

POLIMORFISMO DEL GEN BoLA DRB3.2 EN VACAS HOLSTEIN Y BONXHOLSTEIN USANDO PCR-RFLP

POLYMORPHISM OF BoLA DRB3.2 GENE IN HOLSTEIN AND BONXHOLSTEIN COWS USING PCR-RFLP

Polimorfismo del gen BoLA DRB3.2 en vacas Holstein y BONxHolstein.

Juan C Zambrano^{1*}; Julian Echeverri²; Albeiro López-Herrera²

¹Doctorando, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. * jczambranoa@unal.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Animal

Palabras clave:

Antígeno
leucocitario
bovino
Polimorfismo de
los fragmentos
de restricción

Keywords:

Bovine
leucocyte
antigen
Restriction
fragment
polymorphism

Abstract

Nowaday the use of molecular markers is a tool widely used in breeding programs. The polymorphism of BoLA DRB3.2 gene has been associated with traits of high importance in dairy cattle as resistance or susceptibility to mastitis and other diseases. The aim of this study was to determine the BoLA DRB3.2 allele patterns in a population of pure and crossbred Holstein cows with BON (white with black ears) (BXH), breed adapted to the tropics of Colombia. In this study were identified twenty seven BoLA DRB3.2 alleles with frequencies ranging from 0,8-15,9% in Holstein brrred and from 2-20% in BxH. The five most frequents alleles to Holstein were BoLA DRB3.2* 23, 22, 24, 16 y 8 with a frecuencie accumulate of 56.1% and the five more frequents alleles to BxH were: BoLA DRB3.2*23, 24, 20, 39 and 22 with frequencies ranging from 2 to 20%; in the BxH group was identified using nucleotides sequences analysis a new allele, the fbd, never repted by any researcher.

Resumen

En la actualidad el uso de marcadores moleculares es una herramienta de amplia utilización en programas de mejora genética. El polimorfismo del gen BoLA DRB3.2 ha sido asociado con características de alta importancia en ganado lechero como la resistencia o susceptibilidad a mastitis y de otras enfermedades. El objetivo de este estudio fue determinar los patrones alélicos del gen BoLA DRB3.2 en una población de vacas Holstein puras y cruzadas con la raza BON (Blanco Orejinegro) (BxH), de amplia adaptación al trópico colombiano. En este estudio fueron identificados 27 alelos BoLA DRB3.2 con un rango de frecuencias de 0,8-15,9% en la raza Holstein y 2-20% en BxH. Los cinco alelos más frecuentes para la raza Holstein fueron BoLA DRB3.2* 23, 22, 24, 16 y 8, con una frecuencia acumulada de 56,1% y los cinco alelos más frecuentes en BxH fueron BoLA DRB3.2*23, 24, 20, 39 y 22, con una frecuencia acumulada de 62%; en el grupo BxH se identificó mediante análisis de secuencias nucleotídicas un alelo que no había sido reportado anteriormente por ningún autor, correspondiente al BoLA DRB3.2* fbd.

Introducción

Las enfermedades infecciosas son parte de los problemas que afectan frecuentemente la salud de los bovinos, siendo un factor limitante en la producción de carne y leche (Van Dorp *et al.*, 1999). Esto se refleja en aumento de animales descartados prematuramente, descarte de leche contaminada, bajo índice de fertilidad como consecuencia de problemas reproductivos, incremento de gastos por tratamientos y medicamentos veterinarios, bajo índice de crecimiento de los animales y uso de antibióticos y medicamentos que afectan la seguridad alimentaria. Actualmente se han descrito polimorfismos genéticos en algunos genes relacionados con características productivas y características sanitarias como el gen BoLA DRB3.2.

El CMH en bovinos es conocido como antígeno leucocitario bovino (BoLA) y está localizado en el brazo corto del cromosoma 23 de los bovinos. Dentro del BoLA se encuentra localizado el gen DRB3, el cual es el de mayor expresión y tiene un alto polimorfismo principalmente en el exón 2 (DRB3.2) que codifica el sitio de

unión a antígeno (Andersson and Davies, 1994). Este exón ha sido utilizado como marcador molecular y se han identificados 121 variante alélicas (Wang *et al.* 2008). Algunos alelos BoLA DRB3.2 han sido asociados con ocurrencia a enfermedades infecciosas como la mastitis bovina (Sharif *et al.* 1998., Rupp *et al.* 2007). El presente trabajo tuvo por objeto determinar por medio de la técnica: PCR-RFLP, las variantes alélicas del gen BoLA DRB3.2 presentes en vacas de raza Holstein y del cruce de razas BON x Holstein (BxH) del Hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Material y métodos

Fueron genotipificadas 91 vacas, 66 de raza Holstein y 25 del cruce BON x Holstein (BxH) para el exón 2 del gen DRB3 del BoLA. El DNA bovino fue obtenido de muestras de células mononucleares de sangre del cual se obtuvo el amplificado del exón 2 por PCR semianidada empleando la metodología desarrollada por Van Eijk *et al.* (1992). El polimorfismo del gen fue identificado por PCR-RFLP empleando tres enzimas de restricción, el amplificado obtenido en la segunda ronda de PCR fue digerido con tres enzimas restricción *RsaI*, *BstYI* (New England BioLabs®) y *HaeIII* (Fermentas®) para obtener los RFLP's. Las muestras digeridas fueron resueltas en geles de agarosa como lo describe Gilliespie *et al.* (1999). La identificación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 se realizó por combinación de los diferentes patrones de restricción obtenidos en el siguiente orden *RsaI*, *BstYI*, *HaeIII* para cada muestra de acuerdo a la nomenclatura alélica reportada por Van Eijk *et al.* (1992); Maillard *et al.* (1999); Rusell *et al.* (2000). Los alelos identificados fueron confirmados por secuenciación para lo cual se purificó el fragmento amplificado empleando el kit QIAquick (QIAGEN) y enviadas a la empresa Macrogen Inc en Seúl Corea para el análisis de secuenciación. Para el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio Hardy-Weinberg, se utilizó el paquete estadístico GENEPOP Versión 3,3 (Raymond y Rousset, 1995).

Resultados

Mediante la técnica PCR-RFLP fueron identificados 27 alelos BoLA DRB3.2 en las poblaciones estudiadas, de los cuales 18 fueron encontrados en (BxH) y 23 en la raza Holstein. La población se encontró en equilibrio de Hardy- Weinberg para este locus. En la raza Holstein se determinó que el 79% de las vacas fueron heterocigóticas y el 21% homocigóticas, para BxH se obtuvo un resultado muy similar, 80% de heterocigóticos y 20% homocigóticos para el gen BoLA DRB3.2. Las frecuencias alélicas para la raza Holstein se ubicaron entre 0,8 y 15,9%, siendo los alelos más frecuentes el 23, 22 y 24 y en BxH del 2 hasta 20%, siendo los alelos más frecuentes el 23, 24 y 20 (tabla I). En el grupo de vacas BxH se identificó el alelo fbd, el cual no ha sido reportado en estudios anteriores.

Discusión

El perfil de alelos identificados en la raza Holstein fue muy similar a los resultados de otros estudios. Los 10 alelos más frecuentes identificados tienen una frecuencia acumulada de 78.1%. Siete de estos alelos BoLA DRB3.2*8, 16, 18, 22, 23, 24, y 27, fueron reportados por diferentes autores (Starkenburger *et al.* 1999., Nasiry *et al.* 2008) en sus estudios dentro de los 10 mas frecuentes. Sharif *et al.* (1998) y Rupp *et al.* (2007), reportaron 5 de los 10 alelos encontrados más frecuentes en este estudio: 8, 16, 22, 23 y 24.

Este perfil alélico se ha encontrado solo en la raza Holstein y es diferente de otras razas, por ejemplo en la raza Shorthorn Japonés (Takeshima, 2002) los seis alelos más frecuentes son: 8, 9, 21, 27, 7 y 24 con el 70% de frecuencia alélica acumulada (FrA). En la raza Criollo argentino (Giovanbatista *et al.* 1996) los seis alelos más frecuentes con 73% de FrA son: 15, 18, 24, 20, 27 y 5. En la raza Jersey (Gilliespie *et al.* 1999) los siete alelos más frecuentes son: 10, 15, 8, 21, 36, 17 y el alelo "ibe" con una FrA de 79,4% en la población de estudio. En la raza Angus (Golijow, 1996) los siete alelos más frecuentes son: 36, 8, 4, 15, 22, 20 y 10 con 76,6% de FrA y en la raza Ayshire (Udina *et al.* 1998) los 5 alelos más frecuentes son: 8, 7, 28, 10 y 24. Los alelos 33, 39, 50 y kba que fueron identificados en este estudio para la raza Holstein con frecuencias alélicas de 0.015, 0.061, 0.053 y 0.030 respectivamente, no han sido reportados en otros estudios para esta raza.

Para BxH, dentro de los 18 alelos identificados en este estudio, 10 fueron reportados por Martinez *et al.* (2005), en la raza BON dentro de los cuales están: BoLA DRB3.2*8,11,16,18,19,20,22,23,24,37 con una frecuencia de 33,7% comparada con la de este estudio que fue de 74%. Las frecuencias alélicas son diferentes en las vacas BxH de esta investigación, comparadas con la raza BON. Esta diferencia se debe posiblemente al cruce de razas (BONxHolstein).

Tabla I. Frecuencia alélica para el gen BoLA DRB3.2 de vacas Holstein y BxH (*Allele frequencies for BoLA DRB3.2 gene of Holstein and BxH cow*)

Alelo DRB3.2	Combinación RsaI/BstYI/HaeIII	Frecuencia Alélica para Holstein	Frecuencia Alélica para BxH
23	nba	0,16	0,20
22	mba	0,13	0,08
24	nbb	0,11	0,14
16	jbd	0,11	0,02
33	nbf	0,06	0,04
8	faa	0,06	0,02
39	tba	0,05	0,02
37	oba	0,04	0,08
27	obf	0,04	----
18	lbf	0,03	0,02
kba	kba	0,03	----
36	lba	0,02	0,06
14	hbb	0,02	0,02
10	fba	0,02	----
51	gaa	0,02	----
20	lbb	0,02	0,12
11	gea	0,02	0,02
6	daa	0,02	----
50	xba	0,02	----
9	fda	0,02	----
28	obb	0,01	0,06
25	oaa	0,01	----
2	bba	0,01	----
19	sbb	----	0,04
fbd	fbd	----	0,02
iaa	iaa	----	0,02
laa	laa	----	0,02
Total		1	1

Conclusiones

El gen BoLA DRB3.2 en el Hato Paysandú es altamente polimórfico, ya que fueron identificadas 27 variantes alélicas, dentro de las cuales las variantes BoLA DRB3.2*33, 39, 50 y kba no han sido reportadas en la raza Holstein aunque han sido reportados en otras razas en bajas frecuencias, las variantes fbd, iaa y laa fueron encontradas solo en el cruce BxH en este estudio y que posiblemente provengan de la raza BON, siendo un reporte nuevo para esta raza.

Agradecimientos

Este artículo fue parte del proyecto: Correlación entre mastitis clínica y subclínica con las variantes genotípicas del gen BoLA DRB3.2, presentes en las vacas y novillas de primer parto del hato lechero de la hacienda Paysandú de La Universidad Nacional de Colombia, código QUIPU 20101006713, financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Bibliografía

- Andersson, L. and Davies, C.J. 1994. The major histocompatibility complex. In: Cell-mediated Immunity in ruminants. Goddeeris & W.I. Morrison CRC Press, Boca Ratón, 1994, pp:37-57.
- Gillespie, B.E. Jayarao, B.M., Dowlen, H.H. and Oliver, S.P. 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cow. Journal of Dairy Science, 82:2049-2053.
- Giovambattista, G., Golijow, C.D., Dulout, F.N. and Lojo, M.M. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. Animal Genetics, 27:55-56.

- Golijow, C.D. 1996. Estudio de la reducción de la variabilidad genética por acción de la selección artificial en poblaciones de *Bos taurus*, PhD Thesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Maillard, J., Renard, C., Chardon, P., Chantal, I., Bensaid, A. 1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics*, 30:200–203.
- Martínez, R., Toro, R., Montoya, F., Burbano, M., Tobón, J., Gallego, J., Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia*, 54:349-356.
- Nassiry, M.R., Sadeghi, B., Tohidi, R., Afshari, J.T., Khosravi, M. 2008. Comparison of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 allele frequencies between two subpopulations of Iranian Holstein cattle. *African Journal of Biotechnology*, 7:2671-2675.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 3.3): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J of Heredity*, 86:248-249.
- Rupp, R., Hernandez, A. and Mallard, B.A. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 90:1029-1038.
- Russell, G.C., Fraser, D.C., Craigmile, S., Oliver, R.A., Dutia, B.M. and Glass, E.J. 2000. Sequence and transfection of BoLA-DRB3 cDNAs. *Animal Genetics*, 31:219-222
- Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C., Leslie, K.E. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29:185-193.
- Starkenburg, R.J., Hansen, L.B., Kehrli, J.R., Chester-Jones, H. 1997. Frequencies and Effects of Alternative DRB3.2 Alleles of bovine lymphocyte antigen for Holstein in milk selection and control lines. *Journal of Dairy Science*, 80:3411-3419.
- Takeshima, S.N., Nakai, Y., Ohta, M. and Aida, Y. 2002. Characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn Cattle by Polymerase Chain reaction-sequence based typing. *Journal of Dairy Science*, 85:1630-1632.
- Udina, I.G., Haramyshera, E.E., Sulimova, G.E., Pavlenko, S.P., Turkova, S.O. *et al.* 1998. Comparative analysis of Ayrshire and Black Pied cattle breeds by histocompatibility markers. *Genetika*, 34 (12):1668–1674.
- Van Dorp, R.T., Martin, S.W., Shoukri, M.M., Noordhuizen, J.P., Dekkers, J.C. 1999. An epidemiologic study of disease in 32 registered Holstein dairy herds in British Columbia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63:185-192.
- Van Eijk, M.J.T., Stewart-Haynes, J.A. and Lewin, H.A. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23:483-496.
- Wang, K., Sun, D., Zhang, Y. 2008. Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 Alleles. *International Journal of Immunogenetics*, 35:331-332.