POSTER

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS BOVINOS CRIOLLOS DEL URUGUAY. II. ESTUDIO DE SU VARIABILIDAD GENÉTICA

GENETIC CHARACTERIZATION OF URUGUAYAN CREOLE CATTLE. II. STUDY OF ITS GENETIC VARIABILITY

Postiglioni, A.[1], G. Rincón[1], L. Kelly[1], M. D'Angelo[1], R. Gagliardi[1] y D. De Andrés Cara[2]

[1]Laboratorio de Citogenética de Animales Domésticos. Área Genética. Departamento de Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. A. Lasplaces 1550. C.P. 11600. Montevideo. Uruguay. Email: aposti@gene.edu.uy.

[2]Unidad Mixta CSIC-UCO *Marcadores Genéticos Moleculares*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Proteínas de la leche. Polimorfismos en microsatélites. Hemoglobina.

ADDITIONAL KEYWORDS

Milk proteins. Microsatellite polymorphism. Haemoglobin.

RESUMEN

La diversidad genética animal es considerada indispensable para sostener la productividad de la agricultura. La FAO estima que el 30 p.100 de las razas de ganado, corren riesgo de extinción, encontrándose más de la mitad de ellas en países en desarrollo. Antecedentes de estudios genéticos realizados en bovinos Criollos americanos (Argentina, Colombia, Venezuela, Cuba) permiten hoy, revalorizar esta raza para ser utilizada en la explotación agropecuaria.

En el Uruguay, existe una reserva de alrededor de 600 animales que habita en una zona húmeda, de sierras y montes, no alterada, limitada por diferentes barreras geográficas. El aspecto morfológico de estos animales se asemeja al de ciertas poblaciones de bovinos Criollos argentinos, venezolanos, colombianos y, a ciertas razas ibéricas.

Con el objetivo de estudiar la estructura genética de esta población, se analizaron 82 muestras de ADN por la metodología PCR/RFLP para las proteínas de la leche κ–caseína y β–lactoglobulina, 20 muestras para el microsatélite CYP21 (esteroide 21-hidroxilasa) y 77 animales para hemoglobina mediante electroforesis en gel de almidón. Los índices de endogamia y de heterocigosidad correspondieron a F= 0,02 y He= 0,487. Las frecuencias genotípicas se distribuyeron de acuerdo a los valores esperados para el equilibrio H.W. El bajo índice de endogamia obtenido en los 4 *loci* analizados, la relación entre el número de genotipos homocigotos y heterocigotos, el alto polimorfismo que presentó el microsatélite CYP21, así como la variabilidad observada en la coloración del pelaje, permiten sugerir que, a pesar de ser ésta una reserva aislada geográficamente, ha expresado una variabilidad genética tan importante que justifica su conservación como un recurso genético de animal doméstico.

Arch. Zootec. 47: 225-231. 1998.

SUMMARY

Animal genetic diversity is considered essential to sustain the productivity of agriculture. FAO estimates that 30 percent of livestock breeds are at risk of extinction and more than half of these breeds are found in developing countries. Previous genetic research upon American Creole Cattle (Argentina, Colombia, Venezuela, Cuba) valuate these breeds, being considered of interest to maintain and enhance livestock production.

In Uruguay, limited by different geographic barriers, about 600 bovines inhabit in hard environment in areas that cannot sustain conventional farming. Aspect of Uruguayan Creole cattle is similar to that observed in certain American and Iberian breeds.

Analysis of breed genetic variability involved the utilization of PCR/RFLP technology in 82 DNA samples for milk proteins (κ–casein and β–lactoglobulin), amplification of 20 samples for CYP21 microsatellite and the use of protein markers such as haemoglobin in 77 animals. Inbreeding index and expected Heterocigosity considering four *loci* were F= 0.02 and He= 0.487. Genotypic frequency distribution was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Genetic variation estimated, reinforced by the low inbreeding index, strengthen the need of preservation of Uruguayan Creole Cattle as a domestic animal genetic resource.

INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de razas ibéricas (variedades andaluza y portuguesa) a nuestro continente hasta nuestros días, los bovinos Criollos americanos han superado las variaciones climáticas propias de nuestro ecosistema, expresando todo su potencial genético regulado por 4 siglos de selección natural. Su alto grado de adaptabilidad se cuantifica por una serie de características observables y medibles: a) fenotípicas (piel gruesa, coloración variable de la capa, cuernos en forma de lira); b) comportamiento (capacidad de desplazamiento, terneros junto a su madre); c) sanidad (ausencia de distocia, baja mortalidad del ternero) (Primo, 1992; Giovambattista, 1995).

En la zona sureste del Uruguay, fronteriza con Brasil (Departamento de Rocha), existe una reserva de alrededor de 600 animales que habitan en una zona húmeda, de sierras y montes, no alterada, limitada por barreras geográficas naturales, cuyo aspecto morfológico se asemeja al de ciertas poblaciones de bovinos Criollos argentinos, venezolanos, colombianos y ciertas razas ibéricas. Esta población ha despertado un particular interés para estudiar su estructura genética, ya que se ha mantenido aislada alrededor de 50 años, en condiciones de ecosistema similares a las que existían en la Banda Oriental (siglo XVI) (Arredondo, 1955).

Con el propósito de estudiar la estructura genética de esta población, y comparar sus frecuencias alélicas con otras poblaciones iberoamericanas de características fenotípicas similares, se seleccionaron los siguientes marcadores genéticos: a) moleculares de tipo I, por corresponder a genes muy conservados en la evolución; b) marcadores proteicos, ya determinados en otras razas comparables; c) marcadores moleculares de tipo II, seleccionados por su alto grado de polimorfismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó una muestra de bovinos

Criollos, caracterizados por la variabilidad en la coloración de su pelaje (bayo, hosco, moro azulejo, rosillo, lobuno, negro manchado, barcino, colorado). Se extrajo sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante. Se analizaron 77 animales para la hemoglobina (Hb) mediante electroforesis en gel de almidón.

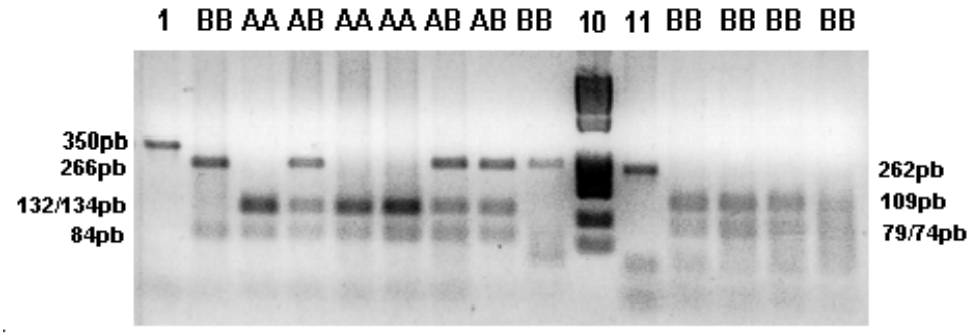
Para testar las técnicas moleculares se aisló ADN genómico de cada individuo, a partir de sangre entera. Se utilizó detergente no-iónico, fenol/cloroformo, y precipitación con etanol (John *et al.*, 1991), a efectos de fundar el banco genómico de esta reserva. La valoración del ADN se realizó en geles de agarosa (0.8 p.100) utilizando como marcador de peso molecular el fago ØX174 digerido con la enzima de restricción Hind III. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente, ajustándose su concentración en 200ng/µl. Se amplificaron alícuotas de cada muestra de ADN por la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se testaron variaciones alélicas en secuencias de los genes que codifican para la κ–caseína, y β–lactoglobulina y para secuencias repetidas del microsatélite (MS) del gen esteroide 21-hidroxilasa, CYP21.

κ– CASEÍNA Y β–LACTOGLOBULINA

Se analizaron 82 individuos mediante la amplificación de fragmentos de los genes de la κ–caseína y β–lactoglobulina correspondientes a las terminaciones del exón IV y comienzo del intrón IV (Medrano,1990 a,b). Se sometieron 200ng de ADN al kit de super mix PCR (GIBCO, BRL), ajustándose a un volumen final de 30µl. Los RFLPs se obtuvieron por digestión de las amplificaciones con las siguientes enzimas de restricción: a) 5U de HinfI para la secuencia de la κ–caseína; b) 5U de HaeIII para la secuencia amplificada de la β–lactoglobulina. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico (Thermolyne) con la siguiente secuencia: 1 ciclo de 1 min a 96°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C y 1 min a 73°C; 1 ciclo de 5 min a 73°C. Los productos de amplificación y los fragmentos de restricción se controlaron por electroforesis en geles de agarosa al 2,7 p.100 en TAE 1X, a 95 V, teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml.), utilizándose como marcador de peso molecular el fago ØX174 digerido con HindIII.

MICROSATÉLITE CYP21

Se analizaron 20 muestras amplificando una región repetida del intrón del gen de la esteroide 21-hidroxilasa (Usha *et al.*, 1995). Ésta corresponde a un fragmento de 254-300pb. La amplificación *in vitro* se realizó en un volumen total de 20µl conteniendo 200ng de ADN, 20pmles de cada cebador, 200µM de cada dNTP, 10 p.100 de 10X PCR buffer, 1,25mM de Cl_2Mg y 0,5U de Taq DNA polimerasa (GIBCO). La reacción de amplificación se realizó en un ciclador térmico (Thermolyne) comprendiendo el siguiente programa: 1 ciclo de 2 min a 97°C, 40 s a 60°C y 45 s a 72°C; 28 ciclos de 45 s a 94°C, 40 s a 60°C y 45 s a 72°C; 1 ciclo de 45 s a 94°C, 40 s a 60°C y 10 min a 72°C. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (6 p.100) desnaturalizantes, a 50W durante 1 hr y 30 min. El revelado se llevó a cabo por tinción de plata (Promega, Q4160).



Lane 1. Fragmento del gen de la k-caseína
Lanes 2 al 9. Genotipeado de κ-caseína
Lane 10. Marcador de peso molecularΦ X 174
Lane 11. Fragmento del gene de la β-lactoglobulina
Lanes 12 al 15. Genotipeado de β-lactoglobulina

Figura 1. *Genotipeado de κ–caseína y β–lactoglobulina*. (Genotyping of κ-caseín and β-lactoglobulin).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las frecuencias génicas de todos los marcadores en base a las frecuencias genotípicas observadas de las muestras analizadas. Los índices de endogamia y heterocigosidad esperada se obtuvieron para estimar la variabilidad genética de la población.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron los genotipos de la κ–caseína, y β–lactoglobulina **(figura 1)**, se calcularon sus frecuencias génicas y se comprobó el equilibrio H.W. **(tabla I)**. La proporción esperada 1:1 entre homocigotos y heterocigotos resultó ser homologable a la proporción observada, siendo comparable a las descritas en ciertas razas españolas, Morucha, Avileña (Arranz *et al*., 1995), determinándose así, una estabilidad para estos alelos. Si comparamos estos resultados con genotipeados en poblaciones totales de bovinos Criollos Argentinos, se observa una ligera desviación a favor del alelo A, para la κ–caseína, no existiendo equilibrio génico en la distribución alélica de la proteína β–lactoglobulina (p>0,001) (Poli y Antonini, 1991).

En el caso particular de una reducida población (N= 35) ubicada en Chasquivil (Tucumán, Argentina) las frecuencias genotípicas de la κ–caseína resultaron ser homologables a las evaluadas en este trabajo. Sin embargo, la ausencia de homocigotos AA para el gen de la β–lactoglobulina, favoreció la desviación hacia las formas heterocigotas, (Giovambattista, 1995), alejándose significativamente, de la estabilidad alélica demostrada en nuestra población. Poblaciones de bovi-

***Tabla I**. Frecuencias génicas y genotípicas, coeficiente de endogamia y heterocigosidad esperada, de los* loci *de k-caseina , β-lactoglobulina y hemoglobina de bovinos Criollos del Uruguay.* (Gene and genotype frequencies, inbreeding coefficient and expected heterozigosity of k-casein, β-lactoglobulin and hemoglobin *loci* in Uruguayan Creole Cattle).

Locus	Frecuencias génicas		Frecuencias genotípicas			χ2	F	He
	A	B	A A	AB	BB			
κ-CN	0,50	0,50	0,27	0,50	0,23	0,04	0,02	0,5
β-LG	0,51	0,49	0,26	0,50	0,24	0,05	0	0,5
Hemoglobina	0,95	0,05	0,91	0,09	0	0,185	0,06	0,095

F= Coeficiente de endogamia
He= Heterocigosidad esperada
χ2= χ2 de equilibrio H-W

nos Criollos en regiones de Argentina y Uruguay, demuestran para estos alelos, un alto grado de heterocigosis **(tabla I)**.

El microsatélite (MS) CYP21, mostró un total de 10 alelos, en 20 muestras amplificadas de ADN **(tabla II)**. Éste fue seleccionado por su mayor PIC en un total de 5 MS estudiados en razas españolas (Arranz *et al*.,1995). Por otro lado, en la población de Chasquivil se analizó la variabilidad del gen BoLA-DRB3, encontrándose 12 alelos en una muestra de 35 individuos (Giovambattista, 1995). Dado su alto grado de polimorfismo, sería deseable complementar los estudios de ambos marcadores polimórficos, en estas poblaciones de la zona Sur del Continente, y demostrar su variabilidad genética.

Los resultados obtenidos para la tipificación de hemoglobinas indicaron una mayor frecuencia del alelo A. La prueba de equilibrio génico resultó no significativa **(tabla I)**. Estos datos son homologables a los descritos en razas españolas del Centro y Sur de España. Esta expresión mayoritaria del alelo A sobre el B podría deberse al papel selectivo que juega la hemoglobina como transportadora de oxígeno, en el ecosistema donde debe cumplir su función, postulándose una relación entre el consumo de oxígeno y las alturas donde habitualmente se encuentran estas razas (Tejedor *et al*., 1986).

Lorraine *et al*. (1997) estudiando el gen de la β–lactoglobulina han determinado polimorfismos en la región promotora con la función de regular

***Tabla II.** Frecuencias génicas y genotípicas del* locus *cyp21 en bovinos Criollos del Uruguay.* (Gene and genotype frequencies of cyp21 *locus* in Uruguayan Creole Cattle).

Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
A	0,075	F	0,075
B	0,175	G	0,05
C	0,275	H	0,075
D	0,1	I	0,05
E	0,1	J	0,025

sus variantes alélicas con afinidad específica de los factores de transcripción sugiriéndolo como modelo para estudio de la expresión diferencial alélica. Estudios moleculares a nivel de la región promotora del gen de la hemoglobina, permitirían investigar si la expresión diferencial de estos alelos se encuentra relacionada con cierta afinidad de los factores de transcripción en las regiones polimórficas de la región promotora.

La alta heterocigosidad esperada obtenida en los 4 *loci* analizados, el bajo índice de endogamia, el hallazgo de la translocación robertsoniana (rob 1; 29) en heterocigosis en esta reserva (Postiglioni *et al*., 1995), así como la variabilidad observada en la coloración de la capa, permiten sugerir que, a pesar de ser ésta una reserva aislada geográficamente, ha expresado una variabilidad genética homologable a la descrita para razas del Centro y Sur de España, lo que justifica su conservación como un recurso genético de animal doméstico.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Vega por el asesoramiento técnico en la obtención de los microsatélites. Trabajo financiado por el proyecto P022 BID/CONICYT, PEDECIBA, CSIC, CIDEC.

BIBLIOGRAFÍA

Arranz, J.J., Y. Bayon and F. San Primitivo. 1995. Genotyping of milk proteins in Spanish cattle using PCR. 25th Conference of ISAG. E02. pp. 27.

Arranz, J.J., Y. Bayon, L. Grobet and F. San Primitivo. 1995. Analysis of the variation at five polymorphic microsatellites in some breeds of cattle. 25th Conference of ISAG E02. pp. 27.

Arredondo, H. 1955. La restauración de las fortalezas. La formación de sus parques. SE.PA.E. pp.150.

Giovambattista, G. 1995. Estudio de la variabilidad (polimorfismos) genética en poblaciones de bovinos (*Bos taurus*) de la raza Criolla. Tesis doctoral. (La Plata, Argentina). pp. 144.

John, S.W.M., G, Weitzner, R. Rozen and C.R. Scriver. 1991. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*, 19: 408.

Lorraine, S., P. Lum and J.F. Medrano. 1977. Polymorphisms of bovine β–lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *J.Dairy Sci.,* 80: 1389-1397.

Medrano, J.F and E. Aguilar-Cordova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein *loci* following DNA sequence amplification. *Biotechnology,* 8: 144-146.

Medrano, J.F. and E. Aguilar-Cordova. 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β–lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology,* 1: 73-77.

Poli, M.A. and A.G. Antonini. 1991. Genetic

structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole cattle. *Hereditas,* 115: 177-182.

Postiglioni, A., S. Llambí, R. Gagliardi and M. de Bethencourt. 1996. Genetic characterization of Uruguayan Creole cattle. I. Cytogenetic characterization of a sample of uruguayan Creole cattle. *Arch. Zootec.,* 54: 209-213.

Primo, A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Arch. Zootec.,* 41: 421-432.

Tejedor, T., C. Rodellar y P. Zaragoza. 1986. Análisis de la variabilidad genética en razas bovinas, mediante estudios electroforéticos. *Arch. Zootec.,* 35: 1-13.

Usha, A.P., S.P. Simpson and J.L. Williams. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*, 26: 155-161.