COMUNICACIÓN

# ANÁLISIS DEL *LOCUS* MICROSATÉLITE ILSTS002 EN LA RAZA BOVINA BARROSÃ

## ANALYSIS OF ILSTS002 MICROSATELLITE *LOCUS* IN BARROSÃ CATTLE BREED

Viana, J.L.[1], A. Fernández[1], L. Sánchez[1], M.S. Rodríguez-Calvo[2] y A. Iglesias[1]

[1]Departamento de Anatomía y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. 27002 Lugo. Galicia. España.
[2]Instituto de Medicina Legal. C/ San Francisco s.n. 15705 Santiago de Compostela. Galicia. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Polimorfismo. ILSTS002. Bovino.

ADDITIONAL KEYWORDS

Polymorphism. ILSTS002. Cattle.

## RESUMEN

Las razas vacunas autóctonas del Noroeste de la Península Ibérica (Galicia y Región Norte de Portugal) están incluídas 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. Los microsatélites son los marcadores de ADN de última generación, con un potencial importante para ser empleados con tales fines, dado que se trata de *loci* dispersos por todo el genoma, altamente polimórficos, constituidos por secuencias simples (1-6 bp) repetidas en tándem; además, por su pequeño tamaño (normalmente menores de 350 bp) son fácilmente identificables mediante PCR. Las modernas técnicas electroforéticas, usando secuenciadores automáticos con tecnología fluorescente, ofrecen ventajas adicionales para la correcta tipificación de estos marcadores. En el presente trabajo analizamos las frecuencias alélicas y genotípicas del *locus* microsatélite ILSTS002 en 51 animales de raza bovina Barrosã. Los resultados obtenidos mostraron que la población objeto de estudio se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para dicho *locus* ($c^2$ = 5,4859; 7 g.l.; $p$ = 0,6009). Hemos observado un total de 5 alelos (129-137 bp), con una heterozigosidad media del 50,98 p.100.

## SUMMARY

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 was included among the objectives of these programs to establish breed prototype differences. Microsatellites are very useful DNA markers, which are dispersed in the genome and consist of highly polymorphic *loci* of simple tandemly repeated sequences 1-6 bp in length. Furthermore, because of their small sizes (frequently less than 350 bp) they are of easy identification by PCR and there is an additional advantage with new electrophoretic techniques using automated sequencers with fluorescent technology for the correct typification of these markers. In the present study, we analyzed allele and genotype frequencies of the ILSTS002

microsatellite *locus* obtained from 51 Barrosã cattle breed animals. Our results show that the population studied is in Hardy-Weinberg equilibrium for this *locus* ($c^2$ = 5,4859; 7 d.f.; $p$ = 0,6009). A total of 5 alleles were found (129-137 bp), with a heterozygosity mean value of 50,98 p.100.

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las poblaciones ganaderas autóctonas de Galicia y la Región Norte de Portugal se encuentran en la actualidad protegidas mediante programas operativos que incluyen planes de conservación. La similitud de algunas características morfológicas entre las razas autóctonas gallegas y las de Entredouro e Minho y Tras-os-Montes (portuguesas), así como la proximidad que existe en su implantación espacial en el Noroeste de la Península Ibérica, hacen necesaria su identificación genética.

Los marcadores genéticos constituyen un instrumento fundamental para el estudio de los distintos prototipos raciales, en este sentido, en los últimos años se está produciendo un gran avance, basado en técnicas de biología molecular, dentro del campo de la diferenciación entre razas e incluso entre individuos. Así, los microsatélites, que representan la última generación de marcadores de ADN ofrecen un potencial enorme para ser empleados a tales efectos, dado que aportan un alto nivel de información por ser muy polimórficos y de fácil identificación laboratorial.

Este conocimiento más exhaustivo de las distintas clases raciales, gracias al empleo de estos marcadores, tiene un gran interés, y no sólo desde el punto de vista económico en aquellas poblaciones con censos más estables, ya que representa un elemento de gran utilidad para la conservación de los recursos genéticos que se encuentran en peligro de extinción o con censos limitados, como es el caso de la raza bovina Barrosã, 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 ILSTS002 en 51 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 51 animales de la raza bovina Barrosã, ubicada en el Noroeste de la Península Ibérica, en el área geográfica de O Barroso, 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 $K_3$. 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 laboratoriales.

Para el análisis del microsatélite ILSTS002, STR dinucleotídico cuya unidad de repetición es $(CA)_n$, se rea-

lizó la PCR utilizando los primers descritos por Kemp *et al*. (1992):

*primer 1:*

*5' TCTATACACATGTGCTGTGC 3'*

*y primer 2:*

*5'CTTAGGGGTGAAGTGACACG 3'*, 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 sequenciador 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 $MgCl_2$, 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 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''/60°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 $Na_2EDTA$, pH 8,3), con 7 M de urea. El producto de PCR (1 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 automático (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* ILSTS002 obtenidas en la población ganadera objeto de nuestro estudio. Asimismo se refleja también que, realizada la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para dicho *locus*, dicha población se encuentra en equilibrio, con un valor de $c^2$ = 5,4859, con 7 grados de libertad (g.l.) y una probabilidad *p* = 0,6009.

***Tabla I**. Frecuencias alélicas y genotípicas del sistema ILSTS002 en la raza bovina Barrosã.* (Allele and genotype frequencies of the ILSTS002 system in the Barrosã cattle breed).

| Genotipo | Observados (p.100) | | Esperados (p.100) | |
|---|---|---|---|---|
| 129-129 | 1 | (2,0) | 2,16 | (4,2) |
| 129-131 | 1 | (2,0) | 1,44 | (2,8) |
| 129-135 | 18 | (35,3) | 14,62 | (28,7) |
| 131-131 | 1 | (2,0) | 0,24 | (0,5) |
| 131-135 | 4 | (7,8) | 4,87 | (9,5) |
| 133-135 | 1 | (2,0) | 0,70 | (1,4) |
| 135-135 | 23 | (45,1) | 24,71 | (48,5) |
| 135-137 | 2 | (3,9) | 1,39 | (2,7) |
| otros | 0 | (0,0) | 0,87 | (1,7) |

| Alelos | Raza Barrosã (n=51) |
|---|---|
| 129 | 0,2059 |
| 131 | 0,0686 |
| 133 | 0,0098 |
| 135 | 0,6961 |
| 137 | 0,0196 |

$c^2$ = 5,4859; 7 g.l.; p = 0,6009; Heterozigosidad media: observada = 0,5098, esperada = 0,4725

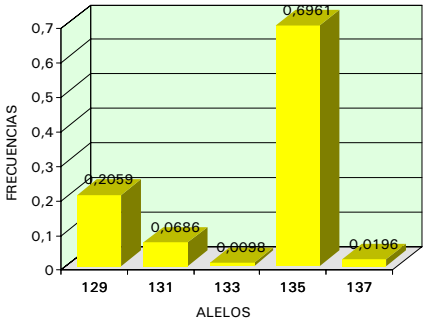


***Figura 1.*** *Frecuencias alélicas del* locus *ILSTS002 en la raza Barrosâ.* (Allele frequencies of the ILSTS002 *locus* in Barrosâ breed).

Asimismo, en dicha tabla, se muestra el valor de la heterozigosidad media observada para este *locus* en la citada raza, otro de los indicadores empleados para apreciar la existencia de variabilidad genética en las poblaciones, obteniéndose un valor del 50,98 p.100, que resultó ser ligeramente inferior a los obtenidos por nosotros, (Viana *et al*., 1997), para este mismo *locus* en otras dos razas autóctonas de la propia zona noroeste de la Península Ibérica (razas Maronesa y Caldelana), con valores de 63,15 p.100 y 72,72 p.100, respectivamente, y a los obtenidos por Ruíz Castillo (1995) en otras poblaciones ganaderas ubicadas dentro del territorio Peninsular: Pirenaica (63,80 p.100), Asturiana (64,84 p.100), Rubia Gallega (68,48 p.100) y Retinta (75,51 p.100).

En el estudio del microsatélite ILSTS002 en la raza Barrosã hemos encontrado un total de 5 alelos (129-137 bp), como se refleja en las **figura 1**, presentando el alelo 135 la frecuencia más alta (0,6961) y el 133 la más baja (0,098); este número de alelos resultó ser inferior al observado en los estudios realizados en las razas Maronesa y Caldelana por nosotros (Viana *et al*., 1997), en las que encontramos además de los 5 citados un alelo de 122 bp y, a los obtenidos en otras razas por KEMP *et al*., (1992), que encuentra 6 alelos (129-140 bp). Por su parte, Ruíz Castillo (1995) en los estudios realizados en 5 razas bovinas de la Península Ibérica encontró 10 alelos en dicho *locus*, si bien, nuestros resultados no pueden ser comparados con los obtenidos por este autor dado que no especifica en pares de bases el tamaño de los alelos que describe.

La **figura 2**, muestra 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 en el secuenciador automático con tecnología fluorescente por medio del programa informático *Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2*.

Los resultados que hemos obtenido al realizar un análisis comparativo del estudio del *locus* ILSTS002 en la raza bovina Barrosã por un lado, y las razas Maronesa y Caldelana por otro, nos reflejan que no es posible apreciar diferencias significativas entre las razas Barrosã y Maronesa ($c^2$ = 19,38, $p$ = 0,1117), si bien, éstas son mayores a las observadas para el estudio de este *locus* por nosotros, (Viana *et al*., 1997), entre las razas Maronesa y Caldelana ($c^2$ = 14,07, $p$ = 0,3688). Por otra parte, sí hemos encontrado diferencias significativas ($c^2$ = 35,89, $p$ = 0,0002), cuando el análisis comparati-

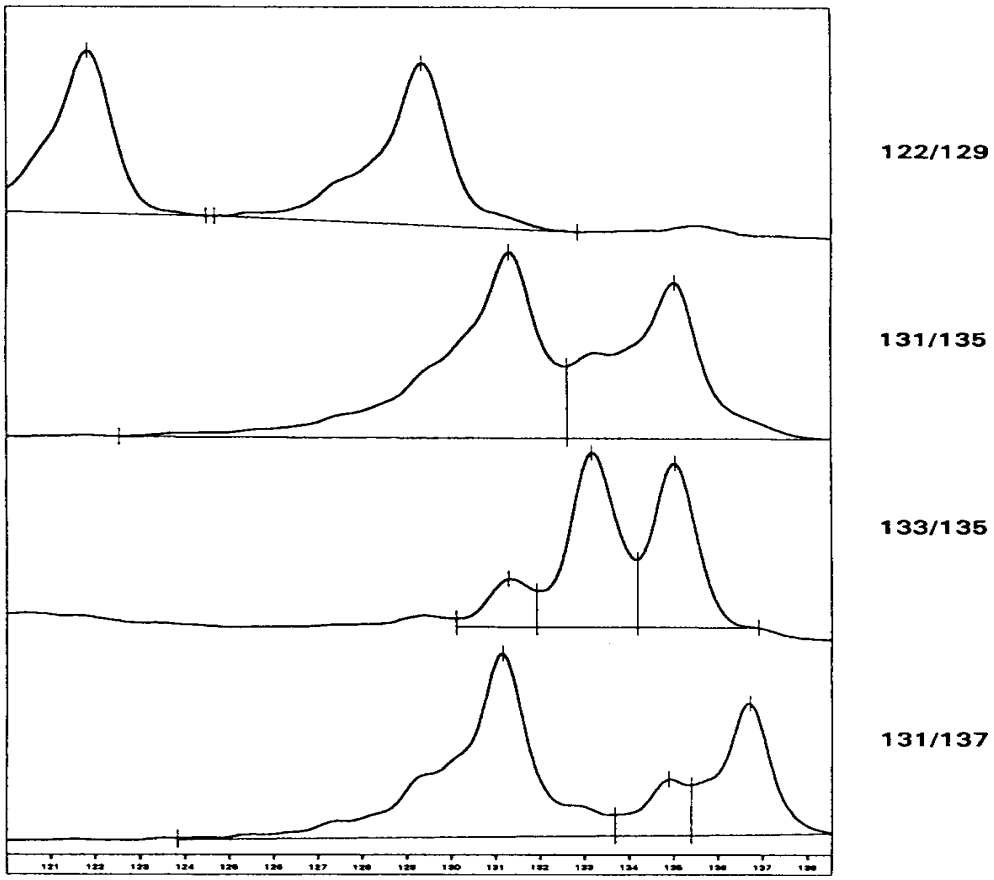


***Figura 2.*** *Alelos del* locus *microsatélite ILSTS002 en la raza bovina Barrosâ. Programa Pharmacia DNA fragment manager V1.2.* (Alleles of the ILSTS002 microsatellite *locus* in the Barrosâ cattle breed. Pharmacia DNA fragment manager V1.2 program).

vo entre los resultados obtenidos para dicho marcador lo realizamos entre las razas Barrosã y Caldelana.

Podemos destacar de los resultados obtenidos con la realización del presente estudio que, los microsatélites, por ser marcadores altamente polimórficos y presentar un tamaño relativamente pequeño que facilita su análisis mediante PCR, ofrecen un potencial importante para ser empleados en el campo de la diferenciación racial y, además que, gracias a la aplicación de las modernas técnicas electroforéticas resulta relativamente fácil su tipificación laboratorial, es decir, que se pueden conocer con exactitud tanto los tamaños alélicos (bp) como los distintos genotipos a los que da lugar su polimorfismo.

## BIBLIOGRAFÍA

Kemp, S.J., L. Brezinsky and A.J. Teale. 1992. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics*, 23: 184.

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.

Ruiz 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. Fac. Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.

Viana, J.L., A. Fernández, L. Sánchez, M.S. Rodríguez-Calvo y A. Iglesias. 1997. (En prensa). Análisis del *locus* ILSTS002 en dos razas bovinas autóctonas del Noroeste de la Península Ibérica (razas Caldelana y Maronesa). IV Jornadas Internacionales de ganado Vacuno. Lugo (Galicia). España.