

Detección de nuevos alelos microsatélites en el cromosoma 6 de la raza Gyr

Ariosto Ardila¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue obtener información de marcadores genéticos y hacer análisis de asociación para marcadores multialélicos en la raza bovina Gyr lechera. 14 familias paternas con 651 hijas fueron analizadas sobre el cromosoma 6. Este cromosoma fue escogido porque BTA6 (*Bos taurus* autosoma-6) es conocido como un cromosoma en el que han sido encontrados un gran número de QTL (*Quantitative Trait Loci*) y de genes candidatos para características de leche. Las vacas y los toros fueron genotipados con 27 marcadores microsatélites y fueron seleccionados del cromosoma 6, de acuerdo con el último mapa MARC reportado. Los marcadores cubrieron 130,78 cM; el promedio de longitud de intervalo entre marcadores fue de 4,9 cM. El orden de las distancias de mapa halladas fue consistente con el mapa consenso, lo cual es importante, porque probablemente QTL y genes candidatos en bovinos de leche son preservados para *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Palabras clave: *Bos indicus*, marcadores moleculares, STR.

DETECTION OF MICROSATELLITE ALLELE NEWS IN THE CHROMOSOME 6 IN DAIRY GYR

ABSTRACT

The objective of this study was to obtain genetic marker information and association studies for multi-allele markers in the Gyr breed. Fourteen Brazilian Gyr sire families with 657 daughters were analyzed on chromosome 6. A chromosomewise significance threshold was used, because BTA6 (*Bos Taurus* autosome-6) is known to harbor quantitative trait loci (QTL) for several milk traits. The cows and the sires were genotyped for 27 microsatellite markers and were selected from bovine chromosome 6, according to the latest MARC map reported. The markers covered 130.78 cM; average interval length was about 4.9. Map distance between the 27 markers has been estimated with the program CRIMAP. In the map distances the order of markers achieved was consistent with consensus map, and this is very important because, probably QTL and candidate genes in dairy cattle are preserved for *Bos taurus* and *Bos indicus*.

Key words: *Bos indicus*, dairy cattle, daughter design, Quantitative Trait Loci.

¹ PhD Genética y Mejoramiento Animal.
Correo electrónico: ariostoardila@lasalle.edu.co

Fecha de recepción: 9 de febrero de 2010.
Fecha de aprobación: 4 de agosto de 2010.

INTRODUCCIÓN

Estudios arqueológicos y de ADN mitocondrial prueban que los bovinos taurinos y cebuinos fueron domesticados en dos regiones diferentes y divergieron hace más de 610.000 años. Es posible verificar, como consecuencia de ese proceso, grandes diferencias entre estas subespecies, tanto para características fenotípicas como de adaptación al ambiente tropical y también a nivel genómico. El gran avance de las técnicas moleculares en los últimos años posibilitó identificar y catalogar esa diversidad genómica existente entre taurinos y cebuinos por medio de la formación de bancos de datos con información de diversos tipos de marcadores y secuencia de ADN. USDA (United States Department of Agriculture) dispone de un mapa de ligación bovino altamente saturado con informaciones sobre los marcadores (número de alelos, tamaño de los alelos y heterocigosidad). Ese mapa se basa en trabajos que utilizaron diferentes razas de bovinos, en la gran mayoría taurinas (Gelbvieh, Simmental, Piedmontese, Longhorn, Hereford y Angus), siendo utilizadas apenas dos razas índicas (Brahman y Nellore).

Tradicionalmente, pruebas de paternidad en bovinos se realizaban con el uso de marcadores moleculares convencionales (proteínas séricas, grupos sanguíneos y por el Complejo Principal de Histo-compatibilidad, MHC). Esos marcadores vienen siendo sustituidos por marcadores de ADN (RFLP, AFLP, VNTR y STR) que, entre otras ventajas, poseen un mayor polimorfismo. Entre estos últimos, los microsatélites (Short Tandem Repeats, STR) son los más empleados en investigaciones biológicas de paternidad, presentando ventajas en relación con los demás marcadores basados en PCR, porque son codominantes, fácilmente reproducibles, poseen alto polimorfismo y con mayor contenido de infor-

mación de polimorfismo (Polymorphism Information Content, PIC).

Los marcadores microsatélites denominados SSR (Simple Sequence Repeats) están constituidos de repeticiones agrupadas de 1 a 6 pares de bases, siendo que el dinucleótido (TG)_n es la repetición más abundante en mamíferos (Ellegren, 1993). De acuerdo con el mapa de varios organismos, los microsatélites son distribuidos de forma aleatoria y uniforme por todo el genoma (Chin *et al.* 1996). Estos marcadores moleculares son comunes a todos los organismos eucariotas, pudiendo ser usados en mapas de ligación. En virtud del alto polimorfismo, las regiones que presentan microsatélites pueden ser fácilmente identificadas después de amplificadas en PCR y visualizadas en gel de poliacrilamida, o genotipado en electroforesis capilar. Estos marcadores moleculares son los que más han contribuido para la elaboración de mapas de ligación en la especie bovina (Kappes *et al.* 1997), reconstrucción de relaciones filogenéticas en estudios de genética de poblaciones, pruebas de paternidad o en procesos de búsqueda de QTL (Darvasi *et al.* 1993).

Aunque los marcadores microsatélites no identifiquen marcadores ligados directamente a la producción, pueden ayudar a su localización de forma indirecta, ya que los alelos microsatélites segregan junto con los genes o *loci* que pueden estar asociados a la producción. Con la estrategia de localización de características cuantitativas por medio del uso de microsatélites en búsqueda de polimorfismos ya fue posible la localización de una serie de genes de efectos mayores (genes que tienen un gran efecto en la producción u otras características aisladamente) (Lee, 2002). El objetivo de este trabajo fue identificar un panel de microsatélites en el cromosoma 6 en la raza bovina Gyr, para pruebas de paternidad y aplicación en la selección asistida por marcadores en las razas cebuinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

FAMILIAS UTILIZADAS PARA MAPEAR LA POBLACIÓN GYR

Para el desarrollo de este trabajo fueron utilizadas 657 vacas Gyr pertenecientes al control lechero, hijas de 14 toros Gyr, de los cuales 12 fueron positivos para la prueba de progenie y los otros 2 fueron padres de toros positivos para la misma prueba. El criterio utilizado para el número de hijas por toro se basó en la existencia de muestras de ADN para las vacas hijas por toro, siendo 20 el número mínimo de hijas para ser considerada una familia. En la tabla 1 son presentadas familias, número de hijas para ser considerada una familia por toro y su respectivo porcentaje.

TABLA 1. FAMILIA DE MEDIO HERMANAS, TORO, NÚMERO DE HIJAS POR TORO Y PORCENTAJE.

Familia	Toro	Hijas	Porcentaje
1	001	127	19,3
2	129	94	14,3
3	224	68	10,4
4	293	62	9,4
5	356	59	8,9
6	416	46	7,0
7	463	34	5,2
8	498	28	4,3
9	527	28	4,3
10	556	24	3,6
11	581	23	3,5
12	605	22	3,3
13	628	22	3,3
14	651	20	3,0
Total	14	657	100

EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO CON MARCADORES MICROSATÉLITES

Las muestras necesarias para la constitución de familias fueron obtenidas de muestras de sangre (vacas

y semen (toros), colectadas en diferentes rebaños del Brasil que forman parte del PNMGL (Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro). Para la extracción del ADN se siguió el protocolo modificado de Sambrook y Russel (2001). Para la cuantificación del ADN fue usado Nanodrop y la calidad fue evaluada por la razón de absorbancia 260/280 nm.

Para el genotipado del cromosoma 6 fueron utilizados los marcadores microsatélites, escogidos del mapa consenso y disponible por MARC/USDA (Meat Animal Research Center / United States Department of Agriculture, <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>). Para la selección de los marcadores, se tuvo en cuenta su posición, número de alelos y un mínimo de 50% de heterocigosidad. Fueron seleccionados 27 marcadores microsatélites a lo largo del cromosoma 6, con distancia media entre marcadores de 4,9 cM, que fueron utilizados para genotipar 14 toros y 657 vacas, para un total de 671 animales.

Para las reacciones de PCR, fueron probadas tres concentraciones MgCl₂ (1,5 mM; 2,0 mM e 2,5 mM). También fueron probadas cinco temperaturas de anillamiento (TA) para cada primer: 50, 52, 54, 56 y 58 °C. Los productos de las amplificaciones fueron genotipados por electroforesis capilar en el equipo MegaBACE 1000 (GE Healthcare, NYSE, Germany). Los genotipos fueron analizados en el programa Fragment Profiler y los datos exportados para una planilla en Excel. Fueron definidas las condiciones óptimas de TA y MgCl₂ para cada marcador (tabla 2).

Las informaciones de frecuencia de alelos (p_i), heterocigosidad esperada (H_e) e observada (H_o) y contenido de información de polimorfismo de información (PIC) de los marcadores microsatélites fueron obtenidas utilizando el programa CERVUS versión 2.0 (Marshall *et al.*, 1998), con las siguientes ecuaciones:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j, p_i = K_i/N$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 = 2 \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^{n-1} p_i p_j$$

TABLA 2. POSICIÓN, NOMBRE DEL MARCADOR, FLUORÓFORO PARA MARCAR EL PRIMER FORWARD, CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO (MgCl₂ mM), TEMPERATURA DE LIGACIÓN DEL MAPA DEL REBAÑO GYR LECHERO DEL PNMGL (TL-P °C) DE LA EMBRAPA.

Posición (cM)	Marcador	Fluoróforo	MgCl ₂	TL-PNMGL (°C)
0,00	ILST093	FAM	1,5	52
9,02	DI4408	HEX	1,5	54
15,3	DIK5285	FAM	1,5	56
20,1	DIK4498	TAMRA	1,5	52
29,3	MNB66	FAM	1,5	54
35,39	BM1329	HEX	1,5	56
38,16	DIK1058	HEX	1,5	54
43,93	BMS2508	FAM	1,5	52
50,09	DIK4382	TAMRA	1,5	56
54,5	DIK4482	HEX	1,5	54
60,2	MNB-208	FAM	1,5	52
63,86	BM4322	FAM	1,5	54
67,4	BMS470	TAMRA	1,5	54
71,5	DIK3026	HEX	1,5	50
75,27	DIK2294	FAM	1,5	58
81,96	DIK4867	TAMRA	1,5	56
87,26	ILSTS035	FAM	1,5	54
90,5	DIK4574	FAM	1,5	52
93,8	BMS5021	TAMRA	1,5	54
96,98	AFR227	TAMRA	1,5	56
101,4	DIK2174	FAM	1,5	54
107,12	DIK4827	HEX	1,5	56
109,9	DIK2995	HEX	1,5	52
115,32	DIK1182	HEX	1,5	56
121,49	DIK2690	TAMRA	1,5	56
127,49	BM2320	TAMRA	1,5	56
130,78	DIK4992	HEX	2,0	54

En las que K_i es el número de observaciones del alelo i ($i=1, \dots, m$), N es El número total de informaciones (2n alelos), p_i y p_j son las informaciones de frecuencia de alelos. La H_o es la razón entre el número de heterocigotos y el número total de individuos.

MAPAS DE LIGACIÓN

El mapa consenso fue generado teniendo en cuenta diferentes trabajos realizados con las razas Angus, Australian Friesian, Boran, Brahman, Brangus, Charolés,

Gelbvieh, Gir, Hereford, Holandés, Indubrasil, Nelore, N'Dame, Normando, Piemontesa, Sahiwal y Simmental (Bishop *et ál.*, 1994; Barendse *et ál.*, 1994).

El mapa de ligación para el cromosoma 6 fue construido con el programa Crimap (Green *et ál.*, 1990). Éste determina la frecuencia de recombinación y el mejor orden para los marcadores en el grupo de ligación. El orden de los marcadores fue realizado teniendo en cuenta los valores mayores de Log_{10} de la máxima verosimilitud (LOD). El mapa de ligación fue determinado por el método de máxima verosimilitud y la función de mapa empleada fue la de Kosambi para transformar unidades de mapa de recombinación en centiMorgans (cM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SCORING DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES

Fueron realizados 18 117 genotipados, correspondientes a los 671 analizados, de los cuales 14 fueron toros y 657 hijas, por 27 marcadores microsatélites. Las vacas que no heredaron alelos paternos para más de 5 *loci* no fueron consideradas hijas y fueron descartadas para los análisis. Ron *et ál.* (1996) aplicaron una probabilidad mínima de 90% de paternidad sobre los marcadores para que una vaca fuera considerada hija de un determinado toro.

Fue posible identificar 286 alelos para los 27 *loci* analizados (tabla 3), dando una media de 10,6 alelos por marcador. Los *loci* DIK4574 y DIK2995 presentaron el menor número de alelos (6), y el *locus* con mayor número de alelos (21) correspondió al BM2320. El mapa consenso presentó 243 alelos en la población estudiada, lo que corresponde a un promedio de 9 alelos por marcador. Aunque para la formación del mapa consenso fueron utilizadas mayores poblaciones y razas diferentes a la raza del presente estudio, esta última presentó mayor diversidad, lo que puede ser explica-

do por una menor intensidad de selección en las razas cebuinas. Solamente 5 marcadores (18,51%) del mapa consenso presentaron mayor número de alelos que la población Gyr; 4 marcadores (14,81%) presentaron el mismo número de alelos, y 18 marcadores (66,6%) de la población en estudio presentaron mayor número de alelos que en el mapa consenso.

Los marcadores DIK5285, DIK4574 e DIK4992 presentaron igual tamaño mínimo en pares de base para la población Gyr y el mapa de referencia de MARC. El *locus* ILSTS093 presentó igual tamaño máximo en pares de base para los dos mapas. En la población Gyr, el marcador DIK3026 presentó un tamaño mínimo en pares de base, mayor que el mismo marcador en el mapa consenso (75 pb). El marcador DIK4382 del mapa MARC presentó un tamaño mínimo en pares de base mayor que el respectivo marcador en la población Gyr (161). Para el tamaño máximo en pares de base, el marcador DIK5285 en la población estudiada presentó 44 pares de base, más que el mapa consenso. Los restantes 20 *loci* presentaron diferencias en cuanto al tamaño mínimo o máximo de pares de base para las dos poblaciones, en media de 5 pares de base. Se puede concluir que fueron identificados nuevos alelos en la población Gyr en estudio, reforzando la tesis que las razas cebuinas necesitan de más estudios moleculares, de lo contrario esa diversidad genómica observada en dichas razas puede ser comprometida y reducida su confiabilidad en la utilización de marcadores moleculares para la selección asistida y en estudios de prueba de paternidad.

Fueron calculadas heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y el contenido de información polimórfica (PIC) de los 27 marcadores microsatélites (tabla 4). Estos análisis tuvieron como objeto verificar el grado de polimorfismo entre todos los 27 marcadores y en cada marcador. La media de H_o en la población Gyr Lechero fue de 0,67 y en el mapa MARC de 0,65. El marcador que presentó mayor H_o

en la población Gyr Lechero fue DIK2294 (0,848), y el menor fue el *locus* MBS5021 (0,348). Según Ott (1992), un *locus* es considerado polimórfico si H_o fue superior a 0,1 y altamente polimórfico si H_o fue superior a 0,7. En la población estudiada, 11 *loci* fueron altamente polimórficos y 16 fueron polimórficos. La media del contenido de información polimórfica (PIC) en la población Gyr fue de 0,6472,

considerada altamente polimórfica. Según Botstein *et ál.* (1980), un PIC superior a 0,5 es considerado altamente polimórfico, entre 0,25 y 0,5 moderadamente polimórfico, y menor que 0,25 es considerado poco polimórfico. El marcador que presentó mayor PIC fue DIK2294 (0,848) y el menor PIC fue DIK4574 (0,372). El PIC es un índice que sirve, también, para determinar el grado de polimorfismo de un *locus*.

TABLA 3. Locus, NÚMERO DE ALELOS, TAMAÑO MÍNIMO Y MÁXIMO EN PARES DE BASE (PB), EN LOS MAPAS MARC Y EL OBTENIDO DEL PNMGL.

Locus	MARC			PNMGL		
	N.º Ale.	Mínimo (pb)	Máximo (pb)	N.º Ale.	Mínimo (pb)	Máximo (pb)
ILSTS093	21	179	202	9	172	202
DIK4408	9	182	201	12	185	203
DIK5285	7	185	201	17	185	245
DIK4498	8	202	218	8	204	220
MNB-66	11	182	202	12	181	206
BM1329	9	137	161	11	145	169
DIK1058	7	131	157	8	134	162
BMS2508	9	87	111	8	86	115
DIK4382	10	188	380	14	349	387
DIK4482	7	179	199	8	173	197
MNB-208	7	131	153	9	133	155
BM4322	6	165	187	12	149	185
BMS470	9	59	85	9	64	87
DIK3026	9	338	364	9	263	363
DIK2294	10	189	217	17	195	214
DIK4867	7	217	232	8	213	228
ILSTS035	19	208	266	18	214	274
DIK4574	10	191	215	6	191	221
BMS5021	8	176	190	11	161	191
AFR227	11	96	120	11	80	116
DIK2174	5	228	242	8	234	250
DIK4827	7	189	210	10	177	205
DIK2995	5	207	221	6	205	217
DIK1182	14	298	333	9	301	336
DIK2690	4	213	221	8	205	223
BM2320	10	128	152	21	122	158
DIK4992	4	201	207	7	201	213

TABLA 4. Locus, HETEROZIGOSIDAD OBSERVADA (Ho), HETEROZIGOSIDAD ESPERADA (He), CONTENIDO DE INFORMACIÓN DE POLIMORFISMO (PIC) Y PORCENTAJE DE FALLAS (%F) PARA LOS 27 MARCADORES MICROSATÉLITES ANALIZADOS EN LA POBLACIÓN GYR LECHERO DEL PNMGL.

<i>Locus</i>	Ho	He	PIC	% F
ILSTS093	0,765	0,703	0,675	3,08
DIK4408	0,796	0,800	0,776	3,23
DIK5285	0,785	0,772	0,745	2,46
DIK4498	0,461	0,469	0,390	2,92
MNB-66	0,863	0,843	0,822	2,46
BM1329	0,552	0,640	0,602	4,006
DIK1058	0,748	0,740	0,705	4,93
BMS2508	0,684	0,745	0,703	2,62
DIK4382	0,840	0,852	0,834	8,16
DIK4482	0,605	0,581	0,503	2,62
MNB-208	0,815	0,773	0,740	2,16
BM4322	0,519	0,555	0,479	5,55
BMS470	0,658	0,668	0,610	0,77
DIK3026	0,605	0,591	0,560	11,24
DIK2294	0,848	0,888	0,877	2,31
DIK4867	0,667	0,674	0,623	0,61
ILSTS035	0,820	0,779	0,752	3,23
DIK4574	0,493	0,465	0,372	0,924
BMS5021	0,348	0,560	0,505	3,235
AFR227	0,635	0,668	0,605	1,54
DIK2174	0,689	0,682	0,635	2,31
DIK4827	0,705	0,718	0,665	2,77
DIK2995	0,579	0,649	0,578	6,78
DIK1182	0,639	0,718	0,694	4,77
DIK2690	0,718	0,678	0,619	4,93
BM2320	0,632	0,870	0,856	8,01
DIK4992	0,651	0,610	0,549	2,31

En poblaciones en que el genotipo de los parentales es variable, las familias a ser genotipadas pueden ser escogidas basándose en la heterozigosidad de los marcadores, pues cuando un marcador presenta gran número de alelos, los valores del PIC son semejantes a He y, a medida que el número de alelos aumenta, el PIC y la heterozigosidad aumentan (Liu, 1998).

Los marcadores BM1329, BMS5021 y BM2320 presentaron frecuencias de alelos nulos de 0,07, 0,24 y 0,16, respectivamente. La frecuencia de alelos nulos que segrega en cada *locus* es calculada por medio de un algoritmo interactivo basado en la diferencia entre la frecuencia observada y la frecuencia esperada de homocigotos. El alelo nulo puede ser cualquier

alelo que no es identificado por el genotipado que sucede por causa de mutaciones en lugar de ligación en un o en los dos *primers*. Los *locus* con frecuencia de alelos nulos mayores o igual a 0,05 son considerados con frecuencias altas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barendse, W., Armitage, S., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H., Nan, Z., Grosse, M., Creighton, P., McCarthy, F., Ron, M., Soller, M., Fries, R., Macgraw, R., Moore, S., Teale, A., Georges, M., Womack, J. y Hetzel, D. (1994). A preliminary map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6, 227-235.
- Bishop, M., Kappes, S., Keele, J., Stone, R., Sunden, S., Hawkins, G., Solinas Toldo, S., Fries, R., Cross, M., Yoo, J. y Beattie, C. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136, 619-625.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. y Davis, R. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Chin, E., Senior, M., Shu, H. y Smith, J.. (1996). Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome*, 39, 866-873.
- Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V. et al. (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using saturated genetic map. *Genetics*, 3(134), 943-51.
- Ellegren, H. (1993). *Genome analysis with microsatellites markers*. Suecia: Department of Animal Breeding and Genetics. Swedish University of Agriculture Science.
- Green, P., Falls, K. y Crooks, S. (1990). *Crimap documentation version 2.4*. San Luis: Washington University School of Medicine.
- Kappes, S., Keele, J., Stone, R. et al. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7, 36-38.
- Lee, H., Dekkers, J., Soller, M. et al. (2002). Application of the false discovery rate to quantitative trait loci interval mapping with multiple traits. *Genetics*, 2(61), 905-914.
- Liu, B. (1998). *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analyses*: CRC Press.
- Marshall, T., Slate, J., Kruuk, L. y Pemberton, J. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural population. *Molecular Ecology*, 7, 639-655.
- Ott, J. (1992). Strategies for characterization highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, 51, 283-290.
- Ron, M., Blank, Y., Band, M., Ezra, E. y Weller, J. (1996). Misidentification rate in Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal Dairy Science*, 79, 676-681.
- Sambrook y Russell. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Tercera edición.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que aquellos marcadores con alta heterocigosidad y contenido de información polimórfica pueden ser seleccionados para estudios que impliquen detección de QTL, genealogías, identidad genética y prueba de paternidad para la raza Gyr Lechero o para otras razas cebuinas.