

COMUNICACIÓN

ANÁLISIS DEL *LOCUS* MICROSATÉLITE BOVRIBO (BBR) EN LA RAZA BOVINA MARONESA

ANALYSIS BOVRIBO (BBR) MICROSATELLITE *LOCUS* IN MARONESA CATTLE BREED

Viana, J.L.¹, A. Fernández¹, L. Sánchez¹, M.S. Rodríguez-Calvo² y A. Iglesias¹

¹Departamento de Anatomía y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. 27002 Lugo. Galicia. España.

²Instituto de Medicina Legal. C/ San Francisco s.n. 15705 Santiago de Compostela. Galicia. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Microsatélite. Polimorfismo. BOVRIBO. Bovino.

ADDITIONAL KEYWORDS

Microsatellite. Polymorphism. BOVRIBO. Cattle.

RESUMEN

La sistemática que se está llevando a cabo en las producciones animales está determinando la minorización e incluso la desaparición de muchas razas animales autóctonas, perdiéndose consecuentemente sus genes sin haber conocido el potencial productivo y sin haberse beneficiado de la capacidad que tienen estas razas para aprovechar aquellos recursos naturales difícilmente utilizables por otras poblaciones ganaderas, normalmente más adaptadas a regímenes más intensivos. Las razas vacunas autóctonas del Noroeste de la Península Ibérica (Galicia y Región Norte de Portugal) están incluidas en programas de conservación dado que poseen censos limitados. Entre los objetivos de estos programas se incluye la identificación genética de estas poblaciones ganaderas con el fin de establecer de una forma más precisa las diferencias entre los distintos prototipos raciales. En el presente trabajo analizamos las frecuencias alélicas y genotípicas del *locus* microsatélite BOVRIBO (BBR), empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa y analizando los productos de la PCR mediante un sistema electroforético usando un secuenciador automático con tecnología fluorescente, en un total de

56 animales de raza bovina Maronesa (pertenece a la región Norte de Portugal). El análisis de los valores observados y esperados para dicha población, basado en el Test de χ^2 y en el Test Exacto, ha dado un valor de p significativo ($\chi^2 = 60,2841$, $p = 0,0001$ y Test Exacto: $p = 0,0566$), indicando que dicha población se desvía del equilibrio Hardy-Weinberg para este *locus*. Hemos observado un total de 10 alelos (131-147 bp), con una heterozigosidad media del 75 p.100.

SUMMARY

The current dynamics of animal production has led to the reduction and even the extinction of many native breeds, which means the consequent loss of their genes before their productivity has been known and without taking advantage of their capacity to use those natural resources that other cattle breeds, exploited in intensive systems, cannot use. Native cattle breeds with limited census from the North-West of the Iberian Peninsula (Galicia and the North of Portugal) are included in conservation programs. Genetic identification of these cattle populations

Arch. Zootec. 47: 163-168. 1998.

was included among the objectives of these programs to establish breed prototype differences. In the present study, we analyzed allele and genotype frequencies of the BOVRIBO (BBR) microsatellite *locus* in a total of 56 Maronesa cattle breed animals (from the North of Portugal). The analysis of the expected and observed values for that population based on χ^2 Test and Exact Test, have resulted in a *p* significant value ($\chi^2 = 60,2841$, $p = 0,0001$ and Exact Test: $p = 0,0566$), which means that this population is not in H-W equilibrium for this *locus*. A total of 10 alleles were found (131-149 bp), with a heterozygosity mean value of 75 p.100.

INTRODUCCIÓN

La dinámica actual de las producciones animales está determinando la minorización e incluso la desaparición de muchas razas animales autóctonas, perdiéndose consecuentemente los genes sin haber conocido su potencial productivo y sin haberse beneficiado de su capacidad de aprovechamiento de aquellos recursos naturales difícilmente utilizables por otras poblaciones ganaderas, que normalmente están más adaptadas a regímenes más intensivos.

La razas bovinas autóctonas de Galicia y la Región Norte de Portugal se encuentran en la actualidad protegidas por programas operativos que pretenden garantizar su conservación. La proximidad que existe en la ubicación geográfica en el Noroeste de la Península Ibérica, así como la similitud de algunas características morfológicas entre las razas autóctonas gallegas y las de Entredouro e Minho y Tras-os-Montes (portuguesas), hacen necesaria la identificación genética que per-

mita establecer de una forma más precisa las distintas agrupaciones raciales.

El gran avance que están experimentando las técnicas de biología molecular para el análisis de los marcadores genéticos, unido al potencial que presentan éstos, especialmente los nuevos marcadores de ADN (microsatélites), en el campo de la diferenciación racial e individual, hacen que su empleo esté cada vez más difundido, complementando así los estudios basados en datos morfológicos y los aportados por el análisis de otros marcadores (grupos sanguíneos, polimorfismos bioquímicos, etc.).

El profundizar en el conocimiento de las distintas clases raciales, gracias al empleo de estos marcadores, tiene un gran interés, ya que representa un elemento de gran utilidad para el establecimiento de cualquier programa de conservación de recursos genéticos que se encuentran en peligro de extinción o con censos limitados, como es el caso de la raza bovina Maronesa, objeto de nuestro estudio.

En el presente trabajo se analizan mediante técnicas de biología molecular (PCR y electroforesis automatizada con un secuenciador de ADN) las frecuencias alélicas y genotípicas del *locus* microsatélite BOVRIBO (BBR) en 56 animales de esta raza bovina autóctona de la Región Norte de Portugal.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL ANIMAL

Se tomaron muestras de sangre entera a un total de 56 animales de la raza

EL LOCUS MICROSATÉLITE BOVRIBO (BBR) EN LA RAZA MARONESA

bovina Maronesa, ubicada en el Noroeste de la Península Ibérica, en el área geográfica de Alvão-Marão y Pradela, que pertenece a la zona Norte de Portugal.

METODOLOGÍA

A cada animal se le recogieron 5 ml de sangre, extraída de la vena caudal empleando agujas estériles y tubos de vacío con anticoagulante EDTA K₃. A partir de la muestra recogida se hicieron alícuotas de 700 µl de las que se obtuvo el ADN mediante el método del fenol-cloroformo empleado por Madisen *et al.* (1987), con pequeñas modificaciones, ajustando la técnica a nuestras condiciones laborales.

Para el análisis del microsatélite BBR, STR dinucleotídico cuya unidad de repetición es (CA)_n, se realizó la PCR utilizando el siguiente par de primers:

primer 1:

5'CCTCCACACAGGCTTCTCTGACTT3'

y *primer 2:*

5'CCTAACTTGCTGAGTTATTGCC3'

(Moore *et al.*, 1992; Ruíz Castillo, 1995), que flanquean la región de amplificación que contiene dicho *locus*. Los primers se purificaron mediante el método de HPLC y el *primer 1* se marcó con fluoresceína en el extremo 5' para poder realizar el análisis electroforético en el secuenciador automático.

Para cada reacción de PCR se emplearon 25 µl totales consistentes en: 200 ng de ADN genómico, 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 p.100 Triton X-100, 200 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada primer y 2,5 unidades de DynaZyme™ II DNA Polymerase. Las condiciones

Tabla I. Frecuencias alélicas y genotípicas del locus microsatélite BOVRIBO en la raza bovina Maronesa. (Allele and genotype frequencies of the BOVRIBO microsatellite locus in the Maronesa cattle breed).

Genotipo	Observados (p.100)	Esperados (p.100)
131-133	1 (1,8)	0,06 (0,1)
133-137	3 (5,4)	2,50 (4,5)
133-147	3 (5,4)	1,00 (1,8)
135-137	1 (1,8)	0,71 (1,3)
135-143	1 (1,8)	0,21 (0,4)
137-137	7 (12,5)	7,14 (12,8)
137-141	1 (1,8)	0,36 (0,6)
137-143	3 (5,4)	4,29 (7,7)
137-145	3 (5,4)	3,21 (5,7)
137-147	6 (10,7)	5,71 (10,2)
137-149	9 (16,1)	6,43 (11,5)
139-139	2 (3,6)	0,16 (0,3)
139-145	1 (1,8)	0,48 (0,9)
139-149	1 (1,8)	0,96 (1,7)
143-143	1 (1,8)	0,64 (1,1)
143-145	2 (3,6)	0,96 (1,7)
143-147	1 (1,8)	1,71 (3,1)
143-149	3 (5,4)	1,93 (3,4)
145-145	1 (1,8)	0,36 (0,6)
145-149	1 (1,8)	1,45 (2,6)
147-147	2 (3,6)	1,14 (2,0)
147-149	2 (3,6)	2,57 (4,6)
149-149	1 (1,8)	1,45 (2,6)
otros	0 (0,0)	10,54 (18,8)

Alelos	Raza Maronesa (n=56)
131	0,0089
133	0,0625
135	0,0179
137	0,3571
139	0,0536
141	0,0089
143	0,1071
145	0,0804
147	0,1429
149	0,1607

$\chi^2 = 60,2841$; 14 g.l.; $P = 0,0001$; Test exacto: $P = 0,0566$; Heterozigosidad media: obs = 0,7500, esp = 0,8082

de amplificación empleadas fueron las siguientes: después de 4 minutos a 95°C, se realizaron 30 ciclos, en un termociclador programable PROGENE (TECHNE), y cada ciclo de amplificación consistió en 1'/95°C, 35"/63°C y 45"/72°C.

Los productos de PCR se analizaron por medio de un sistema de electroforesis automatizada en geles de poliacrilamida al 6 p.100 w/v en TBE (100 mM tris-borato, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,3), con 7 M de urea. El producto de PCR (0,5 µl) se mezcló con 4 µl de loading buffer (5 mg/ml Azul Dextrano/formamida) y con 1 µl de cada uno de los 2 marcadores de tamaño o longitud empleados en la electroforesis (114 y 402 bp) y se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos. La electroforesis se realizó en un secuenciador automá-

tico (ALF, Pharmacia Biotech) a 1600 V, 45 W y 38 mA durante 300 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del *locus* microsatélite BOVRIBO obtenidas en el total de animales de la población ganadera objeto de nuestro estudio.

El análisis de los valores observados y esperados para dicha población, basado en el Test de χ^2 y en el Test Exacto (Hernández y Weir, 1989), ha dado un valor de *p* significativo: ($\chi^2 = 60,2841$, $p = 0,0001$) y Test Exacto: $p = 0,0566$, indicando que dicha población se desvía del equilibrio Hardy-Weinberg para este *locus*. Existen

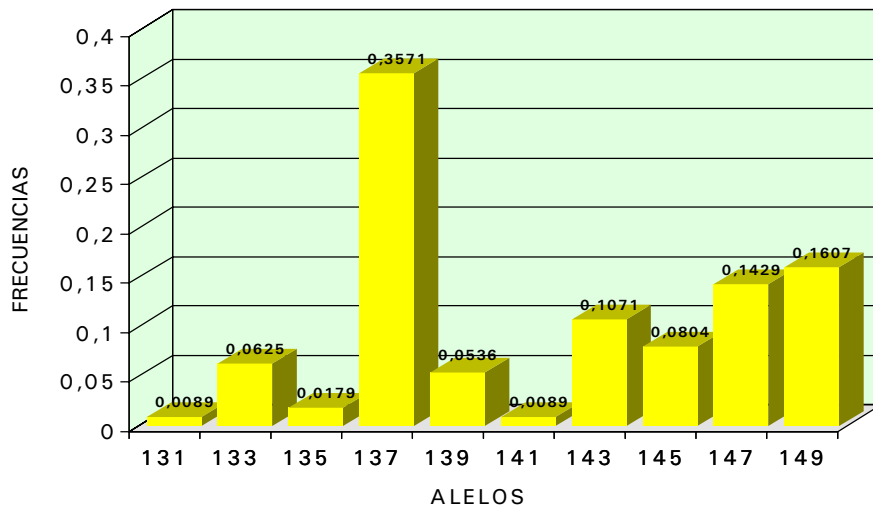


Figura 1. Frecuencias alélicas del locus BOVRIBO (BBR) en la raza Maronesa. (Allele frequencies of the BOVRIBO (BBR) locus in Maronesa breed).

EL LOCUS MICROSATÉLITE BOVRIBO (BBR) EN LA RAZA MARONESA

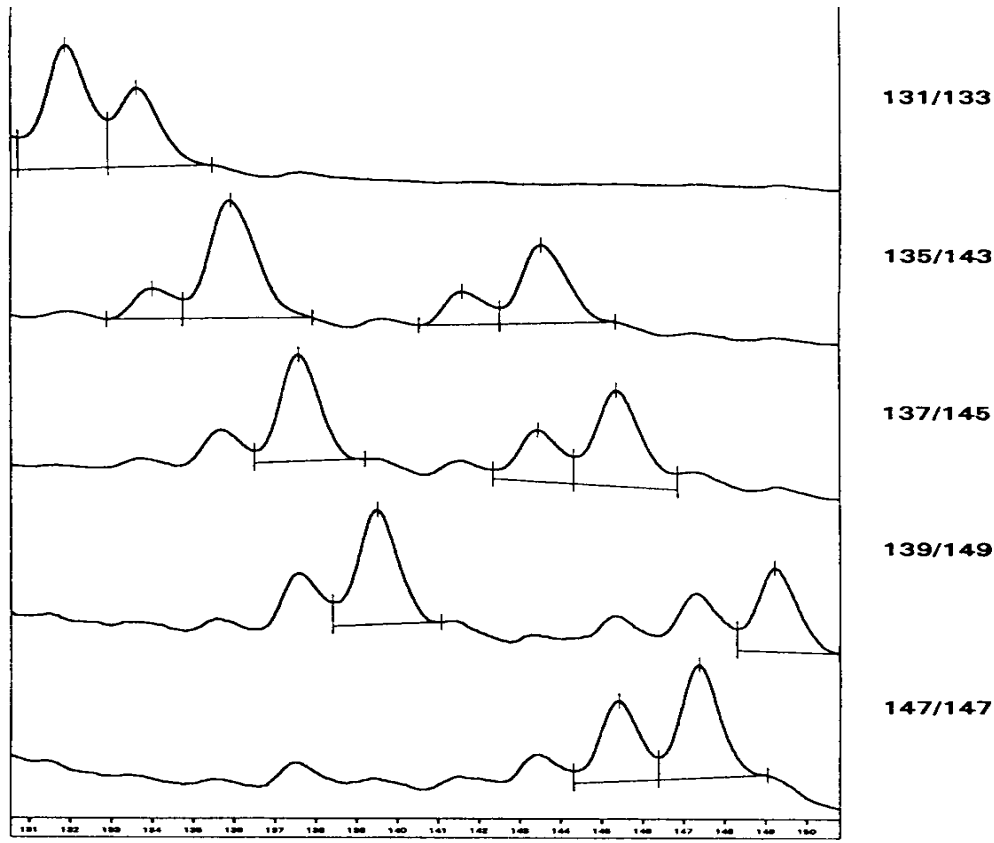


Figura 2. Alelos del locus microsatélite BOVRIBO en la raza bovina Maronesa. Programa Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2. (Alleles of the BOVRIBO microsatellite locus in the Maronesa cattle breed. Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2 Program).

varias causas que han podido originar dicha desviación como son: la consanguinidad, el tamaño efectivo de la población investigada (unido al número elevado de alelos observados en el locus BOVRIBO) o debido a una fuerte selección de los individuos. De hecho, en la práctica es difícil que se cumplan las condiciones impuestas por la ley de Hardy-Weinberg.

En la **tabla I**, se muestra también el

valor de la heterozigosidad media observada para este locus en la raza Maronesa, obteniéndose un valor del 75 p.100, que resultó ser similar a los obtenidos para este locus por Ruíz Castillo (1995) en otras poblaciones ganaderas autóctonas ubicadas dentro del territorio Peninsular: Pirenaica (80,37 p.100), Asturiana (73,28 p.100), Rubia Gallega (72,12 p.100) y Retinta (77,31 p.100).

En la **figura 1**, se muestran las frecuencias génicas y el total de alelos obtenidos del estudio del *locus* microsatélite BOVRIBO en la raza bovina objeto de estudio. Como se aprecia en el gráfico hemos encontrado un total de 10 alelos entre 131 y 149 bp, presentando el alelo 137 la frecuencia más alta (0,3571) y los alelos 131 y 141 la más baja (0,0089); este número de alelos resultó ser superior al obtenido por Moore *et al.*, (1992), que encuentra 9 alelos con un tamaño entre 137 y 157 bp. Por su parte, Ruíz Castillo (1995) en los estudios realizados en 5 razas bovinas de la Península Ibérica encontró 12 alelos en dicho *locus*, si bien este autor no precisa el tamaño, en pares de bases, de los alelos que describe y, por lo tanto, las frecuencias génicas obtenidas en ambos estudios no pueden ser comparadas.

En la **figura 2**, se muestran gráficamente el total de alelos observados en

nuestro estudio, especificando en la parte inferior el tamaño (bp) de cada uno de ellos. Dicha figura representa el análisis de la electroforesis automatizada en el secuenciador automático con tecnología fluorescente por medio del programa informático *Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2*.

De los resultados obtenidos en la realización del presente estudio podemos destacar que los marcadores de ADN altamente polimórficos, como es el caso del sistema microsatélite BOVRIBO, ofrecen propiedades importantes para ser empleados en el campo de la caracterización racial, por su fácil identificación por PCR (favorecido por su pequeño tamaño) y porque los genotipos, derivados de su polimorfismo se identifican con gran exactitud gracias a la aplicación de las modernas técnicas electroforéticas con el empleo de secuenciadores automáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, J.L. and B.S. Weir. 1989. A disequilibrium coefficient approach to Hardy-weinberg testing. *Biometrics*, 45: 53-70.
- Madisen, L., D.I. Hoar, C.D. Holroyd, M. Crisp and M.E. Hodes. 1987. DNA banding: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am. J. Med. Genetics*, 27: 379-390.
- Moore, S.S., W. Barendse, K.T. Berger, S.M. Armitage and D.J.S. Hetzel. 1992. Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases. *Animal Genetics*, 23: 463-467.
- Ruíz Castillo, B.M. 1995. Análisis de la estructura genética de cinco razas bovinas mediante polimorfismo de ADN (Asturiana de la Montaña, Retinta, Pirenaica, Rubia Gallega y Frisona). *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.