

Variabilidad de un microsatélite (ZARA12) asociado a la Lactoferrina en distintas razas bovinas españolas.

I. Martín Burriel, J.H. Calvo, R. Osta y P. Zaragoza

Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos.

Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177, 50.013 Zaragoza

Introducción

La detección de QTLs (Quantitative Trait Loci) es la búsqueda, a través de marcadores genéticos, de los loci responsables de caracteres productivos y resistencia a enfermedades. El material básico para la localización de QTLs ha sido el desarrollo de marcadores altamente polimórficos como son los microsatélites. Así, algunos alelos de estos marcadores han sido asociados a determinados alelos de genes mayores como el del Halontano en porcino (Vögeli y cols., 1994) o a las caseínas en bovino (Leveziel y cols., 1994).

Actualmente, muchos grupos en todo el mundo están centrando su investigación en la búsqueda de QTLs. Los diseños desarrollados para su localización registran datos de producción de leche, de carne, conformación, fertilidad y resistencia a enfermedades como la mastitis, entre otros (Gomez-Raya y cols., 1996).

La Lactoferrina es una glicoproteína que se une al hierro y está presente en muchas secreciones de mamíferos, especialmente en leche. Esta proteína podría servir como un regulador especializado del metabolismo del hierro en situaciones donde la Transferrina es incapaz de actuar. Esto junto a su posible efecto en interacciones celulares, podrían explicar la variedad de efectos que se le han atribuido en relación a infecciones y la respuesta inmune, si bien sólo existen hipótesis sobre su mecanismo de acción (Brock y cols., 1993).

La posible acción antibiótica de la Lactoferrina durante la inflamación hace que este gen haya sido propuesto como candidato para el incremento de la resistencia contra infecciones de la glándula mamaria, especialmente en la producción de vacuno de leche (Seyfert y cols., 1994). En este trabajo presentamos el estudio del polimorfismo de un marcador microsatélite localizado en el intrón 6 de la Lactoferrina (Osta y cols., 1996) en distintas razas autóctonas bovinas.

Material y Métodos

Para la amplificación del microsatélite ZARA12 los oligonucleótidos utilizados han sido:

5'- GATTCAAGCTGAGGCATTCC-3' y 5'-CCAAAGTGGCCAATTTGAC- 3'.

La reacción de PCR se ha desarrollado en un volumen total de 10 µl que contenía:

20-30 ng de DNA genómico bovino, cada uno de los primers a una concentración 0.5 mM y uno de ellos marcado con ^{32}P a 0.04 mM, cada dNTP a 0.1 mM y tampón de la taq a concentración 1x conteniendo MgCl_2 a 1.5 mM y 0,5 unidades de Taq polimerasa. En cuanto a las condiciones de amplificación, se realizó un PCR estándar, utilizando como temperatura de unión de los primers 60°C. El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y su polimorfismo se visualizó en autoradiografía.

La variabilidad de este microsatélite se ha estudiado en 7 razas autóctonas de vacuno español. Se han analizado 50 animales de las razas Pirenaica, Rubia Gallega, Asturiana de los Valles y Menorquina; 22 de Asturiana de las Montañas; 10 de Avileña y 47 de Toro de Lidia.

Se han calculado las frecuencias génicas, PIC y Heterocigosidad en cada raza y el Equilibrio de Hardy Weinberg.

Resultados y Discusion

Se ha amplificado un fragmento de 164 pb del gen de la Lactoferrina que contiene la repetición de Adeninas (A₁₇). Bajo las condiciones de nuestro estudio se han detectado un total de 5 alelos en el conjunto de los animales analizados, el tamaño de los mismos varía entre 160 pb y 165 pb. La técnica utilizada proporciona la suficiente resolución como para distinguir alelos que difieren en una única base.

La Tabla 1 muestra las frecuencias alélicas obtenidas en las distintas razas. Aunque las razas Pirenaica y Asturiana de las Montañas han mostrado el mayor número de alelos (4), es en la raza de Lidia, con 3 alelos, en el que encontramos una tasa de Heterocigosidad esperada mayor (0.622). Los valores de PIC varían entre 0.286 en la raza Asturiana de las Montañas y 0.554 en la de Lidia. Todas las poblaciones han mostrado equilibrio genético para este marcador (datos no expuestos).

Tabla 1: Frecuencias alélicas, Heterocigosidad y PIC en las distintas poblaciones:

Alelos	Piren.	As.Vall	As.Mont	Rubia	Avileña	Menorq	T. Lidia
160pb	--	--	0.058	--	--	--	--
161pb	0.260	0.250	0.143	0.221	--	0.439	0.181
162pb	0.702	0.728	0.810	0.615	0.750	0.561	0.479
163pb	0.010	--	--	--	--	--	--
165pb	0.029	0.022	0.048	0.106	0.250	--	0.340
Het. Obs	0.365	0.370	0.286	0.577	0.500	0.510	0.511
Het. Esp	0.439	0.407	0.322	0.558	0.375	0.493	0.622
PIC	0.372	0.340	0.286	0.517	0.305	0.371	0.554

En cuanto a los valores de frecuencias génicas obtenidos, se podría destacar como el alelo de 162 pb aparece como el alelo más frecuente en todas las poblaciones, si bien en las razas Menorquina y Toro de Lidia presenta frecuencias intermedias. También observamos como el alelo con una talla de 165 pb aparece con mayores frecuencias en la de Lidia y Avileña.

La gran variabilidad que muestra el microsatélite ZARA12 y su asociación con la Lactoferrina, hacen de él un marcador de elección para el estudio de cualquier posible relación con resistencia a infecciones y por tanto, candidato a ser incorporado en los proyectos de localización de QTLs.

Bibliografía

- Brock, J.H., Ismail, M., Sánchez, L., Oria, R. y Calvo, M. (1993). The role of lactoferrin in infection, immunity and inflammation. En *New Perspectives in Infant Nutrition*. Thieme Medical Publisher, Inc. New York
- Gómez-Raya, L., Våge, D.I., Olsaker, I., Klunghand, H., Klemetsdal, G., Heringstad, B., Lie, Ø., Rønningen, K., Ruane, J. y Lien, S. (1996). Mapping QTL affecting Traits of Economical Importance un Norwegian Cattle. Proc. 47th Annual Meeting of the European Asociation of Animal Production, 15-29 Agosto Lillehammer.
- Leveziel, H., Rodellar, C., Leroux, C., Pepin, L., Grohs, C., Vaiman, D., Mahé, M.F., Martin, P y Grosclaude, F. (1994). A microsatellite within the bovine k-casein gene reveals a polymorphism correlating strongly with polymorphisms previously described at the protein as well as the DNA level. *Animal Genetics* 25(4):223-28.
- Osta, R., Martín Burriel, I., y Zaragoza, P. (1996). Genetic mapping of four bovine loci asociated with SINE 3' poly(A) sequences and a strecht of Adenines. Abstract de el XXVth International Conference on Animal Genetics, Julio 21-25. Tours.
- Seyfert, H.M., Tuckoricz, A., Interhal, H., Koczán, D., y Hobom, G. (1994) Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and of its promoters. *Gene* 143: 265-269.
- Vögeli, P., Bolt, R., Fries, R. y Stranzinger, G. (1994). Cosegregation of the Malignant Hyperthermia and the arg615-cys615 mutation in the skeletal muscle calcium realase chanel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. *Animal Genetics* 25 (Supp.1) 59-66.