

COMUNICACIÓN

ANÁLISIS GENÉTICO DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN DOS POBLACIONES DE LA RAZA BOVINA BERRENDA EN NEGRO

GENETIC ANALYSIS OF MICROSATELLITES MARKERS IN TWO POPULATIONS OF
BERRENDA EN NEGRO BOVINE BREED

Zamorano, M.J.¹, J. Ruiter², A. Rodero¹ y J.L. Vega-Pla³

¹Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara s/n. 14005-Córdoba. España.

²Institute of Zoology. Zoological Society of London. Regent's Park, NW1-4RY Londres (Reino Unido).

³Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Apartado Oficial Sucursal 2. 14071-Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Recursos genéticos. PCR. Heterocigosidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic resources. PCR. Heterocigosity.

RESUMEN

La raza Bovina Berrenda en Negro se ha utilizado clásicamente en el manejo del toro de lidia y actualmente se encuentra próxima a su extinción. Para contribuir a los planes de recuperación genética de esta raza, se caracteriza una muestra de 32 animales con un panel de 15 microsatélites y se proporcionan datos que permitan, en un futuro, comparar su variabilidad con otras razas bovinas.

SUMMARY

The Berrenda en Negro cattle breed has been used classically in the management of the fight bull and currently is found next their extinction. To contribute to the genetic conservation programs of this breed, we are characterized a sample of 32 animals with a panel of 15 microsatellites and we are provided data that permit, in a future, to compare its variability with other cattle breeds.

INTRODUCCIÓN

La raza bovina Berrenda en Negro está íntimamente ligada al manejo del ganado de lidia al igual que la Berrenda en Rojo, aunque los ganaderos comienzan a desprenderse de los primeros para la conducción del toro de lidia por su mayor envergadura y peores aptitudes para esta misión que la segunda. Actualmente está en peligro de extinción. El censo actual no supera los 400 animales y se encuentran además diseminados en diferentes áreas geográficas que limitan el intercambio de material genético entre las diferentes poblaciones. Se considera muy interesante realizar estudios enfocados a conocer la variabilidad genética de esta raza y que, en el futuro, formen la base para la elaboración de planes de conservación de los recursos genéticos más característicos de esta raza.

Arch. Zootec. 47: 195-200. 1998.

La FAO, desde 1996, reconoce oficialmente que el estudio de microsatélites proporciona mucha información sobre la diversidad y variabilidad genética de poblaciones. Los microsatélites o STR (Short Tandem Repeat) son secuencias del genoma compuestas por un motivo repetitivo de 2 a 6 bases generalmente. El número de repeticiones que posee en un *locus* específico varía de unos individuos a otros, pudiéndose poner de manifiesto estas variaciones mediante técnicas relativamente sencillas. La gran cantidad de *loci* presentes en el genoma de los mamíferos, y el elevado polimorfismo que presentan muchos de ellos los convierten en herramientas muy poderosas para la Genética de Poblaciones.

El objetivo de este trabajo es aportar información sobre las variantes alélicas detectadas en un conjunto de microsatélites, la Heterocigosidad por *locus* y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) en dos poblaciones de ganado vacuno de la raza Berrenda en Negro.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material animal, ha sido una muestra de 32 individuos pertenecientes a dos poblaciones geográficamente distantes y que no comparten un origen común conocido. Una de ellas está ubicada en la Sierra de Aracena en Huelva, de la que se analizan 19 indivi-

Tabla I. *Microsatélites bovinos* (Bovine microsatellites).

| Marcador | Cebadores directo y reverso | Tamaño | Referencias |
|----------|--|---------|--------------------------------|
| CSSM14 | AAATGACCTCTCAATGGAAGCTTGAATTCTGGCACTTAATAGGATTCA | 133-144 | Barendse <i>et al.</i> , 1994 |
| SPS-115 | AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAGAACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG | 240-262 | Barendse <i>et al.</i> , 1994 |
| BM-1818 | AGCTGGGAATATAACCAAAGGAGTGCTTTCAAGGTCCATGC | 258-270 | Bishop <i>et al.</i> , 1994 |
| INRA005 | CAATCTGCATGAAGTATAAATATCTTCAGGCATACCCTACACC | 119-123 | Vaiman <i>et al.</i> , 1992 |
| INRA063 | ATTTCACAAAGCTAAATCTAACCAACACAGAAATGCTTGAAG | 176-186 | Vaiman <i>et al.</i> , 1994 |
| HEL-13 | TAAGGCTTGAGATAAGGAGCCATCTACCTCCATCTAAC | 198 | Kaukinen <i>et al.</i> , 1993 |
| ETH-10 | GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACACCTCCAGCCACTTTCTCTCTC | 210-226 | Steffen <i>et al.</i> , 1993 |
| BM.4621 | CAAATTGACTTATCCTTGGCTGTGTAACATATGGGCTGCATC | 140-160 | Bishop <i>et al.</i> , 1994 |
| ETH225 | GATCACCTTGCCACTATTTCTCATGACAGCCAGCTGCTGCTACT | 140-156 | Fries <i>et al.</i> , 1993 |
| HEL5 | GCAGGATCACTTGTTAGGGAAGACGTTAGTGTACATTAAC | 161 | Kaukinen <i>et al.</i> , 1993 |
| HEL1 | CAACAGCTATTTAACAAGGAAGGCTACAGTCCATGGGATT | 110-102 | Kaukinen <i>et al.</i> , 1993 |
| BM1824 | GAGCAAGGTGTTTTTCCAATCATTCTCCAAGTCTTCCTTG | 178-190 | Bishop <i>et al.</i> , 1994 |
| ILSTS005 | GGAAGCAATGAAATCTATAGCCGTGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC | 181-187 | Brezinsky <i>et al.</i> , 1993 |
| ETH152 | TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTGAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG | 198-204 | Fries <i>et al.</i> , 1993 |
| BM-143 | ACCTGGGAAGCCTCCATATCTGCAGGCAGATTCTTTATCG | 90-120 | Bishop <i>et al.</i> , 1994 |

duos, y la otra de la zona de Sierra Morena en Córdoba, de la que se analizan 13 individuos.

Se obtienen muestras de sangre y pelo de cada animal de las que se extrae y purifica DNA. En el caso de las muestras de sangre el protocolo de extracción de DNA consiste en lavados sucesivos para lisar las células y eliminar la hemoglobina, seguida por una digestión de la proteínas con Proteínasa K y purificación con fenol y cloroformo. En las muestras de pelo, cuando es necesario realizar la extracción de DNA, se realiza una digestión con Proteínasa K seguida de una absorción de iones del medio mediante el empleo de la resina Chelex-100® siguiendo un protocolo del Institute of Zoology de Londres.

Se amplifican un total de 15 microsatélites mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1985). El panel de marcadores que se escoge se encuentra dentro de los propuestos por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para la preparación del proyecto MoDAD de la FAO (**tabla I**).

La preparación de la PCR se realiza en un volumen final de 10ml, en un tampón 50mM KCl, 10mM Tris-ClH pH 8,3, 0,1 p.100 Triton X-100, con dNTPs 1,25mM cada uno, 2,5mM MgCl₂, 2,5 pmoles de cada cebador, 1,3 unidades de Taq DNA polimerasa y 20 ng de DNA. En algunos casos se emplea la técnica de multiplex-PCR que consiste en amplificar juntos varios microsatélites. La reacción se somete a ciclos de tiempo y temperatura: un ciclo de desnaturalización de 1 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 60 seg a 93°C, 60 seg a 50, 55 o 60°C (depen-

diendo del microsatélite) y 10 ciclos de 60 seg a 93°C y 60 seg a 57°C (para todos igual) y, finalmente, un ciclo de extensión de 10 min a 72°C.

Los productos de amplificación se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6 p.100 en un secuenciador automático (ABI 373A). La caracterización posterior de los tamaños se realizó utilizando un marcador de tamaños y un análisis de regresión que se realizan con los sistemas informáticos del secuenciador.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas se procedió al recuento directo de los alelos y como medida de la variabilidad se calculó también el grado de heterocigosis por *locus* mediante la fórmula propuesta por Nei y Roychoudhry (1974) y el contenido de información polimórfica (PIC) en la población total para cada uno de los marcadores, según la fórmula propuesta por Botstein *et al.* (1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias alélicas quedan recogidas en la **tabla II**, diferenciando las dos poblaciones, BN1 y BN2, y la población total. Todos los marcadores son polimórficos variando el número de alelos entre 2 para marcadores como ILSTS005, CSMM-14 y INRA063 y 6 para BM-143 y ETH-10. En cuanto al número de alelos presentes entre las dos poblaciones consideradas independientemente, es elevado, destacando quizás que para el marcador ETH152 la población BN1 presenta 3 alelos más que la BN2 y 2 alelos más en el caso de ETH225, BM-143 y HEL-5.

Tabla II. Frecuencias alélicas de 15 marcadores en dos poblaciones (BN1 y BN2) de animales de raza Berrenda en Negro. (Allelic frequencies in 15 markers for two populations (BN1 and BN2) of Berrenda en Negro Breed).

| ILSTS005 | | | | ETH-152 | | | | BM-4621 | | | | HEL-1 | | | |
|----------|------|------|-------|---------|------|------|-------|---------|------|------|-------|--------|------|------|-------|
| Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total |
| 183 | 0,61 | 0,58 | 0,59 | 198 | 0,08 | 0,19 | 0,12 | 140 | | 0,12 | 0,05 | 102 | 0,08 | 0,19 | 0,13 |
| 185 | 0,39 | 0,42 | 0,41 | 200 | 0,36 | 0,81 | 0,54 | 142 | 0,42 | | 0,25 | 104 | 0,24 | 0,50 | 0,34 |
| | | | | 202 | 0,50 | | 0,30 | 144 | 0,03 | 0,08 | 0,05 | 110 | | 0,27 | 0,11 |
| | | | | 204 | 0,03 | | 0,02 | 146 | 0,55 | 0,80 | 0,65 | 112 | 0,68 | 0,04 | 0,42 |
| | | | | 206 | 0,03 | | 0,02 | | | | | | | | |
| ETH225 | | | | BM-143 | | | | BM-1818 | | | | HEL-5 | | | |
| Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total |
| 141 | 0,82 | 0,31 | 0,61 | 105 | 0,47 | 0,65 | 0,55 | 259 | | 0,44 | 0,17 | 152 | 0,03 | | 0,02 |
| 143 | 0,03 | | 0,02 | 107 | 0,05 | | 0,03 | 261 | | 0,06 | 0,03 | 154 | 0,18 | 0,19 | 0,18 |
| 151 | 0,05 | 0,69 | 0,31 | 113 | | 0,04 | 0,02 | 265 | 0,38 | 0,19 | 0,3 | 156 | 0,05 | | 0,03 |
| 153 | 0,10 | | 0,06 | 115 | 0,21 | 0,31 | 0,25 | 267 | 0,62 | 0,31 | 0,5 | 166 | 0,03 | 0,15 | 0,08 |
| | | | | 117 | 0,05 | | 0,03 | | | | | 168 | 0,71 | 0,65 | 0,69 |
| | | | | 119 | 0,21 | | 0,12 | | | | | | | | |
| INRA063 | | | | ETH-10 | | | | INRA05 | | | | CSSM14 | | | |
| Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total |
| 179 | 0,45 | 0,25 | 0,35 | 218 | 0,25 | | 0,14 | 121 | 0,28 | 0,35 | 0,32 | 140 | 0,23 | 0,5 | 0,35 |
| 181 | 0,55 | 0,75 | 0,65 | 220 | 0,33 | 0,1 | 0,23 | 123 | 0,11 | 0,45 | 0,29 | 146 | 0,76 | 0,5 | 0,65 |
| | | | | 222 | | | 0,04 | 125 | 0,61 | 0,20 | 0,39 | | | | |
| | | | | 224 | 0,33 | 0,5 | 0,41 | | | | | | | | |
| | | | | 226 | 0,08 | | 0,04 | | | | | | | | |
| | | | | 228 | | 0,3 | 0,14 | | | | | | | | |
| IBM-1824 | | | | SPS-115 | | | | HEL-13 | | | | | | | |
| Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | Alelos | BN1 | BN2 | Total | | | | |
| 180 | 0,61 | 0,50 | 0,42 | 249 | 0,86 | 0,81 | 0,84 | 140 | | 0,12 | 0,05 | | | | |
| 182 | 0,39 | 0,26 | 0,23 | 251 | 0,14 | 0,06 | 0,03 | 142 | 0,42 | | 0,25 | | | | |
| 184 | | 0,13 | 0,04 | 261 | | 0,13 | 0,13 | 144 | 0,03 | 0,08 | 0,05 | | | | |
| 190 | | 0,11 | 0,31 | | | | | 146 | 0,55 | 0,80 | 0,65 | | | | |

Por el contrario la población BN2 tiene más alelos en HEL1, BM-1818, BM-1824 y SPS-115. Algunos microsatélites, HEL-13, INRA063, ILSTS005, BM-4621, INRA05 y CSSM14, tienen el mismo número de alelos.

Rodellar *et al.* (1996) detectan el mismo número de alelos en el marcador INRA05 en razas bovinas españolas del Norte como la Pirenaica y As-

turiana de los Valles, siendo el polimorfismo que estiman para el marcador ETH-225 mayor en esta última población.

En la **tabla III** figuran los valores de la heterocigosidad por *locus* que varían entre 0,27 en SPS-115 y 0,74 en ETH-10. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Machugh *et al.* (1994) que estudian la variabilidad genética

POLIMORFISMO DE DNA EN LA RAZA BOVINA BERRENDA EN NEGRO

Tabla III. Heterocigosidad por locus (H) y Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 15 marcadores en la raza Berrenda en Negro. (Heterocigosity (H) and Polymorphic Informative Content (PIC) in 15 markers of Berrenda en Negro breed).

| | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|-------|
| | ILSTS005 | ETH-225 | ETH-152 | BM-143 | BM-4621 | BM-1824 | HEL-1 | HEL-5 |
| H | 0,37 | 0,53 | 0,60 | 0,62 | 0,50 | 0,67 | 0,68 | 0,6 |
| PIC | 0,48 | 0,45 | 0,53 | 0,57 | 0,44 | 0,62 | 0,62 | 0,53 |
| | INRA05 | INRA063 | SPS-115 | ETH-10 | BM-1818 | CSSM-14 | HEL-13 | |
| H | 0,66 | 0,46 | 0,27 | 0,74 | 0,63 | 0,46 | 0,52 | |
| PIC | 0,59 | 0,35 | 0,25 | 0,70 | 0,56 | 0,35 | 0,41 | |

entre varias poblaciones bovinas mediante algunos marcadores microsatélites, hallando valores de heterocigosidad comprendidos entre 0,8 para el marcador ETH-225 en la raza Frisian (n=40) y 0,55 para el marcador ETH152 en la raza Simmental (n=36).

La heterocigosidad media en el total de la muestra resultó ser de 0,6 lo cual está dentro de los valores que Moazami-Goudarzi *et al.* (1997) dan de un total de 17 marcadores microsatélites en 10 razas bovinas europeas.

Los valores del PIC obtenido están dentro de los descritos por Arranz (1994) y Rodellar *et al.* (1996) en poblaciones bovinas españolas, siendo ETH-225 altamente informativo al igual que en la Raza Rubia Gallega.

Sin duda, este tipo de marcadores proporciona una gran información en estudios de genética de poblaciones, como propone la FAO (1996). Buchanan *et al.* (1994) y Machugh *et al.*

(1994), con 5 y 12 microsatélites detectan significativas diferencias entre poblaciones ovinas y bovinas respectivamente. Ello no significa que no haya que considerar cual es el número apropiado de marcadores para este tipo de estudios como Moazami-Goudarzi *et al.* (1997) se cuestionan.

A la vista de estos resultados, y a la espera de una mayor abundancia de los mismos, ya se puede afirmar que el polimorfismo presentado en las dos poblaciones y el conjunto de las mismas es alto y que está en consonancia con el detectado para otras razas bovinas españolas. Hay, por lo tanto, una fundada esperanza en que se pueda recuperar la raza Berrenda en Negro con un nivel de variabilidad aceptable siempre y cuando se desarrollen unos programas de conservación acordes a la idiosincrasia particular de estos animales y los sistemas de explotación que actualmente tienen.

BIBLIOGRAFÍA

Arranz, J.J. 1994. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Barendse W., S.M.Armitage, L.M.Kossarek, A.Shalom, B.W.Kirkpatrick, A.M.Ryan, *et al.*

1994. A genetic linkage map of bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227-235.
- Botstein, D., R.L.White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Bishop, M.D., S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, S.L.F. Sunden, H.A. Gregory *et al.* 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639.
- Brezinsky, L., S.J. Kemp and A.J. Teale. 1993. ISTS005: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics*, 24: 73
- FAO. 1996. Proceedings of IGA/FAO round table on the global management of small ruminant genetic resources. Beijing. May 1996. Edited by Devendra.
- Fries, R., A. Eggen and J.E. Womack. 1993. The bovine genome map. *Mammalian Genome*, 4: 405-428.
- Kaukinen, J. and S.L. Varvio. 1993. Eight polymorphic bovine microsatellites. *Animal Genetics*, 24: 148.
- Nei, M. and A.K. Roychoudhry. 1974. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.
- Machugh, D.E., R.T. Loftus, D.G. Bradley, P.M. Sharp and P. Cunningham. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 256: 25-31.
- Moazami-Goudarzi, K., D. Laloë, J.P. Furel and F. Grosclaude. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics*, 28: 338-345.
- Rodellar, C., Y. Martin-Burriel, C. Cons and I. Zarazaga. 1996. Genetic structure and distances between three Spanish bovine breeds using INRA05, 063, ETH3, 10, 225 y ILSTS005 microsatellites. Proceedings of XXVth International Society for Animal Genetics. Tours. France.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, *et al.* 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Vaiman, D., D. Osta, D. Mercier, C. Grohs and H. Leviziel. 1992. Characterisation of five new bovine microsatellite repeats. *Animal Genetics*, 23: 537.
- Vaiman, D., D. Mercier, K. Moazami-Goudarzi, A. Eggen, R. Ciampolini, A. Lepingle *et al.* 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, syntenic mapping and polymorphism. *Mammalian Genome*, 5: 288-297.