

## POLIMORFISMOS DEL GEN BoLA DRB3 – exón 2 en BOVINOS CRIOLLOS PERUANOS MEDIANTE EL MÉTODO SSCP

DETECTION OF BoLA DRB3 -2 GENETIC POLIMORPHISM IN PERUVIAN CREOLE CATTLE BY SSCP

Vallejo A.R.<sup>1,2\*</sup>, Poquioma V.<sup>3</sup>, Yalta C.<sup>2</sup>, Veli E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bióloga. Ibagué, Colombia. \*adri\_vallejo@yahoo.com

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Lima, Perú

<sup>3</sup>Facultad de Biología, Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú

**Keywords:** Bovine leucocyte antigen (BoLA); Polymorphism; Breeding and Conservation.

**Palabras clave:** Antígeno Leucocitario Bovino; Polimorfismo; Manejo y Conservación.

### Abstract

The bovine leukocyte antigen (BoLA) has been identified and associated with a variety of diseases; however there are no reports on the study of this gene in Peruvian Creole cattle. In order to determine polymorphisms DRB3 gene exon 2, a total of 299 Creole cattle from the regions of Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín, La Libertad and Puno, were analyzed by the of electrophoresis detection of polymorphisms single stranded conformational (SSCP) with subsequent sequencing analysis. Patterns of diversity and genetic structure and phylogenetic analyzes were conducted. The levels of genetic diversity ( $\pi$ ) and haplotype ( $h$ ) were high for all regions analyzed, as well as for the total population ( $\pi = 0.921$ ). We identified 34 different genotypes consisting of 27 alleles of which 6 are new and 21 previously reported. The alleles \* 1801, \* 14011 and \* 4802 were more frequent in the populations analyzed, being of great importance as reported association mastitis and resistance to ticks. Test to detect natural selection were conducted, and reveal a potential bottleneck in the populations analyzed. The results obtained support a high genetic polymorphism for the DRB3 gene exon 2 in Peruvian Creole cattle populations adapted to the highlands; diversity can be explained by its multiple origins, which is important for the establishment of breeding programs that raise productivity of farmers in the region.

### Resumen

El antígeno leucocitario bovino (BoLA) y algunos de sus alelos han sido identificados y asociados con gran variedad de enfermedades; sin embargo no hay reportes sobre el estudio de este gen en bovinos criollos peruanos. Con el objetivo de determinar los polimorfismos del gen DRB3 exón 2, un total de 299 bovinos criollos provenientes de las regiones de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín, La Libertad y Puno, fueron analizados mediante la técnica de electroforesis de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) con un posterior proceso de secuenciamiento. Patrones de diversidad y estructuración genética así como análisis filogenéticos fueron conducidos. Los niveles de diversidad genética ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ) fueron altos para todas las regiones analizadas, así como para la población total ( $\pi = 0.921$ ). Se lograron identificar 34 genotipos diferentes compuestos por 27 alelos, de los cuales 6 son nuevos y 21 previamente reportados. Los alelos \*1801, \*14011 y \*4802 fueron los más frecuentes en las poblaciones analizadas, siendo de gran importancia pues reportan asociación a mastitis y resistencia a garrapatas. Por otro lado, el alelo \*1501 no presentó tan alta frecuencia, pero fue común para todas la poblaciones. No se registró ningún tipo de estructuración poblacional (AMOVA) entre las regiones estudiadas, lo que es soportado por las pequeñas distancias genéticas encontradas y los análisis de coordenadas principales. Test de detección de selección natural fueron conducidos, y revelaron un posible cuello de botella en las poblaciones analizadas. Análisis filogenéticos muestrearon agrupaciones similares bajo diferentes metodologías y situaron a la población de La Libertad en una rama más alejada al resto de las poblaciones. Los resultados obtenidos soportan una alta diversidad genética para el gen DRB3 exón 2 en poblaciones de bovinos criollos peruanos adaptados a las zonas altoandinas; diversidad que puede ser explicada por los múltiples orígenes de este germoplasma (producto de ganado europeo introducido durante la conquista así como introducción de nuevo material genético en los

últimos 50 años), lo cual constituye información relevante para el establecimiento de programas de mejora genética que eleven la productividad de los criadores de la región.

## Introducción

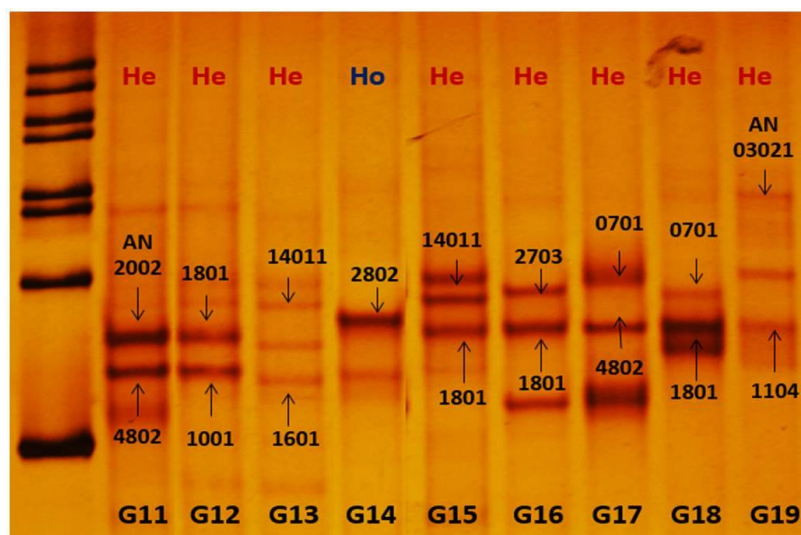
El bovino criollo peruano es considerado como raza domesticada naturalizada, siendo un recurso importante en las comunidades campesinas altoandinas por ser fuente de alimentación, fuerza de trabajo e ingresos económicos. En la actualidad, la población nacional cuenta con 5 millones 156 mil 44 cabezas de ganado bovino (CENAGRO, 2012), de los cuales casi el 75% es ganado criollo distribuido principalmente en las regiones de la sierra. Los ecosistemas agrestes altoandinos han ido modelando con el tiempo la adaptabilidad de estas poblaciones, proveyéndolas de características particulares, lo que las convierte en un reservorio potencial de germoplasma útil para programas de conservación y manejo genético; sin embargo, pocos han sido los esfuerzos por potenciar su uso e investigación, debido a la constante introducción de razas exóticas de mayor producción. Dado el potencial que presentan estas poblaciones en resistencia a enfermedades y rusticidad, el objetivo del trabajo consistió en identificar los polimorfismos del gen DRB3 exón 2 (de complejo mayor de histocompatibilidad) en poblaciones criollas peruanas, empleando para ello la técnica SSCP y secuenciamiento, y establecer cuáles de los alelos encontrados se encuentran reportados para asociación a resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades.

## Material y métodos

Se analizaron un total de 209 muestras de folículos pilosos de bovinos criollos, provenientes de las regiones de Ancash (n=45), Apurímac (n=28), Ayacucho (n=122), Huancavelica (n=40), Junín (n=23), La Libertad (n=7) y Puno (n=34). La extracción de ADN se realizó a partir del protocolo de Sambrook & Russell (2001). La amplificación por PCR se realizó empleando los iniciadores HL030, HL031 y HL032 (Mota *et al.*, 2002 /Van Eijk *et al.*, 1992). Posteriormente, se estandarizó la técnica SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) empleando el DCode™ Universal Mutation System de BIO-RAD, realizando una electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 8%, durante 24h a 160V, 33mA y 4Watts a una temperatura entre 4° - 5,5°C. La visualización de las bandas se realizó con la técnica de nitrato de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Después de la identificación de los polimorfismos, las bandas de cada alelo fueron extraídas manualmente y purificadas empleando el Kit de extracción de ADN a partir de agarosa modificado (Qiagen). Los productos purificados fueron reamplificados y secuenciados con un ABI PRISM® 3700 por duplicado (forward y reverse). Las secuencias obtenidas (242 pb) fueron editadas manualmente y alineadas con el programa SeqScape V2.1.1 (Applied Biosystems).

## Resultados

Los niveles de diversidad genética ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ) fueron altos para todas las regiones analizadas, así como para la población total ( $\pi = 0,921$ ). Se identificaron 34 genotipos diferentes (23 heterocigotos y 11 homocigotos) (Figura 1) compuestos por 27 alelos, de los cuales 6 fueron nuevos y 21 (\*0101, \*1801, \*2903, \*4802, \*0701, \*1001, \*1103, \*20012, \*12011, \*1501, \*1201, \*1101, \*0501, \*4401, \*2703, \*2201, \*1601, \*2802, \*2101, \*0902, \*1104) previamente reportados. Los alelos \*1801, \*14011 y \*4802 fueron los más frecuentes en las poblaciones analizadas, siendo de gran importancia pues reportan asociación a mastitis y resistencia a garrapatas. Por otro lado, el alelo \*1501 no presentó tan alta frecuencia pero fue común para todas las poblaciones. No se registró ningún tipo de estructuración poblacional (AMOVA) entre las regiones estudiadas ( $F_{st}=0,0077$ ), y el mayor porcentaje de variación estuvo concentrado entre los individuos dentro de las poblaciones (99%); lo que es soportado por las bajas distancias genéticas  $D_s$  y  $D_a$  de Nei (1978) y (1983) que variaron entre poblaciones ( $D_s$  0,002 – 0,039) y ( $D_a$  0,0029 – 0,0252), así como, por los análisis de coordenadas principales. Test de detección de selección natural,  $D$  de Tajima = 0,97514, y  $F$  de Fu = 0,912, reflejan un posible reciente cuello de botella o selección natural de tipo balanceante. Los análisis filogenéticos mostraron agrupaciones similares bajo diferentes metodologías, y situaron a la población de La Libertad en una rama más alejada al resto de las poblaciones.



**Figura 1.** Gel de poliacrilamida con genotipos detectados (*Polyacrylamide gel with detected genotypes*)

\*He (rojo): Estado Heterocigótico; Ho (azul): Estado Homocigótico; G: Genotipo; AN: alelo nuevo similar al alelo mencionado.

### Conclusiones

Las poblaciones de bovinos peruanos presentaron un elevado polimorfismo para el gen DRB3; lo cual es importante, ya que le proporcionan un valor agregado al germoplasma, y lo presentan como un recurso genético útil para implementar futuros programas de mejora en la región. Se determinó que todas las poblaciones presentaron alelos asociados con la resistencia a vectores causantes de Anaplasmosis bovina, Teileriosis y Leucosis bovina enzootica, que son las principales enfermedades bovinas que causan graves pérdidas en producción y gran mortandad en Perú, como se ha reportado en la lista de enfermedades aprobada por la Resolución Jefatura N° 271-2008-AG-SENASA (Ministerio de Agricultura y Riego – Perú).

### Bibliografía

- CENAGRO. 2012. Censo Nacional Agropecuario del Perú. Instituto Nacional de Informática y Estadística (INEI). Perú
- Mota A.F., Gabriel J.E., Martínez M.L., Coutinho L.L. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *European Journal of Immunogenetics* 29, 223–227.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nei M., Tajima F. & Tateno T. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-170.
- Sambrook J. & Russell W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. CSHL Press. 3rd ed. New York.
- Sanguinetti C.J., Dias Neto E., & Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 915-919.
- Van Eijk M.J., Stewart-Haynes J.A. & Lewin H.A. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 23(6), 483-496.