

Caracterización genética de la raza bovina Canaria utilizando microsatélites: estudio preliminar

M. Zamora¹, R. Ginés¹, J. M Afonso¹, M. Reig², L. García³ y M. J Zamorano¹

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria,
Dptos. de Patología y Producción Animal, Unidad de Producción Animal. España

Genetic characterization of the Canaria bovine breed using microsatellites: preliminary study

ABSTRACT: Two subpopulations located in the islands of Gran Canaria and Tenerife were studied genetically. Six microsatellite markers have been analyzed in a total of 35 individuals distributed in different nonrelated herds. All the analyzed markers were polymorphic, the number of alleles varied between two and eleven per locus. The variability, heterozygosity per locus and overall estimated by mean of calculation the allelic frequencies. These results are indicative of the genetic variability present; although it is indispensable to enlarge the number of loci studied to define with more the purpose of defining with more precision the situation of the breed.

Key words: Genetic resources, PCR, Heterozygosity, Microsatellites, Cattle, Autochthonous breeds.

© 2004 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2004. Vol. 12 (Supl. 1): 12-15

RESUMEN: Se ha realizado un estudio genético preliminar en dos subpoblaciones de la raza bovina Canaria, ubicadas en las islas de Gran Canaria y Tenerife. Se han analizado 6 marcadores microsatélites en un total de 35 individuos distribuidos en diferentes ganaderías no relacionadas. Todos los marcadores analizados han presentado polimorfismo, variando el número de alelos entre 2 y 11. La estima de la variabilidad se ha realizado mediante el cálculo de frecuencias génicas lo que ha permitido calcular los parámetros de heterocigosis por *locus* y la heterocigosis media. Los resultados muestran la variabilidad genética existente en esta raza, si bien resulta imprescindible ampliar el número de *loci* con el fin de definir con mayor precisión la situación de la raza.

Palabras clave: Recursos genéticos, PCR, Heterocigidad, Microsatelites, Bovino, Razas autóctonas.

Introducción

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de animales domésticos es de gran importancia para la conservación y mejora de esos recursos genéticos. La raza bovina canaria parece tener su origen sujeto a la llegada de animales con destino hacia América procedentes de los principales puertos peninsulares, ubicados en el Norte y Sur de la Península Ibérica. Así, el catálogo de razas autóctonas bovinas españolas contempla que los núcleos fundacionales posiblemente se corresponden, por un lado, a los bovinos rojos andaluces, y por otro lado, y atendiendo a su caracterización morfológica actual, al tronco castaño o rubio del norte peninsular (M.A.P.A., 1986).

Actualmente la raza Bovina Canaria mediante la resolución 440 del 2 de diciembre de 1999 de la Dirección General de Ganadería del Gobierno de Canarias cuenta de forma reconocida con una Asociación de Criadores de

Ganado de Raza Basta de la Tierra Canaria. La denominación de "Basta" fue propuesto por los propios ganaderos, para diferenciarla del "fino" o del "extranjero", como son denominadas por los productores las razas introducidas más recientemente. Las acciones pioneras a la constitución de la asociación datan de 1990, cuando un pequeño grupo de ganaderos de Tenerife constituyeron la Asociación Canaria Cultural Deportiva de Arrastre, Fomento y Crianza de Ganado Basto (Fresno *et al.*, 1998). Gracias al esfuerzo e ilusión de aquellos que lo iniciaron, se frenó la drástica reducción de efectivos que la raza venía sufriendo, situándose en la actualidad en unos 2000 ejemplares adultos. Esto se consiguió al promover la utilización de la raza hacia, quizá, la única aptitud en la que no iba a tener competidora con otras razas foráneas, la aptitud "folklore", ya sea en la forma de competiciones de deportes autóctonos como el arrastre de ganado o bien de otros eventos culturales muy arraigados como las romerías o ferias

¹Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria, Dptos. de Patología y Producción Animal, Unidad de Producción Animal. Trasmontaña s/n. 35416, Arucas. Las Palmas, España. Correo E. mzamorano@dpat.ulpgc.es

²Servicio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Cabildo de Tenerife

³Asociación Canaria de Arrastre. Gran Canaria, España

ganaderas bajo formato de exposición. En la actualidad, la Asociación de Criadores se encuentra preparando la reglamentación del libro genealógico. El objetivo del presente trabajo es caracterizar una muestra de ejemplares de esta raza con un panel de microsátelites, calcular la frecuencia alélica, y heterocigosidad por *locus* y media.

Materiales y Métodos

El material animal, consistió en una muestra de 35 individuos pertenecientes a dos subpoblaciones de la raza bovina Canaria geográficamente distantes. Una de ellas representada por cuatro núcleos en Tenerife, y la otra perteneciente a la isla de Gran Canaria representada por siete núcleos. Se obtuvieron muestras de pelo de cada animal de las que se extrajo el DNA. La extracción de DNA se realizó mediante la digestión con Proteinasa K, seguida de una absorción de iones del tampón mediante el empleo de la resina Chelex-100^o. Se amplificó un total de 6 microsátelites mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1985). El panel de marcadores que se escogió se encuentra dentro de los propuestos por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para la preparación del proyecto MoDAD de la FAO (Cuadro 1).

La preparación de la PCR se realizó en un volumen final de 25 ml, en un tampón 100 mM KCl, 20 mM Tris-ClH pH 8,0; 0,5% Tween-20, 1 mM MDTT, 0,1 EDTA, 50% glicerol, con dNTPs 0,2 mM cada uno, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmoles de cada cebador, 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa y 1 ml de DNA obtenido de la extracción de 4 folículos pilosos. La reacción se sometió a ciclos de tiempo y temperatura: un ciclo de desnaturalización de 4 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55 ó 60°C (dependiendo del microsátelite) y 30 s a 72°C (para todos igual) y, finalmente, un ciclo de extensión de 10 min a 72°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (19:1) desnaturalizante (Urea 8M) de los productos de la amplificación, y se reveló el gel con plata según el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio modificando el Silver SequenceTM DNA sequencing system de Promega[®].

Se calculó el tamaño de los alelos mediante el ajuste a una curva de regresión desarrollada a partir de las distancias de migración de fragmentos de talla conocida. La frecuencia alélica se calculó mediante el recuento directo de los alelos, y como medida de la variabilidad se calculó también el grado de heterocigosidad por *locus*, mediante la fórmula propuesta por Nei y Roychoudhry (1974).

Resultados y Discusión

En el Cuadro 2 se recoge el número de alelos por locus en seis microsátelites en las dos muestras de la raza bovina Canaria, en el Cuadro 3 la frecuencia alélica obtenida para los diferentes marcadores en el total de la población, y en el Cuadro 4 la heterocigosidad por marcador. Se observa polimorfismo en todos los casos. El número de alelos varió de 2 para el marcador ILSTS005 a 11 para BM-143. El número de alelos presentes en las dos poblaciones independientemente puede considerarse elevado, diferenciándose tan sólo en los tres marcadores ETH152, BM462 y HEL5 en los que la muestra de Gran Canaria posee un alelo más que la muestra de Tenerife. Destacan los 11 alelos y la heterocigosidad del microsátelite BM143. Esto se debe a que los sistemas más informativos son aquellos que tienen un mayor número de alelos y sus frecuencias más equilibradas. Algo similar ocurre, en el extremo opuesto, para el sistema ILSTS005.

En el Cuadro 4 figuran los valores de la heterocigosidad por *locus* que varían de 0,49 en ILSTS005 a 0,85 en BM143. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Machugh *et al.* (1994) que estudiaron la variabilidad genética entre varias poblaciones bovinas mediante algunos marcadores microsátelites, hallando valores de heterocigosidad comprendidos entre 0,8 para el marcador ETH225 en la raza Frisian (n=40) y 0,55 para el marcador ETH152 en la raza Simmental (n=36). La heterocigosidad estimada para el marcador ETH225 resulta elevada siendo superior su valor al descrito en razas belgas así como en la raza española Berrenda en Negro (Zamorano *et al.*, 1998). La heterocigosidad media en el total de la muestra resultó ser

Cuadro 1. Microsátelites de ganado bovino

Denominación	Cebadores directo y reverso (5'-3')	Tamaño	Referencias
BM4621.....	{ CAAATTGACTTATCCTTGGCTG TGTAACATATGGGCTGCATC	140-160	Bishop <i>et al.</i> (1994)
BM143.....	{ ACCTGGGAAGCCTCCATATC CTGCAGGCAGATTCTTTATCG	90-120	Bishop <i>et al.</i> (1994)
ETH152.....	{ TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	198-204	Fries <i>et al.</i> (1993)
ETH225.....	{ GATCACCTTGCCACTATTTCTT ACATGACAGCCAGCTGCTGCTACT	140-156	Fries <i>et al.</i> (1993)
HEL5.....	{ GCAGGATCACTTGTAGGGA AGACGTTAGTGACATTAAC	161	Kaukinen <i>et al.</i> (1993)
ILSTS005.....	{ GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	181-187	Brezinsky <i>et al.</i> (1993)

Cuadro 2. Alelos por *locus* y localidad en seis microsatélites de la raza bovina Canaria

Locus	Localidad		Total
	Gran Canaria	Tenerife	
BM4621	7	6	9
BM143	8	8	11
ETH152	5	4	5
ETH225	7	7	8
HEL5	5	4	5
ILSTS005	2	2	2

La información que este tipo de marcadores proporcionan en estudios de genética de poblaciones, como propone la FAO (1996) resulta de gran interés tanto en poblaciones de razas autóctonas que puedan encontrarse en peligro de extinción como en poblaciones altamente seleccionadas (Del Bo *et al.*, 2001). Si bien hay que considerar cual es el número de marcadores apropiado para este tipo de estudios, que según el programa global de mantenimiento de los recursos genéticos, MoDAD, cifra en 25 microsatélites, cualquier información que poseamos sobre nuestras razas puede ser de gran valor para abordar futuras actuaciones de conservación o mantenimiento de la diversidad genética.

Cuadro 3. Alelo (A) y frecuencia relativa (f) por microsatélite en la raza bovina Canaria

BM4621		BM143		ETH152		ETH225		HEL5		ILSTS005	
A	f	A	f	A	f	A	f	A	f	A	f
136	0,03	93	0,01	196	0,16	139	0,01	150	0,20	183	0,44
140	0,03	99	0,03	198	0,47	141	0,10	152	0,06	185	0,56
142	0,03	103	0,20	200	0,24	143	0,03	160	0,28	-	-
144	0,24	105	0,26	202	0,10	145	0,06	162	0,30	-	-
146	0,17	107	0,01	204	0,03	147	0,23	164	0,16	-	-
148	0,17	109	0,03	-	-	149	0,31	-	-	-	-
156	0,01	113	0,16	-	-	151	0,24	-	-	-	-
158	0,01	115	0,17	-	-	153	0,01	-	-	-	-
160	0,04	117	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	119	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	123	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 4. Heterocigosis promedio global, por *locus* y localidad en seis microsatélites de la raza bovina Canaria

Locus	Localidad		Total
	Gran Canaria	Tenerife	
n	19	16	35
BM4621	0,79	0,80	0,80
BM143	0,85	0,80	0,85
ETH152	0,68	0,59	0,68
ETH225	0,77	0,87	0,84
HEL5	0,76	0,62	0,76
ILSTS005	0,49	0,50	0,49

de 0,74, la cual coincide con los valores que Moazami-Goudarzi *et al.* (1997) obtuvieron en un total de 17 marcadores microsatélites en 10 razas bovinas europeas. Por otro lado resulta superior al valor descrito por Del Bo *et al.* (2001) en un total de 13 razas europeas del área alpina y a la heterocigosis media estimada por Zamorano *et al.* (1998) en la raza española Berrenda en Negro.

Conclusiones

La variabilidad genética estimada para los marcadores micro satélites aquí tipificados permiten señalar que la población es bastante polimórfica, debiéndose completar el estudio con mayor número de marcadores que permitan definir con más precisión el estado actual de la raza bovina Canaria.

Literatura Citada

- Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. F. Sunden and H. A. Gregory. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136:619 - 639.
- Brezinsky, L., S. J. Kemp and A. J. Teale. 1993. ILSTS005: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics* 24:73.
- Del Bo, L., M. Polli, M. Longeri, G. Ceriotti, C. Loofi, A. Barre-Dirie, G. Dolf and M. Zanotti. 2001. Genetic diversity among some cattle breeds in the Alpine area. *J. Anim. Breed. Genet.* 118: 317-325.
- Devendra C. (ed). 1996. Proceedings of IGA/FAO round table on the global management of small ruminant genetic resources. FAO.
- Fresno M., M. Reig, P. Molina, J. V. Delgado, A. Molina, N. Darmanin y M. Lorenzo. 1998. Programa de conservación del ganado vacuno canario. *Archivos de Zootecnia* 47: 565-569.
- 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
- 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.
- M.A.P.A. 1986. Catálogo de razas autóctonas españolas II. Especie bovina. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Dirección General de la Producción Agraria.
- 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.
- Nei, M. and A. K. Roychoudhry. 1974. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379-390.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi and G. T. Horn, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Zamorano, M.J., J. Ruiter, A. Rodero y J.L. Vega-Pla. 1998. Análisis genético de marcadores microsatélites en dos poblaciones de la raza bovina Berrenda en Negro. *Archivos de Zootecnia* 47: 195-200.