

## Reserva Genética de Bovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel. I. Análisis Genético de Toros con Microsatélites

Armstrong, E.<sup>1</sup>; Postiglioni, A.<sup>1</sup>; Martínez, A.<sup>2</sup>; Rincón, G.<sup>1</sup>; Kelly, L.<sup>1</sup>

### RESUMEN

La reserva genética de bovinos Criollos (BC), ubicada en un ecosistema autóctono de 650 hectáreas (Parque Nacional de San Miguel), cuenta con aproximadamente 600 animales (categorías: toros, madres, crías). En muestras tomadas al azar, se ha demostrado una alta heterocigosidad genética y equilibrio génico al evaluar marcadores moleculares de genes simples para la producción lechera. En esta comunicación se comienza un análisis estratificado de diversidad genética, procesándose una muestra de toros (N=19/23) en edad reproductiva (mayores de 2 años). Se amplifican por PCR un panel de 17 microsatélites (MS) sobre ADN's pertenecientes al banco genómico de bovinos Criollos uruguayos. Se corre el producto en geles de poliacrilamida (6%) mediante secuenciador automático (ABI377XL). Se identifican entre 2 y 7 variantes alélicas por MS, en un total de 73 alelos estando, la mayoría en equilibrio Hardy-Weinberg (p 0,05) La heterocigosidad esperada por locus se presentó entre 0.46-0,80, con excepción del loci HEL13 (He=0,29). La heterocigosidad media esperada correspondió a 0,62 (p 0,50). Los resultados de diversidad genética con secuencias nucleotídicas polimórficas encontrados en estos animales, apoyan análisis genéticos previos de genes productivos, creándose entre ambos marcadores un soporte genómico que permitirá diseñar experiencias de interés para la producción pecuaria nacional.

**Palabras clave:** *Bovinos Criollos Uruguay, diversidad, microsatélites.*

### SUMMARY

The genetic reserve of Uruguayan Creole cattle consists of around 600 bovines, considering bull, cows and calves. These animals live in indigenous, habitat of 650 Hectares of extension. In random samples, a high genetic heterozygosity and HW equilibrium between molecular markers of major genes related to milk production was previously demonstrated. In this communication a stratificated study of genetic diversity is begun with a sample of bulls of reproductive age (N=19/23). DNAs, stored in the Uruguayan Creole cattle genomic bank, were analysed with a kit of 17 microsatellites (MS), processed with the PCR methodology and run in a polyacrilamide gel (6%) using an automatic sequencer (ABI373A). Between 2 and 7 different alleles were identified per MS, in a total of 73 alleles, and in the majority, the Hardy-Weinberg equilibrium was demonstrated (p 0,05). The expected heterozygosity per locus was between 0.46-0,80, except for the locus HEL13 (He=0,29). The expected mean heterozygosity was 0,62 (p 0,50).

The genetic diversity found in polymorphic nucleotide sequences in the reproductive males category sustain previous genetic analysis in major production genes, and both studies may give a genomic support for future experiences of interest in cattle production.

**Keywords:** *Uruguayan Creole cattle, diversity, microsatellites.*

### INTRODUCCIÓN

La primera introducción de ganado bovino en nuestro país fue llevada a cabo por Hernando Arias de Saavedra a principios del siglo XVII. Más tarde éstos se potencian con aquellos provenientes de las misiones jesuíticas del Alto Uruguay, generándose los bovinos Criollos del Uruguay (16, 10).

La reserva nacional de bovinos Criollos, se encuentra ubicada al sureste de nuestro país, en una zona agreste de montes indígenas y paisaje de serranías que comprende una superficie de alrededor de 650 hectáreas (datos SE.PA.E, 2003). Estudios genómicos mediante la metodología de RAPDs (random amplified polymor-

phic DNA), realizados en ADN de Criollo, Hereford y Holando Uruguayo, muestran distancias genéticas significativas expresadas en términos de bandas compartidas (Hereford con Criollo: 0,77; Holando con Criollo: 0,78; Hereford con Holando; 0,81) (11). La alta frecuencia de dichas bandas entre razas comerciales y la baja frecuencia encontrada entre éstas con el Criollo revelan que, a pesar de posibles eventos de introgresión genética de razas bovinas comerciales (siglos XIX-XX) estos bovinos Criollos mantendrían las características originales que posibilitaron su adaptación al medio natural de nuestro país. Frente a esta valoración se asume que la pobla-

ción se ha mantenido mayoritariamente en aislamiento reproductivo (11, 9).

Los primeros vacunos Criollos que originan la reserva genética del Parque Nacional de San Miguel y Santa Teresa provienen esencialmente de regiones serranas agrestes de los Deptos. de Maldonado y Treinta y Tres, constituyendo un total de 35 animales (1).

Investigaciones genéticas preliminares basadas en polimorfismos de MS (CYP21 y BM2113) y secuencias dialélicas de interés en la producción láctea en muestras tomadas al azar, han demostrado una alta variabilidad genética en términos de heterocigosidad esperada (He=0,8) y

<sup>1</sup>Area Genética. Laboratorio de Análisis Genéticos en Animales Domésticos. Facultad de Veterinaria (UDELAR). Uruguay. Avda. A. Lasplacas 1550. E-mails: eileen@internet.com.uy; alipos@adinet.com.uy

<sup>2</sup> Dpto. Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

equilibrio génico (6, 7, 8). Además se ha determinado en forma preliminar, un pelaje básico (castaño, negro, blanco) y medidas zoométricas en animales que habitaban los Parques de Santa Teresa y San Miguel (3, 12).

Con el propósito de valorar polimorfismos moleculares de la reserva y continuar con la identificación de los animales con patrones genómicos di y multialélicos, se comienza un análisis por categoría de la estructura poblacional. En esta primera comunicación se presentan y analizan en términos de heterocigosidad los productos alélicos de la categoría machos reproductores cuyos ADNs se sometieron a la valoración polimórfica con un panel de 17 microsatélites (MS). Estos marcadores son algunos de aquellos recomendados por la FAO para estudios de diversidad genética en animales que justifique su conservación "in situ" como recurso genético sustentable (Convenio sobre diversidad biológica, "Conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica". " Art.2 Términos" "Cumbre de la tierra", Rio de Janeiro, 1992).(ww.fao.org/DAD-IS; www.ri.bbsrc.ac.uk).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El rodeo de bovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel constituye un núcleo reproductivo de 23 toros, aproximadamente 445 vacas y 105 terneros de ambos sexos. El número de animales de esta reserva se determinó teniendo en cuenta el tamaño efectivo poblacional ( $N_e = 87$ ) para un área de 650 hectáreas, calculada en base a la siguiente fórmula:

$$N_e = 4Nm.Nf / (Nm + Nf).$$

donde: Nm= número de machos reproductores;

Nf= número de hembras reproductoras.

(Informe técnico, DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente, del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente) (8).

Se realiza extracción de ADN genómico de sangre periférica a una muestra de 19 toros de la reserva genética por la técnica rápida de fenol-cloroformo (4). Se amplificaron los 17 microsatélites mediante PCR en tres reacciones Multiplex:

MI (BM1314; CSSM66; ILSTS011; INRA37; ETH10); MII (BM1818; BM2113; BM8125; INRA32; MM12); MIII (HAUT27; HEL13; HEL9; CSRM60; ILSTS006; INRA63; TGLA227). El programa de amplificación comprendió los siguientes ciclos: a) desnaturalización: 95°, 30seg; b) 35 ciclos de: 95°, 30seg, 55°, 45seg, 72°, 30seg; c) extensión final: 72°, 30 m. (termociclador PTC 100 de MJ Research Inc.) Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (6%) en secuenciador automático ABI377XL. El análisis de los datos se realizó con el programa GENESCAN ANALYSIS v3.2.1. Con el programa GENOTYPER v2.5 se asigna a cada pico o banda detectada una denominación alélica que se exporta a una base de datos de MS EXCEL 2000. Los genotipos detectados fueron estandarizados utilizando las muestras de referencia RH 215, INRA 2000 y GI 2000 del EU AIRE 2066 Concerted Action Group (13).

El análisis de diversidad genética mediante el índice de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se realizó basándose en el cálculo de las frecuencias alélicas en cada locus y el número promedio de alelos por locus. Para ello se utilizó el programa informático GENEPOP v3.1c (15).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la muestra de machos reproductores se analizó un máximo de 19 animales con un panel de 17 MS. Se identificaron 73 alelos en total, con un promedio de 4.3 alelos por locus y con una  $H_e$  esperada promedio de 0,67. Todos los loci resultaron polimórficos expresándose como loci dialélico el marcador BM8125, que, a su vez, presentó una heterocigosidad esperada media ( $H_e = 0,46$ ). Los loci más polimórficos correspondieron a los MS CSSM66 y TGLA227 (ambos con 7 alelos) y alta heterocigosis ( $H_e = 0,80$ ;  $H_e = 0,75$  respectivamente), siguiendo el MS BM2113, con 6 alelos y heterocigosidad esperada de 0,75 (Cuadro 1). La mayoría de los marcadores se encontraron en equilibrio HW. Sunden y col., (14) identifican 9 variantes alélicas para el MS BM2113 en un total de 9 razas bovinas comerciales. Blott y col. (2) analizan este MS, dentro de un panel de 20, sobre ADNs de 7 razas bovinas comerciales

europas, y obtienen el mismo número de alelos ( $N = 6$ ) que se expresan en la categoría toros criollos, pero con una heterocigosidad esperada para este locus menor ( $H_e = 0,73$ ). Este marcador no se encuentra en equilibrio HW ( $2 = 13,33$ ;  $p > 0,05$ ) posiblemente por la alta frecuencia del alelo 126 (0.3611) y la baja frecuencia (0.0556) de los alelos 128 y 140 (Tabla 1), existiendo tendencia a una distribución alélica heterogénea. En relación al MS altamente polimórfico, CSSM66, las frecuencias extremas se identifican por los alelos 187 (0,3235) y 179 (0,0294), presentándose una tendencia a distribución homogénea (Cuadro 1). Este marcador muestra una alta heterocigosis ( $H_e = 0,80$ ). La valoración de su PIC permitirá proponerlo como un posible marcador a tener en cuenta para la realización de análisis comparativos entre razas bovinas criollas americanas y posibles ancestros iberoamericanos. Se plantean cálculos de Fis cuyos resultados permitirán evaluar su alta heterocigosis. Kantanen y col., (5) en un análisis con MS en razas bovinas escandinavas, no lo consideran un microsatélite neutro (CSSM66), habiéndolo asociado con QTLs para producción lechera. Se podría pensar que si existiese alguna presión de selección sobre este marcador, se generarían desequilibrios alélicos entre las categorías de esta reserva. Sería de interés analizarlo en las categorías vacas y crías en relación a la producción lechera en un ambiente donde la selección natural es la fuerza selectiva predominante, como es el caso de esta reserva genética. En suma, estos estudios preliminares de heterocigosidad permiten evaluar los resultados primarios de variabilidad genética, creándose las bases para analizar la estructura y dinámica poblacional de esta reserva genética.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Sra. Iris Hernández por el servicio técnico en el Laboratorio, a la Dra. MV. Marcela Silveira y personal del Servicios de Parques del Ejército (SEPAE) por su constante apoyo en el trabajo realizado, y a las Instituciones de PEDECIBA, CSIC, Universidad de la República, CIDEA (Facultad de Veterinaria) por el apoyo financiero.

**Cuadro 1.** Machos Reproductores (Toros). Nombre del microsatélite (MS); número de alelos en pares de bases (Alelos, pb); frecuencias alélicas; número de animales analizados; heterocigosidad esperada (He).

MS	Alelos (pb)	Frec. alélicas	Nº animales	He
<b>BM8125</b>	116	0.6316	19	0.4654
	122	0.3684		
<b>BM1314</b>	155	0.0294	17	0.6211
	157	0.4118		
<b>BM1818</b>	159	0.4412	14	0.6148
	161	0.1176		
	260	0.2857		
	262	0.1071		
	264	0.5357		
	268	0.0714		
<b>BM2113</b>	126	0.3611--	18	0.7546
	128	0.0556		
	134	0.1111		
	136	0.1389		
	138	0.2778		
	140	0.0556		
<b>CSSM66</b>	179	0.0294	17	0.8010
	181	0.2059		
	183	0.0882		
	187	0.3235		
	189	0.1471		
	195	0.0882		
	197	0.1176		
<b>ETH10</b>	213	0.0938	16	0.5801
	217	0.4375		
	219	0.4688		
<b>ILSTS011</b>	264	0.1000	10	0.7000
	268	0.4000		
	270	0.3000		
	272	0.2000		
<b>INRA32</b>	180	0.2727	11	0.6446
	182	0.2727		
	184	0.4545		
<b>INRA37</b>	114	0.1176	17	0.6851
	126	0.0882		
	128	0.0294		
	132	0.3824		
	136	0.3824		
<b>MM12</b>	115	0.1053	19	0.5208
	119	0.2632		
	131	0.6316		
<b>CSRM60</b>	93	0.5526	19	0.6302
	97	0.1579		
	99	0.0526		
	103	0.1842		
	105	0.0526		

Cuadro 1. *Continuación.*

<b>HAUT27</b>	140	0.0417	12	0.5625
	144	0.0417		
	148	0.6250		
	150	0.1667		
	154	0.1250		
<b>HEL13</b>	184	0.0417	12	0.2882
	188	0.1250		
	192	0.8333		
<b>HEL9</b>	151	0.2368	19	0.7936
	159	0.2368		
	161	0.1579		
	163	0.1579		
	165	0.2105		
<b>ILSTS006</b>	289	0.5000	14	0.6301
	291	0.1071		
	295	0.0714		
	297	0.3214		
<b>INRA63</b>	173	0.3529	17	0.5554
	175	0.0882		
	181	0.5588		
<b>TGLA227</b>	85	0.1053	19	0.7507
	89	0.3158		
	91	0.0526		
	93	0.3421		
	95	0.1316		
	97	0.0263		
	99	0.0263		

### Referencias Bibliográficas

1. **Arredondo, H.** (1958). Santa Teresa y San Miguel. La restauración de las fortalezas. La formación de sus parques. Imprenta "El Siglo Ilustrado", Montevideo.
2. **Blott, S.C.; Williams, J.L.; Haley, C.S.** (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-619.
3. **Fernández, G.; Rodríguez, M.; Silveira C.; Barba, C.** (2001). Estudio étnico de los bovinos Criollos del Uruguay. II. Análisis de las faneras. *Archivos de Zootecnia* 50 (189-190):119-124.
4. **John, S.; Weitzner, G.; Rozen, R.; Scriver, C.** (1991). A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*:19(2), 408.
5. **Kantanen, J.; Olsaker, I.; Holm, L.E.; Lien, S.; Vilkki, J.; Brusgaard, K.; Eythorsdottir, E.; Danell, B.; Adalsteinsson, S.** (2000). Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *The Journal of Heredity* 91 (6): 446-457.
6. **Postiglioni, A.; Rincón, G.; Kelly, L.; D'Angelo, M.; Gagliardi, R.; De Andrés, Cara, D.** (1998). Caracterización genética de los bovinos Criollos del Uruguay. II. Estudio de su variabilidad genética. *Archivos de Zootecnia* 47: 225-231.
7. **Postiglioni, A.; Rincón, G.; Llambí, S.; Kelly, L.; D'Angelo, M.; Arruga, M.V.** (1998b). Análisis de la estructura genética de los bovinos Criollos del Uruguay. Su relación con razas iberoamericanas. XVI PANVET 98. TL.b116:162.

- 
- 8. Postiglioni, A.** (2000). Creación de la Reserva Natural de bovinos Criollos del Uruguay. Informe técnico presentado a la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA).
- 9. Postiglioni, A.; Rincón, G.; Kelly, L.; Llambí, S.; Fernandez, G.; D'Angelo, M.; Gagliardi, G.; Trujillo, J.; de Bethencourt, M.; Guevara, K.; Castellano, A.; Arruga, M.V.** (2002) Biodiversidad genética en bovinos Criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. Archivos de Zootecnia 51: 1-8.
- 10. Primo, A.T.** (1992) El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. Archivos de Zootecnia 41 (extra): 421-432.
- 11. Rincón, G.; D'Angelo, M.; Gagliardi, R.; Kelly, L.; Llambí, S.; Postiglioni, A.** (2000) Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. Research in Veterinary Science 69, 171-174.
- 12. Rodríguez, M.; Fernández, G.; Silveira, C.; Delgado, J.V.** (2001). Estudio étnico de los bovinos Criollos del Uruguay. I. Análisis Biométrico. Archivos de Zootecnia 50 (189-190):113-118.
- 13. Savarese, M.C.; Pariset, L.; Lenstra, J.A.; Nijman, I.J.; Mommens, G.; Wiener, P.; Burt, D.; Williams, J.L.; Moazami-Goudarzi, K.; Dunner, S.; Rodellar, C.; Erhardt, G.; Weimann, C.; Zanotti, M.; Pilla, F.; Bruzzone, A.; Valenti, A.** (2002). Length standardization of microsatellites used in analysis of biodiversity in cattle. XXVIII International Conference on Animal Genetics, ISAG, Gottingen, Alemania.
- 14. Sunden, S.L.F.; Stone, R.T.; Bishop, M.D.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Beattie, C.W.** (1993). A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113. Animal Genetics, 24:29.
- 15. Raymond, M.; Rousset, F.** (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.
- 16. Wilkins, J.V.; Martinez, L.; Rojas, F.** (1989). El ganado vacuno Criollo. Diálogo XXXVI. Conservación y mejoramiento del ganado bovino Criollo IICA. PROCISUR: 69-82.