

COMUNICACIÓN

ANÁLISIS GENÉTICOS EN LA RAZA PONI VASCO-POTTOKA. RESULTADOS PRELIMINARES

GENETIC ANALYSIS IN THE BASQUE PONY-POTTOKA BREED. PRELIMINARY RESULTS

Pascual Moro, I.², T. Tejedor¹, L.V. Monteagudo Ibáñez¹, J.I. Intxausti del Casal² y
M.V. Arruga Laviña¹

¹Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. C/ Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. España.

²Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia. Lehendakari Agirre Etorbidea, 9, 2. 48014 Bilbao. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Caballo. Estudios citogenéticos. Transferrinas. Microsatélites. PCR.

ADDITIONAL KEYWORDS

Horse. Cytogenetic studies. Transferrin. Microstellites. PCR.

RESUMEN

En los últimos meses, el Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, junto con el Servicio de Ganadería de la Diputación Foral de Bizkaia, han emprendido la tarea de la caracterización genética del Poni Vasco o Pottoka. Para ello se ha realizado la puesta a punto de las técnicas citogenéticas que permiten el estudio del cariotipo individual, con el fin de detectar posibles anomalías cromosómicas en esta raza autóctona, capaces de reducir considerablemente la fertilidad. Asimismo, se ha comenzado el análisis de polimorfismos genéticos en proteínas plasmáticas (Albumina, Proteína de transporte de la vitamina D, Proteína Xk, Transferrina y Post-transferrina). Por otro lado, en el momento actual se ha iniciado el análisis de la variabilidad genética de esta raza mediante marcadores microsatélites. El estudio de marcadores genéticos, tanto proteicos como microsatélites, permite la identificación individual, la realización de pruebas de

exclusión de la paternidad y la caracterización y comparación de poblaciones, a fin de reconstruir las relaciones entre ellas, que se reflejan en los llamados árboles y distancias filogenéticas.

SUMMARY

During the last months, the Laboratory of Citogenetics and Molecular Genetics of the Veterinary Faculty of Zaragoza and the Service of Livestock Farming of the Provincial Government of Biscay, have begun the studies for the genetic characterisation of the Basque Pony or Pottoka. In this way we have tuned the genetic techniques up that allow the study of the individual karyotype, in order to detect possible chromosomal alterations able to reduce the fertility considerably in this local equine breed. Therefore, the analysis of genetic polymorphisms in plasmatic proteins (Albumin, D Blinding Protein, Xk Protein,

Arch. Zootec. 47: 181-188. 1998.

Transferrin and Post-Transferrin) has been started. On the other hand, an effective methodology is developing now, to detect genetic polymorphisms through DNA microsatellites. The study of genetic markers, either classic or microsatellites, allows the individual identification, the realisation of paternity exclusion tests and the characterisation and comparison among populations, in order to rebuild their relationships that are translated in pedigree-trees and phylogenetic distances.

INTRODUCCIÓN

Determinar si un ejemplar pertenece a una especie u otra, y dentro de la especie que interesa, a una determinada raza pura, no puede realizarse más que de una forma primaria a través de los caracteres externos, dada la falta de estudios y conocimientos sobre caracteres genéticos. Así normalmente suele realizarse por el peso, el color de la capa, la plástica del animal, etc.

Sin embargo, en estos momentos es urgente la identificación genética de cada una de las especies, así como, el estudio de la variabilidad genética que puedan presentar entre ellas y entre poblaciones distintas, con vistas a preservar su patrimonio genético.

Un paso previo a cualquier programa que pretenda preservar un patrimonio genético, consiste en la caracterización de la variabilidad genética en las distintas poblaciones. Esta caracterización permite establecer las diferencias o similitudes genéticas entre las mismas y, por tanto, basándose en dicho conocimiento, evitar aquellas medidas que contribuyan a la erosión genética de la raza, como el cruzamiento con animales de otras razas.

Al existir varias razas que pueden resultar difíciles de diferenciar morfológicamente (todos los ponis de la vertiente cantábrica), es fácil comprender que es necesario establecer criterios seguros para identificar inequívocamente la raza autóctona.

Solo de esta forma se podrá establecer una defensa y conservación de las poblaciones autóctonas.

El estudio de la variabilidad a nivel genético, comprende el nivel morfológico, el cromosómico, el bioquímico y el molecular o ADN. Estos estudios de caracteres inalterables a lo largo de la vida del individuo, son, además, independientes de cualquier manipulación externa ya que ofrecen la ventaja de que su expresión no se haya sometida al efecto del ambiente.

A. ESTUDIOS CROMOSÓMICOS

Cada especie de ser vivo tiene un número y una morfología de los cromosomas propia. Es por ello que resultan de interés de cara a estudios de alteraciones cromosómicas que producen un descenso en la fertilidad, e incluso, una incompatibilidad con la vida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los cultivos celulares se han cultivado mediante la técnica descrita por Burrells y Wells (1977) siguiendo las condiciones para el cultivo de linfocitos a 72 horas. La obtención de metafases se ha conseguido añadiendo colchicina 50 minutos antes del sacrificio (Eldridge, 1985) y utilizando un choque hipotónico. La tinción se realizó con Giemsa después de una fijación en

alcohol-acético durante 48 horas. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss, para su posterior edición. El cariotipo se realizó de acuerdo al estándar del ISCNA de 1989.

RESULTADOS

El Poni Vasco tiene 64 cromosomas (Power, 1990), como corresponde a su especie (*Equus caballus*), en esto no se diferencia de otros caballos domésticos y sí del caballo de Prezwalski que tiene 66. El caballo doméstico tiene 13 pares de cromosomas autosómicos metacéntricos y submetacéntricos, 18 pares de autosomas acrocéntricos y dos cromosomas sexuales sub-

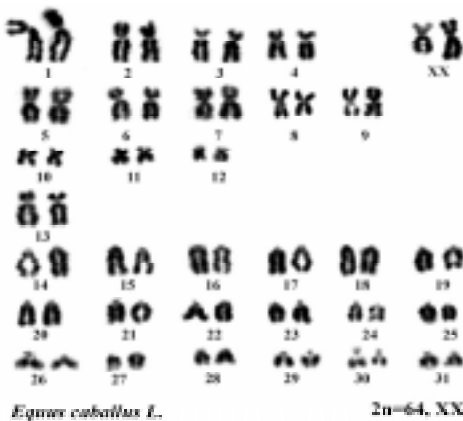


Figura 1. Cariotipo de una yegua. Los cromosomas aparecen ordenados de mayor a menor, observándose tres grupos de cromosomas, metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos. (Karyotype of a mare. The chromosomes appear orderly from bigger to smaller, being observed three groups of chromosomes, metacentrics, submetacentrics and acrocentrics).

metacéntricos X en la hembra, que son, un cromosoma acrocéntrico muy pequeño, Y, y otro X, en el macho (**figura 1**). Han sido numerosas las alteraciones descritas en el caballo, especialmente las trisomías de los cromosomas 23, 26, 28 y 30, así como anomalías en el par sexual: síndrome de Turner y diversos quimerismos, intersexualidad y pseudohermafroditismo (Hare *et al.*, 1979). Sin embargo, tras analizar un total de 22 animales, no se han observado alteraciones cromosómicas de ningún tipo.

B. POLIMORFISMOS PROTEICOS

Se están analizando de forma sistemática y simultánea cinco tipos de proteínas séricas, que también pueden ponerse de manifiesto en el plasma sanguíneo. Se trata de las proteínas siguientes, controladas por *loci* génicos distintos: Proteína de transporte de la vitamina D (GC), Proteína XK (XK), Transferrina (TF) y Post-transferrina (PTF) y Albúmina (AL).

MATERIAL Y MÉTODOS

En estos estudios preliminares se han analizado 22 animales distintos, algunos de ellos supuestamente emparentados en dos familias.

La sangre es recogida utilizando tubos Venoject heparinizados, y se centrifuga para separar plasma y glóbulos rojos. El plasma se congela hasta el momento de analizar sus proteínas. Solo en dos de los animales considerados se dispuso de suero.

Se utiliza gel de poliacrilamida discontinuo como soporte de la electroforesis (Gahne *et al.*, 1977; Gahne y

Juneja, 1978; Juneja *et al.*, 1978). La tinción con azul de Coomassie R-250 pone de manifiesto las diversas bandas proteicas.

RESULTADOS

La técnica aplicada permite la visualización de las variantes de las proteínas siguientes en orden decreciente de movilidad anódica: AL, GC, XK, TF y PTF (**figura 2**).

En el caso de GC, además de los alelos codominantes habitualmente observables (GC*F y GC*S), se ha detectado en el grupo de individuos analizados un alelo más rápido que GC*F, que por analogía con el descrito por Ouragh y Juneja (1994) en caballos marroquíes, se ha denominado GC*D.

En XK se aprecian dos variantes, denominadas respectivamente F y S.

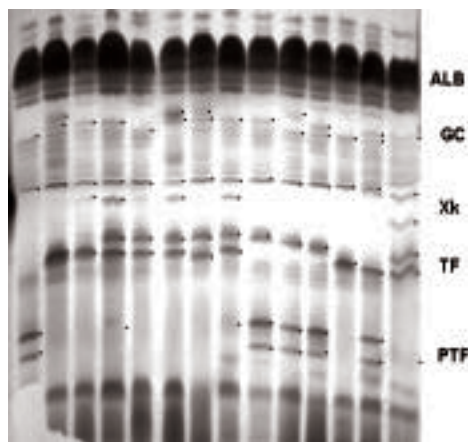


Figura 2. Gel de poliacrilamida con una imagen típica de las diferentes proteínas plasmáticas y sus alelos. (Polyacrilamide gel with a typical image of the different plasmatic proteins and their alleles).

La TF merece una atención especial. Se ha observado la existencia de un individuo que carece de bandas en la región correspondiente a esta proteína, por lo cual se ha considerado como homocigoto para un cierto alelo inactivo de TF, lo que genéricamente se conoce como alelo silente (Yokohama *et al.*, 1980; Schmidt *et al.*, 1990; Bowling, 1991 y Bell *et al.*, 1995).

Es de destacar de este estudio, que es el primero en que se incluye un análisis de variabilidad de PTF en équidos. La variabilidad descrita en el Poni Vasco-Pottoka, se aprecia únicamente en plasma y no en suero. Por otra parte tres de los animales no manifestaron ninguna banda de PTF, sin que se conozca una razón a esta cuestión.

La mayoría de los animales presentan una sola banda rápida muy visible, mientras que algunos de ellos presentan tres bandas, la primera de las cuales presenta la misma movilidad que la banda única de los primeros. Se trata de la típica imagen de una proteína dimérica por lo que los individuos de banda única son los homocigotos PTF*F/PTF*F, y los de tres bandas los heterocigotos (Tejedor *et al.*, 1997).

La **tabla I** muestra las frecuencias genéticas para los *loci* analizados con su correspondiente error estándar, así como su valor de χ^2 de equilibrio y el coeficiente F de consanguinidad.

C. ESTUDIOS DE ADN

Finalmente, es posible en el momento actual, la caracterización de un grupo aislado o raza a partir del análisis directo del ADN.

El ADN presenta una serie de se-

ANÁLISIS GENÉTICOS EN LA RAZA PONI VASCO-POTTOKA

Tabla I. Frecuencias génicas para cada alelo estudiado. Se muestra, además, el error estándar el valor de chi en equilibrio y el coeficiente F de consanguinidad. (Genetic Frequencies for each studied allele. It is shown, also, the standard error, the chi value in genetic equilibrium and the coefficient F of consanguinity).

Locus	Alelo	Frecuencia	Error	CHI	F
GC	GC*D	0,0909	0,043	4,5 (n.s)	0,3033
	GC*F	0,5455	0,0751	-	-
	GC*S	0,3636	0,0725	-	-
XK	XK*F	0,9091	0,0433	0,22 (n.s.)	0,1
	XK*S	0,0909	0,0433	-	-
TF	TF*Silente	0,2343	0,0639	5,52 (n.s.)	-
	TF*D	0,2938	0,0687	-	-
	TF*F1	0,4265	0,0746	-	-
	TF*F2	-	0,0314	-	-
PTF	PTF*F	0,8056	0,0660	1,05 (n.s.)	0,2414
	PTF*S	0,1944	0,0660	-	-

n.s.= $p > 0,05$

cuencias repetitivas, constituidas a su vez, por diferente número de repeticiones de una secuencia corta y muy simple de nucleótidos llamada *core*. Un caso concreto de estas secuencias repetitivas son los ADN-satélites. Estos, son secuencias repetidas en tándem, y constituyen la mayor parte del ADN repetitivo de las células animales. Estas secuencias pueden medir desde unas pocas pares de bases (minisatélites y microsatélites), a varios millones. La variabilidad individual de estas secuencias, viene dada por la variación en el número de repeticiones de la secuencia *core*.

Los fragmentos de ADN individuales que contienen minisatélites se detectan, por complementariedad de bases, con segmentos de ADN de secuencia conocida llamados sondas.

Los minisatélites se pueden encontrar

en muchos lugares diferentes del genoma, y son detectados por la misma sonda o primer para ser posteriormente amplificados por PCR.

En este sentido, cada individuo analizado, queda caracterizado por una serie de fragmentos de ADN que contienen minisatélites y que constituyen una especie de código de barras, tan intrínsecamente individual como una huella dactilar, de ahí que se le conozca como huella dactilar del ADN o *ADN fingerprint*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción de DNA se realizó a partir de 10 ml de sangre periférica completa, en los que se aplicó una variante de la técnica de Sambrock *et al.* (1989). En ambas situaciones, la extracción se completó siguiendo la técnica de Montgomery y Sise (1990),

caracterizada por prescindir del uso de productos contaminantes, del tipo del fenol y el cloroformo, y por proporcionar DNA de elevado peso molecular en cantidades adecuadas para realizar varios fingerprint por individuo.

El ADN una vez cuantificado se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por el método normal (Heriz, 1995; Saava, 1997) utilizando un gel de agarosa al 3 p.100 y bromuro de etidio con el fin de evitar sustancias radiactivas. Se emplearon 9 cebadores no especie específicos que se añadieron a la reacción (2p, 3p, 4p, 5p, 6p, 7p, 8p, 9p y 10p).

El ADN amplificado en la reacción de PCR se dispuso en un gel de agarosa

en una cubeta de electroforesis.

La imagen se obtuvo mediante una pantalla de ultravioletas BIORAD, con un programa que permitió capturar la imagen para su posterior análisis.

RESULTADOS

Los resultados se pueden observar en la **figura 3**.

Se analizaron dos animales de la muestra, un macho y una hembra, con el fin de poner en marcha esta nueva metodología.

Respecto al cebador 2p, no dio resultados en el caballo 13 aunque si en el 15. Por lo tanto, no se pudo extraer ninguna conclusión al respecto. El cebador 3p mostró grandes diferencias entre ambos animales se encontraron en el individuo 15 2 bandas entre 300 y 400 pb, una banda en 300pb, una entre 200 y 300, una de 200 pb y una última entre las 100 y las 200 pb. El individuo 13 sólo comparte una banda entre las 100 y 200 pb. El cebador 4p, no tiene claridad en cuanto a la calle del animal 13. En cuanto a la 5p y 7p, no se ha encontrado variabilidad entre los animales. El cebador 6p presenta en el individuo 13, una banda entre 300 y 400 pb, que le diferencia del 15. El cebador 8p presenta dos bandas por encima de las 200 pb en el animal 15 que no aparecen en el 13, aunque si que comparten las 3 situadas entre las 200 y las 50 pb. El cebador que ha resultado ser más variable en cuanto a número de bandas es el 9p con 7 bandas que aparecen en 15 y no en 13. Este último sólo comparte en esta reacción una banda con 15. Por último el cebador 10p no ha tenido una reacción clara en ninguno de los dos animales.

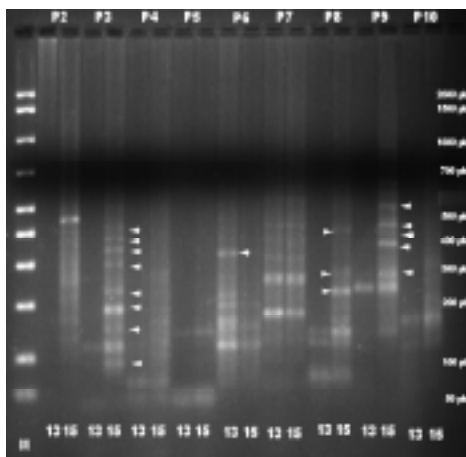


Figura 3. Gel de agarosa que muestra el marcador de pares de bases (M) y los diferentes alelos encontrados para cada cebador (p2-p10) en dos animales, 13 y 15. (Agarose gel that shows the DNA molecular weight marker (M) and the different found alleles for each primer (p2-p10) in two animals, 13 and 15).

ANÁLISIS GENÉTICOS EN LA RAZA PONI VASCO-POTTOKA

En conclusión, y a falta de más análisis, esta técnica de PCR, parece dar más información que la PCR clásica de detección de microsátélites, pues la interpretación de las bandas esta muy cerca de lo que es el fingerprint.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Demetris Saava del departamento de Bioquímica y Fisiología de la Universidad de Reading (Reino Unido) por su inestimable ayuda en la puesta en marcha de la técnica de PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- Bell, K., H. Arthur and M. Breen. 1995. Mutation in the equine plasma transferrin and esterase systems. *Animal Genetics*, 26: 407-411.
- Bowling, A.T. 1991. An unusual transferrin variant in a Throughbred stallion. *Animal Genetics*, 22: 18.
- Burrells, S.C. and P.W. Wells. 1977. *In vitro* stimulation of ovine lymphocytes by various mitogens. *Research in Veterinary Science*, 23: 84-86.
- Gahne, B., R.K. Juneja and J. Grolmus. 1977. Horizontal polyacrilamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrins, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 8: 127-137.
- Gahne, B. and R.K. Juneja. 1978. Polymorphic post-albumin of cattle and horse plasma identified as vitamin D binding protein (Gc protein). *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 9: 37-40.
- Heriz, A. Tesis Doctoral. Ampliación del mapa génico bovino mediante la tecnología de PCR. Universidad de Zaragoza.
- Juneja, R.K., B. Gahne and K. Sandberg. 1978. Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 9: 26:36.
- Montgomery, G.W. and J.A. Sise. 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33: 437-443.
- Long, S.E. 1989. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (ISNCDA). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53: 65-79.
- Pascual, I. 1990. Aportación al mapeo génico en las especies ovina y bovina. Identificación de cada par cromosómico mediante la metodología de la alta resolución. Tesis de Licenciatura. Universidad de Zaragoza.
- Power, M. 1990. Chromosomes of equids. In: Long, S.E. Domestic animal Cytogenetics. Editorial Richard y McFeely Academic Press. New York. Vol. 34.
- Ouargh, L. and R.K. Juneja. 1994. A new allele in the horse Gc system. *Animal Genetics*, 25 (supl. 2): 15.
- Saava, D. 1997. Comunicación personal no publicada.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

PASCUAL MORO *ET AL.*

- Schmidt, D.O., N. Ek and M. Braend. 1990. Further evidence for a silent allele in the transferrin *locus* of the horse. *Animal Genetics*, 21: 423-426.
- Tejedor, M.T., L.V. Monteagudo, J.I. Intxausti, I. Pascual y M.V. Arruga 1997. Variabilidad electroforética de las proteínas plasmáticas del Poni Vasco. I Congreso de la Sociedad Española de Genética 1997, 190.
- Vos, P. R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 21: 4407-4414.
- Yokohama, M., M. Kuwazima, N. Miura, M. Inoue, K. Mogi, T. Hosada and T. Nakajima. 1980. On existence of a silent gene in equine transferrin system. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 15: 331-335.