

Estudio a nivel del DNA de 3 loci tipo I: purina nucleósido fosforilasa (NP), subunidad β del factor de crecimiento nervioso (NGFB) y albúmina (ALB) y sus aplicaciones al conocimiento del mapa bovino.

C. Elduque, S. Marcos, C. Rodellar y P. Zaragoza.

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

INTRODUCCION

La búsqueda de marcadores polimórficos es un objetivo primordial en todos los proyectos dirigidos al estudio del genoma y los mapas genéticos.

La experiencia en la construcción de los mapas génicos del hombre y de los animales ha llevado al reconocimiento de dos clases de loci de utilidad en el desarrollo de los mapas génicos de las distintas especies (O'Brien y Marshall, 1991). La primera clase (Tipo I) son loci de genes codificantes, conservados en las especies mamíferas, que son útiles para comparar las asociaciones de ligamiento y de sintenia de loci homólogos entre especies. La segunda clase de loci (Tipo II) son segmentos de DNA que son áltamente polimórficos en las especies estudiadas (minisatélites, microsátélites, etc). Los loci Tipo II son extremadamente valiosos para aumentar el contenido de información genética en pedigrees seleccionados, pero son menos útiles en los estudios comparativos de evolución, ya que su nivel de conservación entre especies no suele ser lo suficientemente alto para reconocer una homología entre los diferentes especies mamíferas pertenecientes a distintos órdenes.

El desarrollo de los mapas génicos de distintas especies mamíferas ha alcanzado un nivel en el que ha sido posible seleccionar una lista de loci Tipo I (genes codificantes), que pueden servir como marcadores de referencia en los estudios genéticos comparativos de especies mamíferas, e incluso vertebradas en general (O'Brien y cols., 1993). Este grupo de 321 loci de referencia, llamados "anchor loci", han sido seleccionados en base a la información de los mapas génicos de cuatro especies mamíferas -hombre, ratón, vacuno y gato- pertenecientes a cuatro órdenes -primates, roedores, artiodáctilos y carnívoros-.

Este trabajo se centra en la búsqueda de polimorfismo a nivel del DNA en la especie bovina de tres "anchor loci": albúmina (ALB), purina nucleósido fosforilasa (NP) y la subunidad β del factor de crecimiento nervioso (NGFB), como parte del proyecto europeo BOVMAP para el estudio del mapa génico bovino.

MATERIAL Y METODOS

Para ello se han analizado 60 muestras de DNA, pertenecientes a una muestra cogida al azar de individuos de diferentes razas bovinas explotadas en España

(Pirenaica, de Lidia, Frisona, Asturiana de los Valles, Parda Alpina y Avileña). Asimismo se han analizado 67 animales de la raza Limusina integrantes de dos familias de medio hermanos de padre.

Cinco μg de DNA se digirieron con siete enzimas de restricción (BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, MspI, PstI y TaqI), y se sometieron a electroforesis en geles del 0.8% de agarosa y el DNA fue transferido a membranas de nylon, siguiendo la técnica descrita por Southern (1975).

Como sondas se utilizaron dos fragmentos de cDNA de los genes ALB y NP humanos y un fragmento de DNA genómico humano en el caso de NGFB. Las sondas fueron marcadas con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP según el método de Feinberg y Vogelstein (1983). Las membranas fueron hibridadas en una solución de 10% polietilenglicol (PEG 8000), 7% SDS y 1.5X SSPE (20X SSPE= 3M cloruro de sodio, 0.2 M fosfato de sodio, 0.02M EDTA, pH 7.4) a una temperatura de 65°C en el caso de las sondas ALB y NGFB, y a 58°C para NP. Los lavados se realizaron a 60°C en una solución 1.5X SSC, 0.1% SDS para ALB y NGFB, y a 60°C en 2X SSC, 0.1% SDS para NP.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuatro enzimas de restricción HindIII, TaqI, PstI y MspI detectaron polimorfismo en el caso de la ALB, aunque las tres primeras enzimas detectaron variación en un número muy reducido de animales. Con la enzima MspI reveló seis fragmentos polimórficos de 8.4, 8.0, 4.3, 3.8, 3.3 y 3.0 kb. Se comprobó que los fragmentos 3.3 y 3.0 kb se comportaban como alelos codominantes.

En el caso de los estudios realizados en el locus NP, todas las enzimas estudiadas excepto TaqI mostraron polimorfismo. Ocho fragmentos variables se observaron con la enzima HindIII cuyos tamaños fueron 9.4, 5.6, 4.4, 3.1, 2.4, 2.2, 1.9, 1.7 y 1.6 kb, seis fragmentos con EcoRI (10.0, 5.5, 5.0, 4.9, 2.2, 1.5 y 1.4 kb), cinco fragmentos con PstI (4.7, 3.0, 2.7, 2.4 y 2.3 kb), seis fragmentos variables con MspI (3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 2.6 y 2.4 kb), tres con BglII (13.4, 8.2, y 5.9 kb) y tres con BamHI (5.4, 4.9 y 1.4). En el estudio de segregación de los distintos fragmentos se pudo definir dos haplotipos que se comportaban como alelos codominantes: A= 1.4 kb EcoRI; 1.6 kb HindIII; 2.3 kb PstI y B= 1.5 kb EcoRI; 1.7 kb HindIII; 2.4 kb PstI (vease tabla 1).

Con respecto a los estudios realizados sobre el locus NGFB fue la enzima EcoRI la que reveló polimorfismo en las muestras analizadas. Los fragmentos variables detectados presentaron unos tamaños aproximados de 29.5, 25.9, 23.1, 16.6 y 10.4 kb. No se ha encontrado ningún individuo con más de dos fragmentos variables, lo que nos induce a pensar en una relación alélica entre ellos. Sin

embargo, no se ha podido verificar esta hipótesis en los distintos cruces estudiados.

Estos polimorfismos pueden ser utilizados en los estudios de ligamiento genético en la especie bovina que permitirán la comparación de fragmentos cromosómicos conservados entre especies, de utilidad en los estudios de mapeo comparativo y evolución. Asimismo, la descripción de estos polimorfismos puede ser de interés en la búsqueda de marcadores genéticos para caracteres importantes en la producción vacuna.

BIBLIOGRAFIA

- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* **132**, 6-13.
- O'Brien S. J. and Marshall Graves C. (1991). Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogen. Cell Genet.* 1124-1151.
- O'Brien S.J., Womack J.E., Lyons L.A., Moore K.J., Jenkins N.A., Copeland N.G. (1993) Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature genet.* **3**, 103-112
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Genotipos de los Padres	Nº de Progenie con Genotipo						X ²
	AA		AB		BB		
	O	E	O	E	O	E	
AA x AA	18	18	—	—	—	—	—
AA x AB	4	4.5	5	4.5	—	—	0.00 NS
AA x BB	—	1.5	5	5	—	—	0.05 NS
AB x AB	2	3	9	6	1	3	1.88 NS
AB x BB	—	—	2	2	2	2	0.25 NS

Tabla 1.- Herencia de los alelos A=(1.4 kb EcoRI; 1.6 kb HindIII; 2.3 kb PstI) y B=(1.5 kb EcoRI; 1.7 kb HindIII; 2.4 kb PstI) obtenidos en la hibridación del DNA genómico con la sonda NP.

O = valores observados

E = valores esperados

NS = p > 0.05