

Identificación de polimorfismos de nucleótido simple en alpaca (*Vicugna pacos*) usando un panel de células híbridas irradiadas alpaca/hámster

Identification of single nucleotide polymorphism in alpaca (*Vicugna pacos*) using an alpaca/hamster radiation hybrid cells panel

Mamani, C.*¹, Gutierrez, G.¹ y Ponce de León, F. A.²

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar los polimorfismos de nucleótido simple (PNS) usando un panel celular híbrido irradiado alpaca/hámster y una micromatriz de alta densidad del bovino. El análisis bioinformático se realizó en la Universidad Nacional Agraria La Molina. La metodología consistió en la genotipificación del panel celular y cuatro muestras controles utilizando una micromatriz de alta densidad para bovinos (BovineHD BeadChip-Illumina). El panel celular estuvo compuesto por 92 clones celulares híbridos irradiados alpaca/hámster con una retención igual o mayor al 40 % del genoma de alpaca. Los cuatro controles contuvieron ADN genómico de alpaca huacaya macho, alpaca huacaya hembra, la línea celular de hámster A23 y una mezcla de alpaca macho y hámster en una proporción de 1:10. Los análisis de datos fueron ejecutados con los programas GenomeStudio, Excel y R. Los resultados de genotipar las 4 muestras controles registraron 294 165 PNS con señal positiva en la micromatriz y la cantidad final de PNS de alpaca después de filtrar y eliminar los PNS positivos comunes con hámster se identificaron un total de 50 686 PNS en el genoma de alpaca. En conclusión, se identificaron 6,5 % PNS del total de los PNS analizados en la micromatriz de alta densidad de bovinos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to identify single nucleotide polymorphism (SNPs) using an alpaca/hamster radiation hybrid cell panel and a bovine high-density SNP microarray. The bioinformatics analysis was done at the Universidad Nacional Agraria La Molina. The methodology consisted in genotyping the hybrid cell panel and four control samples using a high-density SNP microarray for bovine (BovineHD BeadChip-Illumina). The hybrid cell panel was a composed of 92 irradiated alpaca/hamster hybrid cell clones with a retention equal or greater than 40% of the alpaca genome. The four controls contain genomic DNA from a male alpaca huacaya, a female alpaca huacaya, a hamster cell line A23 and a mixture of male alpaca and hamster DNA at a ratio of 1:10, respectively. The genotyping results of the four control samples showed 294,165 PNSs with positive signal in the microarray and the final number of specific alpaca SNPs, after filtering and eliminating positive SNPs in common with hamster, was 50,686 SNPs in the alpaca genome. In conclusion, 6.5% SNPs of the total analyzed in the high-density microarray.

PALABRAS CLAVE

alpaca · genómica · PNS · micromatriz

KEYWORDS

alpaca · genomic · SNPs · microarray

INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los años, se han venido implementando planes de mejoramiento genético de alpacas en distintos departamentos del Perú como son: Puno, Cusco, Huancavelica, Arequipa, etc., con la finalidad de mejorar la producción de fibra y poder aumentar los

ingresos de los pequeños productores (Renieri *et al.*, 2009). Sin embargo, se observan algunas limitaciones como los manejos inadecuados de registros productivos y la baja capacidad organizacional de los productores. Por lo tanto, para mejorar y sostener la producción de fibra de forma eficiente en la crianza de alpacas, es

¹Universidad Nacional Agraria La Molina. Email: camilo.vm08@gmail.com.

²University of Minnesota.

importante el conocimiento de marcadores moleculares (como los polimorfismos de nucleótido simple) y genes asociados con la expresión de caracteres de importancia económica en la alpaca, con fines de tener mayor precisión en la selección de alpacas (Paucar, 2011).

La implementación de tecnologías avanzadas para análisis genómicos en animales de granja es necesaria. Una de estas tecnologías más usadas es la micromatriz de marcadores moleculares de alta densidad, la que nos permite hacer genotipados de miles de marcadores moleculares en un solo análisis (Wiggans *et al.*, 2017).

Actualmente ya se cuenta con un mapa preliminar citogenético integrado del genoma de alpaca, el cual está conformado por 230 marcadores moleculares ordenados a lo largo de los 37 pares de cromosomas de la alpaca. Adicionalmente, 86 genes de alpacas fueron mapeados en el dromedario, y se observaron secuencias sinténicas entre ambos. Esto afirma que ambas especies son muy similares en su genoma (Ávila *et al.*, 2015). Igualmente, otro estudio logró caracterizar e identificar PNS relacionados con genes asociados a queratina, sin embargo, no llegó a encontrar asociación entre el gen KRTAP11-1 con el diámetro de fibra (Foppiano, 2016). Por otro lado, la identificación de PNS comunes que se puedan encontrar entre el bovino y la alpaca podría ser beneficioso para construir un mapa físico del genoma de la alpaca.

Por este motivo, el objetivo del presente estudio fue identificar polimorfismos de nucleótido simple usando un panel celular híbrido irradiado alpaca/hámster y una micromatriz de alta densidad del bovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El presente estudio se desarrolló en una primera fase con el análisis de genotipado del panel de células híbridas irradiadas y las 4 muestras controles en los laboratorios Neogen-Geneseeck (USA), y la segunda fase bioinformática se inició cuando se obtuvieron los resultados que fueron analizados en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Material experimental

Se utilizó como material experimental un panel

de 92 clones celulares híbridos irradiados alpaca/hámster (Johnson y Perelman, 2007). Para producir este panel se usaron células donadoras de una alpaca huacaya macho (Limmerick), provenientes de la Universidad de Oregon y células receptoras de hámster de la línea celular A23. El nivel de radiación usada para la creación de los clones fue 5000 rad., y se obtuvieron 92 clones, con una retención igual o mayor al 40 por ciento del genoma de alpaca, en el que se considera que cada clon celular contiene una proporción al azar del genoma de la alpaca. Los controles que se usaron fueron cuatro muestras adicionales al panel que cada una contuvo ADN genómico de: alpaca huacaya macho, alpaca huacaya hembra (Carlotta), la línea celular de hámster A23 y una mezcla de alpaca macho y hámster en una proporción de 1:10, respectivamente.

Genotipado de polimorfismos de nucleótido simple

Un total de 92 clones de células híbridas irradiadas y las 4 muestras controles descritas en la sección de material experimental, fueron genotipadas con la micromatriz de alta densidad para bovinos (BovineHD BeadChip-Illumina). Esta micromatriz contiene 777 962 polimorfismos de nucleótido simple (PNSs).

Selección de los PNS

Los resultados obtenidos del genotipado de las cuatro muestras controles fueron analizados mediante los programas GenomeStudio, Excel y R. El parámetro utilizado para afirmar que el PNS fue seleccionado es su frecuencia de señal positiva (Call Frequency) equivalente a 1, el cual nos indica que en todas las muestras evaluadas se reconoció el conjunto de nucleótidos de la micromatriz. Solo se aceptaron PNS que fueron identificados en las dos muestras de alpaca, eliminando del análisis el resto de PNS que no cumplieron con este criterio.

Las dos muestras de ADN de alpaca, la muestra de hámster y la muestra mezcla de alpaca macho/hámster 1:10, se evaluaron de forma independiente y se generaron bases de datos en formato .txt y .xlsx. La información obtenida de estas muestras sirvió para, por comparación, retener PNS con frecuencia 1 en las muestras de ADN de alpaca y que también que dieron señal positiva en algunos de los 92 clones de células

híbridas. De la misma manera, los resultados del genotipado de la muestra de ADN de hámster sirvieron para, por comparación, eliminar los

PNS positivos que fuesen comunes entre alpaca y hámster.

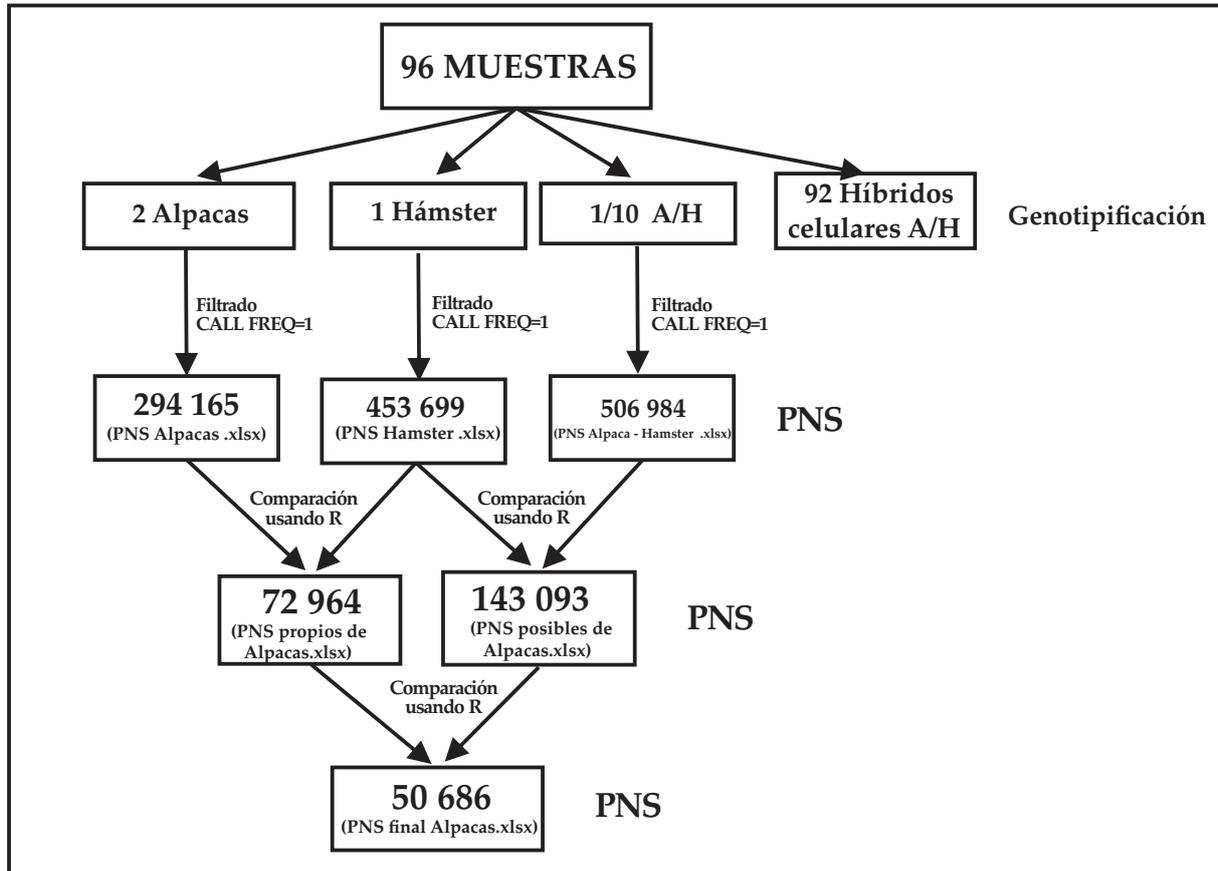


Figura 1. Resumen del filtrado de PNS obtenidos del genotipado de las cuatro muestras controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El esquema de análisis e identificación de PNS que emitieron señal positiva y estuvieron presentes solo en el genoma de la alpaca se muestra en la figura 1. Como se aprecia de los 777 962 PNS analizados mediante la micromatriz de alta densidad, se pudo seleccionar 294 165 PNS en las 2 muestras de alpaca. En la muestra de hámster se identificaron 453 699 PNS, y luego de realizar filtrados y eliminar los PNS comunes, se encontró un total de 72 964 PNS en ambas alpacas. La muestra que contenía ADN de alpaca y hámster en la proporción 1:10 se comparó con el resto de muestras controles para encontrar la cantidad de PNS final, presentes en alpaca y ausentes en el hámster, resultando en 50 686 PNS, siendo un 6,5% de los PNS analizados.

Estos resultados demuestran la posibilidad de usar la micromatriz de bovino en la identificación de PNS, presentes en el genoma de la alpaca. Ber-

tolini (2016) logró genotipar un 10,5 % de PNS en 8 alpacas, y comparado con el presente estudio difiere por la menor cantidad de animales y la exclusión de PNS comunes con hámster. Los estudios comparativos entre artiodáctilos (bovino, camello, alpaca) nos permiten identificar secuencias homólogas entre especies y, así, establecer mapas físicos que ubiquen marcadores moleculares dentro de los cromosomas (Balmus *et al.*, 2007). La identificación de PNS específicos de alpaca y el uso del panel híbrido alpaca/hámster nos permitirá ubicar grupos de marcadores ligados basados en la presencia o ausencia del marcador en los 92 clones celulares híbridos mediante el uso del programa Carthagene (De Givry *et al.*, 2005) y comparaciones de secuencias de los marcadores identificados con secuencias del genoma de la alpaca que se encuentra almacenadas en el NCBI (genoma ensamblado vicPac2).

CONCLUSIÓN

Se han identificado 50 686 PNS, presentes en la alpaca y ausentes en el hámster, que representan un 6,5 % del total de los PNS analizados en la micromatriz de alta densidad de bovinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, F., Baily, M., Perelman, P., Das, P., Pontius, J., Chowdhary, R., Owens, E., Johnson, W., Merriwether, D., Raudsepp, T. (2015). A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenetic Genome Research*, 144, 193-204.
- Balmus, G., Trifonov, V., Biltueva, L., O'Brien, P., Alkalaeva, E., Fu, B., Skidmore, J., Allen, T., Graphodatsky, A., Yang, F., Ferguson-Smith, M. (2007). Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla acenstral karyotype. *Chromosome Research*, 15, 499-514.
- Bertolini, F., Elbeltagy, A., Ponce de Leon, F., Gutierrez, G., Rothchild, M. (2016). Applicability of using bovine, ovine and caprine SNP chips for alpaca and dromedary genomic studies. *35th International Society for Animal Genetics Conference*, Utah.
- De Givry, S., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D., Schiex, T. (2005). Carthagene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*, 21(8), 1703-1704.
- Foppiano, F. (2016). *Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (Vicugna pacos) siguiendo una aproximación de gen candidato* (tesis de maestría). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
- Johnson, W. & Perelman, P. (2007). Development of a radiation-hybrid map. *Alpacas Magazine*, 234-239.
- Paucar, R. (2011). *Utilidad de marcadores SNP en la mejora genética de poblaciones alto-andinas de alpacas* (tesis de maestría). Universidad Pública de Navarra, España.
- Renieri, C., Frank, E. N., Rosati, A. Y., & Antonini, M. (2009). Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources/Recursos genéticos animales/Recursos genéticos animales*, 45, 45-54.
- Wiggans, G., Cole, J., Hubbard, S., Sontegard, T. (2017). Genomic selection in dairy cattle: The USDA experience. *Annu Rev Anim Biosci*, 5, 1-19.