



AVANCES EN LA TIPIFICACION DE DNA EN BOVINOS EN UNA MUESTRA DE POBLACION CRUZA HEREFORD DEL URUGUAY

Kelly L¹.; Solares E¹.; Cardozo O¹;
Aguerre V¹.; Capdevielle F¹.
I INIA-LB.

RESUMEN

Los avances de la secuenciación del genoma bovino permite disponer de miles de marcadores moleculares, como los microsatélites (MS), con los cuales se realiza la tipificación de DNA. Estos marcadores han permitido resolver casos de paternidad discutida con una probabilidad cercana al 100%, además de tener otras aplicaciones: servicios colectivos, mapeo génico, identificación individual, trazabilidad, selección asistida por marcadores para características de interés económico. Los objetivos del presente trabajo son estimar las frecuencias génicas de los MS seleccionados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) en una muestra de una población de bovinos Hereford cruce, con el fin de estudiar el polimorfismo de los mismos. La muestra corresponde a 15 individuos cruce Hereford pertenecientes al rodeo de la Estación Experimental INIA-Las Brujas. Se concluye que se estandarizó la técnica de tipificación de ADN bovino a partir de muestras de pelo y se observaron altos niveles de polimorfismo ya que 7 de 11 MS (TGLA227, BM2113, ETH10, SPS115, TGLA126, ETH225, BM1824) presentaron un alto valor del IH (Índice de Heterocigosidad) (mayor a 0,7), siendo estos los más informativos para esta población en estudios de paternidad, identidad y trazabilidad.

SUMMARY

With the advances of bovine genome project, thousands of molecular markers become available for research and different applications. Microsatellites (STRs) (DNA testing) are the most used to solve paternity cases, as well as genetic mapping, identification, traceability, marker assisted selection. The objective of this report are is to calculate gen frequencies of some STR (ISAG) in a bovine a Hereford population sample and its polymorphism. This sample includes about 15 animals from INIA-Las Brujas. We adjusted a bovine DNA typing system from hair sample. We observed a good polymorphism although it was a small sample. Seven of the 11 STRs (TGLA227, BM2113, ETH10, SPS115, TGLA126, ETH225, BM1824) show a high IH (higher than 0,7), so we conclude that they most informative to application (paternity cases, identification, traceability, etc).

INTRODUCCION

Tradicionalmente la tipificación de los grupos sanguíneos a partir de muestras de sangre se ha utilizado para la identificación individual y el diagnóstico de paternidad.

Sin embargo, los animales estrechamente emparentados comparten alelos comunes y por tanto en muchos casos son difíciles de diferenciar con este tipo de Marcadores sanguíneos, además de tener pocos grupos sanguíneos altamente polimórficos, lo que impide resolver casos complejos. Como resultado de las investigaciones internacionales en mapeo genético animal actualmente se dispone de diferentes tipos de marcadores moleculares ampliamente distribuidos en el genoma denominados microsatélites (MS) mediante los cuales se hace tipificación de ADN y han permitido resolver casos de paternidad con una probabilidad cercana a la unidad (pruebas de inclusión). Estos MS tiene las siguientes ventajas: loci genéticos altamente polimórficos, estar dispersos en el genoma, herencia mendeliana simple y alelos de tipo codominantes y poder analizarse a partir de cualquier tipo de muestras (semen, pelo etc), automatizables (Bates y col. 2002). Estas técnicas son chequeadas bianualmente por el ISAG (www.isag.org.uk) que se encarga a nivel internacional de coordinar los distintos laboratorios para estandarizar protocolos, nomenclaturas y tipos de MS, permitiendo que los resultados obtenidos por distintos investigadores sean comparables entre diferentes países.

Dentro de sus aplicaciones tenemos que permiten avalar el pedigree mediante el diagnóstico de paternidad, mapeo génico, identificación individual, trazabilidad de productos orgánicos, selección asistida por marcadores para características de interés económico (Kelly, 2002). Los objetivos del presente trabajo es estimar las frecuencias génicas de los microsatélites seleccionados por el ISAG para diagnóstico de paternidad, en una muestra de una población de bovinos Hereford cruce, con el fin de estudiar cuales es el polimorfismo de los mismos y que por lo tanto aporten mayor información para sus diferentes aplicaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra utilizada estuvo constituida por 15 terneros (10 meses) cruce de las razas Hereford provenientes de Cerro Colorado y que pertenece a un FPTA que se encuentra en un marco de un convenio entre el INIA-Las Brujas y la Comisión Nacional de Fomento rural para realizar varios estudios (cría de terneros bolita, trazabilidad con chips, etc). De estos animales se extrajo sangre de la yugular a un 10% (15) con anticoagulante (EDTA) y se extrajeron mechones de pelo con folículos del rabo. Además de nuestro objetivo es hacer un estudio que avale la trazabilidad de los chips con ADN y poner a punto la técnica de extracción de DNA de pelo. La extracción de DNA de pelo se realizó con chelex 100 al 5% a partir de 10 pelos según la técnica de Walsh y col. 1991 con modificaciones. Se analizaron 11 MS comerciales en un multiplex y marcados con fluorocromos del kit



«StockMark» para diagnóstico de paternidad bovina (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA.). El kit contiene los siguientes reactivos: Buffer de PCR, dNTPs, AmpliTaq Gold DNA polimerasa y una mezcla de los 22 cebadores de los 11 MS de la tabla 1. El volumen final de la amplificación fue de 15ul. Luego se separación de fragmentos amplificados en un secuenciador ABI 310, siendo analizados por los programas GeneScan y Genotyper e interpretándose con un control del ISAG. Los análisis estadísticos consistieron en conteo de genes

y la estimación de la frecuencia génica y a partir de ella se calculo el Índice de Heterocigosidad usando la siguiente formula para el calculo del polimorfismo de cada MS: $IH: 1 - \sum p^2$ (Guerin y Meriaux, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 2 se muestran los alelos con sus frecuencias génicas y en la tabla 3 el Nº de alelos y el IH para cada MS

Tabla 1: Cebadores: F: Forward, R: Reverse de los 11 MS bovinos del Kit.

MS	Cebadores
BM1824	F:GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC; R: CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
BM2113	F: GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC; R:CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
INRA023	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC; R:TAACTACAGGGT GTT AGA TGA ACT C
ETH10	F: GTTCAGGACTGG CCC TGC TAA CA; R: CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH225	F:GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T; R: ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
SPS115	F: AAA GTG ACA CAA CAG CTTCTCCAG; R: AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
TGLA122	F: CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC; R: AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA
TGLA126	F:CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGCTTCT; R :TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC
TGLA227	F:CGA ATTCCAAATCTGTTAATTTGCT;R:ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA
TGLA53	F: GCTTTTCAAGA AATAGTTTGCAT TCA; R: ATC TTC ACA TGA TAT TAC AGC AGA
ETH3	F: GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G; R: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G

Tabla 2. Frecuencias génicas de los 11 MS.

MS	Alelos pb*	Fr. Génica	MS	Alelos pb*	Fr. Génica	MS	Alelos pb*	Fr. Génica
TGLA 227	82	0,346	BM2113	130	0,285	TGLA53	151	0,066
	84	0,038		132	0,285		157	0,600
	88	0,076		134	0,107		161	0,066
	90	0,307		136	0,107		165	0,033
	92	0,192		138	0,214		169	0,200
	94	0,038					173	0,033
ETH 10	214	0,500	SPS115	242	0,285	TGLA 126	110	0,454
	216	0,312		246	0,214		118	0,090
	218	0,187		248	0,071		122	0,227
				250	0,071		104	0,045
				252	0,071		124	0,045
		254	0,285	114	0,090			
				116	0,045			
TGLA 122	138	0,208	INRA23	205	0,107	ETH3	110	0,033
	140	0,500		207	0,107		112	0,066
	170	0,083		213	0,714		114	0,566
	160	0,041		215	0,071		116	0,333
	162	0,041						
	184	0,041						
	148	0,041						
150	0,041							
ETH 225	138	0,066	BM1824	179	0,250			
	142	0,200		180	0,071			
	144	0,133		181	0,071			
	140	0,133		183	0,357			
	134	0,433		189	0,214			
	132	0,033		191	0,035			

*peso molecular medido en pares de bases de DNA.



Tabla 3: N° alelos de los MS y sus respectivos Índices de Heterocigosidad (IH).

MS	TGLA 227	BM 2113	TGLA 53	ETH 10	SPS 115	TGLA 126	TGLA 122	INRA 23	ETH3	ETH 225	BM 1824
N°alelos	6	5	6	3	6	7	8	4	4	6	6
IH	0,811	0,768	0,589	0,867	0,775	0,719	0,691	0,462	0,562	0,731	0,752

Como podemos observar en las tablas los alelos varían de 3 a 8 alelos, siendo su promedio de: 5,54, lo cual es bastante alta para una muestra pequeña, ya que si lo comparamos con otros resultados (Bates y col,2002) de la raza Hereford (N=49) de 4 MS en común (TGLA) para ambos estudios el promedio es de 6,75. Con respecto al IH tenemos que 7 MS (TGLA227, BM2113, ETH10, SPS115, TGLA126, ETH225, BM1824) tendrían un alto valor (mayor a 0,7), los cuales serían los más informativos para esta población en estudios de paternidad, identidad y trazabilidad. Además podemos observar que si bien el IH depende del N° de alelos también dependen de la distribución de sus frecuencias, por ejemplo el TGLA53 con 6 alelos presenta un bajo IH (0,589, tabla 3).

CONCLUSIONES

1.- Se concluye que se estandarizó la técnica de tipificación de ADN bovino a partir de muestras de pelo.
2.- Se observaron altos niveles de polimorfismo ya que 7 de 11 MS (TGLA227, BM2113, ETH10, SPS115, TGLA126, ETH225, BM1824) presentaron un alto valor del IH (Índice de Heterocigosidad) (mayor a 0,7), siendo estos los más informativos para esta población en estudios de paternidad, identidad y trazabilidad.

AGRADECIMIENTOS

al Sr. Sergio Rozas y a la Lic. ,Msc. María Teresa Federici.

BIBLIOGRAFIA

Bates S.; Peterson-Knabe C.; Hala T.; Van Haeringen H.; Lange K., Ziegler K., Heyen D.; Da Y.; Lewin H. Exclusion Probability of 22 Bovine Microsatellites Markers in Fluorescent Multiplexes for Automated Parentage Verification. PE Applied Biosystems. 2002.
Guerin G. y Meriaux J.C. 1989 La distribution des marqueurs sanguins dans les races equines- Analyse sur un echantillon de Pur.sang, Trotteur Francais et Sele Francais. 12^o Journal D'etude. CEREOPA.
Kelly L. 2002. «Diagnóstico de Paternidad. Metodologías, estrategias. Exclusion de Paternidad. Técnicas moleculares. Secuenciador automático.» «Caracterización genética de los equinos Criollos del Uruguay y su relación con otras razas.» CD del Curso de Posgrado de Veterinaria-PEDECIBA: Aplicación de la genética molecular en producción, sanidad y reproducción animal. Fac. de Veterinaria. UDELAR Pag. 97-103 y Pag. 57-63.
Walsh P.S.; Metzger D.A.; Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA por PCR based typing from forensic material. Biotechniques. 10(4). 1991.