dependen de la confiabilidad en identificar a los animales inscritos.

Durante muchos años, métodos convencionales como análisis de grupos sanguíneos y polimorfismos de proteínas han sido las únicas herramientas disponibles para identificación y determinación de parentesco siendo el tiempo requerido, la complejidad y el costo sus principales desventajas.

En la década pasada, muchas técnicas basadas en el análisis de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido desarrolladas para identificación y determinación de parentesco en animales domésticos, siendo el análisis de ADN microsatélites el más usado. Los microsatélites son repeticiones de hasta 6 pares de bases, de alta frecuencia en el genoma eucariota, altamente polimórficos, codominantes y de herencia mendeliana (Hancock, 1991).

La determinación de parentesco mediante análisis de microsatélites es utilizada para garantizar y validar los registros genealógicos y productivos en diferentes especies animales. Métodos de identificación y parentesco mediante microsatélites son utilizados en caninos (Morera *et al.*, 1999; Pádar *et al.*, 2001), bóvidos silvestres y domésticos (Kankan & Fado, 1999; Mommens *et al.*, 1998), caprinos (Ganai & Yadav, 2005), porcinos (Aguilera-Reyes *et*

\*Correspondencia autor: jagapito@ipen.gob.pe

*al.*, 2006), equinos (Binns *et al.*, 2000), en primates no humanos (Constable *et al.*, 2001; Vigilant *et al.*, 2001) y camellos (Sasse *et al.*, 2000; Sam *et al.*, 2001). En el Perú los registros en alpacas se basan en observación y empadre controlado, lo cual no asegura un 100% de confiabilidad en la identidad y parentesco de los animales que ingresan a los libros de registro. Se suma a esto, la ausencia de un panel de marcadores microsatélites evaluados y validados para su uso como referencia para identificación y validación de parentesco. En el presente estudio se evalúa un panel de 10 microsatélites altamente polimórficos que pueden ser usados en identificación y validación de parentesco en alpacas.

## 2. Material y Método

ADN genómico de 200 alpacas (*Lama pacos*) adultas no emparentadas, procedentes de los departamentos de Huancavelica (105) y Junín (95), fueron extraídas a partir de 300  $\mu$ l de sangre con anticoagulante mediante SDS/ProteinasasK/NaCl y Precipitación con alcohol. (Miller *et al.* 1988).

Diez loci microsatélites YWLL08, YWLL29, YWLL36, YWLL40, YWLL44 (Lang *et al.*, 1996), LCA05, LCA08, LCA19, LCA37 (Penedo *et al.*, 1998) y LCA66 (Penedo *et al.*, 1999) fueron amplificados en una reacción de PCR múltiple utilizando Qiagen Multiplex PCR Kit® (QIAGEN) en un volumen final de 10  $\mu$ l conteniendo 20 ng de ADN genómico, 1X PCR buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTPs, 0.5 U HotStart Taq® DNA polimerasa y 5 pmoles de cada cebador (cebador de avance marcado con fluorocromo en su extremo 5'). La amplificación se realizó en un termociclador modelo 9700 GeneAmp® (Applied Biosystem) siguiendo el protocolo termal: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos, 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos, 72°C por 60 segundos y un ciclo de 60°C por 30 minutos.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en capilar mediante un Analizador Genético ABI 3130 DNA sequencers® (Applied Biosystems). El tamaño de los productos amplificados se determinó con el programa Genemapper® v.4.0 (Applied Biosystems).

Las frecuencias alélicas, número de alelos por locus, número promedio de alelos, heterocigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica (PIC),

y la probabilidad de exclusión (Jamieson & Taylor, 1997) para cada locus fueron calculados con el programa Cervus Parentage Analysis v3.0 (Marshall *et al.*, 1998).

## 3. Resultados y Discusión

La longitud de los alelos en pares de bases, frecuencias alélicas, número de alelo promedio, heterocigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica (PIC), probabilidad de exclusión están detallados en la tabla 1 y 2. Todos los loci fueron altamente polimórficos, con un número de alelos promedio por locus de 14.5 (8-25) y heterocigosidades observadas comprendidas entre 0.696 (YWLL40) y 0.887 (YWLL36). La probabilidad de exclusión varió entre 0.436 (YWLL40) y 0.866 (YWLL08) con una probabilidad de exclusión acumulada de 0.99999.

Los resultados obtenidos con el panel de 10 microsatélites (LCA19, LCA37, LCA5, LCA66, YWLL29, YWLL36, YWLL40, LCA08, YWLL08 y YWLL44) reflejan una mayor variabilidad en comparación a los reportados por Penedo *et al.* (1998), Penedo *et al.* (1999), Rodríguez *et al.* (2004) y Rodríguez *et al.* (2006), esta diferencia es debido probablemente al número y origen (Huancavelica y Junín) de individuos evaluados.

## 4. Conclusiones

La elevada probabilidad de exclusión acumulada (0.99999) y su amplificación en una sola reacción de PCR múltiple demuestran la factibilidad de ser utilizados en una prueba de identificación y determinación de parentesco en alpacas.

## 5. Agradecimientos

A la Comunidad de Santa Bárbara y Distrito de Laccho (Huancavelica) y SAIS Túpac Amaru (Junín) por el apoyo logístico y colección de muestras. A la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) por el uso de las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular (LID): Al Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS), Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas y Llamas (SPAR), Instituto Peruano de Alpaca y Camélidos (IPAC). Al Dr. Fernando García de la Universidad Estadual Paulista de Araçatuba, Sao Paulo, por sus sugerencias. El estudio fue financiado por el Proyecto de

Cooperación Técnica PER 05/027 del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

## 6. Bibliografía

- [1] Aguilera-Reyes U, *et al.* Multiple mating and paternity determinations in domestic swine (*Sus scrofa*). *Anim. Res.* 2006; 55:409-417.
- [2] Binns M, *et al.* Molecular genetics of the horse. In: *The genetics of the horse*. Eds. A. Bowling; & A. Ruvinsky. CABI Publishing. London. 2000; 109-121.
- [3] CONACS. Población de Alpacas por departamentos. Programa de Camélidos domésticos. Lima: Perú; 2003.
- [4] Constable J, *et al.* Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. *Molecular Ecology*. 2001; 10:1279-1300.
- [5] Ganai N, *et al.* Parentage Determination in Three Breeds of Indian Goat Using Heterologous Microsatellite Markers. In: *Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries*. Eds. H. Makkar & G. Viljoen. Netherlands: Springer; 2005. p. 613-620.
- [6] Hancock J. *et al.* Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites. Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D, Schlötterer C. Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 1-9.
- [7] Jamieson A, *et al.* Comparisons of three probability formulae for parentage Exclusion. *Animal Genetics*. 1997; 28:397-400.
- [8] Kankan D, *et al.* Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. *Animal Genetics*. 1999; 30:355-361.
- [9] Lang K, *et al.* Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Animal Genetics*. 1996; 27:285-294.
- [10] Marshall T, *et al.* Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998; 7:639-655.
- [11] Miller A, *et al.* A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:215.
- [12] Mommens G, *et al.* Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. *Animal Genetics*. 1998; 29: 12-18.
- [13] Morera L, *et al.* Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español. *Archivos de Zootecnia*. 1999; 48: 63-70.
- [14] Pádár Z, *et al.* Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire: case report. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2001; 49:269-273.
- [15] Penedo C, *et al.* Microsatellite markers for south american camelids. *Animal Genetics*. 1998; 29:398-413.
- [16] Penedo C, *et al.* Eight microsatellite markers for South American Camelids. *Animal Genetics*. 1999; 30:166-167.
- [17] Rodriguez J, *et al.* Paternity testing using microsatellite DNA in alpacas (*Vicugna pacos*). In: *South American Camelids Research - Volume I. Proceedings of the 4th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar*. Eds. Gerken M, Renieri C. Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 2006. p. 273-278.
- [18] Rodriguez J, *et al.* Determinación de Parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN Microsatélite. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2004; 15(2):113-119.
- [19] Sam C, *et al.* Improved Breeding in Camelids through Molecular Techniques: Development of STR Multiplexes for Identification and Parentage Verification. In: *Progress in South American Camelids Research. Proceedings of the 3rd European Symposium and SUPREME European Seminar*. EAAP publication N°105. Ed. Gerken M & Reniere C. Göttingen. 2001. p. 296-302.
- [20] Sasse J, *et al.* Development of a microsatellite parentage and identity verification test for dromedary racing camels. *Abstracts of the 27a Conference of the International Society of Animal genetics (ISAG)*. Mineapolis, EEUU. 2000.
- [21] Vigilant L, *et al.* Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. *PNAS*. 2001. 98: 12890-12895.

**Tabla 1:** Reacciones de PCR Múltiple, tipo de marcación del cebador, rango y número de alelos.

<i>Locus</i>	<i>Múltiplex</i>	<i>Tipo de marcación</i>	<i>Rango Alelos</i>	<i>Número Alelos (K)</i>
LCA19	1	6-FAM	81-117	14
LCA37	1	6-FAM	123-167	18
YWLL40	1	6-FAM	178-188	6
LCA08	1	HEX	230-256	10
YWLL36	1	NED	136-178	17
LCA5	1	NED	182-206	12
LCA66	1	NED	217-259	16
YWLL08	2	HEX	126-188	28
YWLL29	2	6-FAM	213-227	8
YWLL44	2	NED	81-127	16
Promedio				14,5

**Tabla 2:** Número de alelos (K), Heterocigocidad observada (HO) y esperada (HE), Contenido de Información polimórfica (PIC), Probabilidad de exclusión individual – sin pariente conocido (Excl. 1) – pariente conocido (Excl. 2) y a acumulada (PEa) para los diez microsatélites analizados.

<i>Locus</i>	<i>k</i>	<i>H(O)</i>	<i>H(E)</i>	<i>PIC</i>	<i>Excl(1)</i>	<i>Excl(2)</i>
LCA19	15	0.7250	0.7470	0.7120	0.35700	0.53800
LCA37	20	0.8020	0.8660	0.8530	0.58800	0.74100
YWLL40	8	0.6960	0.6910	0.6360	0.26800	0.43600
YWLL29	8	0.7040	0.7120	0.6810	0.32200	0.50800
YWLL36	14	0.8870	0.8860	0.8720	0.61800	0.76500
LCA5	13	0.7840	0.7880	0.7550	0.41000	0.58700
LCA66	16	0.8280	0.8570	0.8420	0.56300	0.72300
YWLL44	15	0.7730	0.8730	0.8560	0.59100	0.74300
YWLL08	25	0.8060	0.9360	0.9290	0.76100	0.86400
LCA08	11	0.8240	0.8350	0.8140	0.50500	0.67500
<b>Promedio</b>	<b>14.5</b>	<b>0.7829</b>	<b>0.8191</b>	<b>0.795</b>		
<b>PEa (10 STR)</b>					<b>0.99937</b>	<b>0.99999</b>