

## **Alto grado de polimorfismo en el locus $\beta$ hemoglobina (HBB) bovino detectado mediante polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).**

C. Elduque, I. Martín, C. Rodellar y P. Zaragoza.

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

### **INTRODUCCION**

La identificación genética y el obligado establecimiento de pruebas de paternidad quedan lejos hoy de cualquier duda como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos en las distintas razas bovinas. (Zaragoza y cols., 1992).

En países como España en los que la mejora productiva en bovino se realiza principalmente mediante importación de semen, y la incorporación, cada vez más frecuente, de la tecnología de trasplante de embriones (en las que al aumentar las manipulaciones por el hombre se incrementan las posibles atribuciones erróneas de maternidades o paternidades), es necesario que los descendientes atribuidos a un semental o donadora de embriones, lo sean con total seguridad (Zaragoza y Rodellar, 1992).

Hasta ahora, la identificación de animales y el chequeo de parentesco se realiza principalmente mediante el análisis de dos grupos de marcadores genéticos: grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. El desarrollo de la Genética Molecular ofrece una herramienta mucho más poderosa en la detección de nuevos marcadores genéticos (RFLPs o polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción, microsatélites, minisatélites, SSCPs, etc.), para su utilización tanto en tests de paternidad e identificación animal (Gill y cols., 1985; Trommelen y cols., 1992), como en la mejora de producciones (Beckmann y Soller, 1983; Hetzel, 1993), y el conocimiento del genoma bovino (realización de la carta genética bovina) (Womack, 1990; Fries, 1993).

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en la búsqueda, en la especie bovina, de polimorfismos del DNA en un locus que se ha mostrado muy polimórfico en la especie humana, el locus de la  $\beta$  hemoglobina.

### **MATERIAL Y METODOS**

Se han analizado 99 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, Limusina, Parda Alpina y Avileña). y 92

animales emparentados de las razas Pirenaica y Limusina para el estudio de la segregación de los RFLPs encontrados.

Cinco  $\mu\text{g}$  de DNA de cada individuo se digirieron con seis enzimas de restricción (BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, MspI y TaqI). Posteriormente 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).

Para la detección de RFLPs en el locus HBB hemos utilizado una sonda de 1.9 kb de DNA genómico humano marcada con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP. 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. Los lavados se realizaron a 65°C en una solución 1X SSC, 0.1% SDS.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Bajo las condiciones indicadas, hemos detectado polimorfismo con cuatro enzimas de restricción: BglII, HindIII, MspI y TaqI. La enzima TaqI reveló doce fragmentos de restricción polimórficos, cuyos tamaños aproximados fueron 11.8, 11.3, 8.0, 6.8, 6.4, 6.1, 5.0, 4.8, 4.7, 4.6, 3.1 y 1.9 kb. Once fragmentos variantes detectó la enzima MspI, de 8.4, 7.6, 7.0, 6.4, 6.1, 5.2, 3.6, 3.0, 2.3, 1.7 y 1.6 kb. La enzima BglII detectó cuatro fragmentos variables de 11.3, 5.1, 4.9 y 3.7 kb y la enzima de restricción HindIII mostró dos fragmentos polimórficos de 21.7 y 9.4 kb. Los estudios de segregación mostraron que los fragmentos de restricción detectados seguían una herencia mendeliana, puesto que todos los fragmentos presentes en la descendencia se encontraban asimismo en al menos uno de los progenitores.

En la población estudiada hemos observado 35 patrones de restricción diferentes con la enzima TaqI, 15 con MspI, 8 con BglII y 3 con la enzima HindIII. En este trabajo mostramos la distribución en la población estudiada de los distintos modelos o fenotipos revelados con cada una de las enzimas de restricción (a modo de ejemplo vease los resultados obtenidos con la enzima Taq I, mostrados en la tabla 1). Los resultados nos indican que este marcador puede tener gran interés para su posible aplicación en análisis de identificación animal. Por otra parte, estos polimorfismos pueden ser de utilidad en estudios de ligamiento genético con caracteres de interés.

## BIBLIOGRAFIA

- Beckmann J.S. and Soller M. (1983). RFLPs in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67, 35-43.
- Fries D. (1993). Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Anim. Genet.* 24, 111-116.

- Gill B., Jeffreys A.J. and Werret D. J. (1985). Forensic application of DNA fingerprints. *Nature* 318, 577-579.
- Hetzel J. (1993). Livestock genome research on the march. *Nature Genet.* 4, 327-328.
- Trommelen G.M., Den Daas J.H., Viig V. and Vitterlinden A. (1992). DNA profiling of cattle using micro- and minisatellite core probes. *Anim. Genet.* 24, 235-241.
- Zarazaga, I., Zaragoza, P., Rodellar, C., Osta, R., Elduque, C., García, E. y Zarazaga, M. 1992. ¿Mayor, más o mejor? Aportaciones al nuevo reto productivo de la biotecnología genética. *Jornadas Técnicas sobre biología aplicadas a la reproducción animal. Zafra 1992.*
- Zaragoza, P. y Rodellar, C. 1992. Aplicaciones de la Genética Molecular en programas de mejora: algunos ejemplos en ganado vacuno. *Frisona Española* 69: 110-117.
- Womack J.E. (1990). Gene mapping in the cow. *Advances in veterinary science and comparative medicine.* 34, 251-271. Ed:Mc Feeley RA, San Diego, Academic Press.

SONDA	ENZIMA	MODELO*	TOTAL	DE LIDIA	FRISONA	LIMUSINA	PIRENAICA	AVILEÑA	ASTURIANA	PARDA	
			(133)	(27)	(7)	(50)	(28)	(4)	(10)	(7)	
HBB	TaqI	1	60.15	22 22			7.14				
		2	1.50	3 70			3.57				
		3	0.75	3 70							
		4	6.76	3 70		16					
		5	11.27	11 11	28.57	4	10.71	25	10	42.85	
		6	12.03	11.11	42.85	2	7.14	25	40	28.57	
		7	15.03	14.81	14.28	10	28.57	25		14.28	
		8	0.75	3 70							
		9	5.26	3 70			6	7.14			14.28
		10	1.50				4				
		11	4.51				4	7.14		20	
		12	0.75				2				
		13	0.75				2				
		14	4.51			14.28	6	3.57	25		
		15	1.50							20	
		16	0.75				2				
		18	2.25				6				
		19	1.50				4				
		20	1.50				4				
		21	1.50				4				
		22	0.75				2				
		23	0.75				2				
		24	1.50					7.14			
		25	0.75				2				
		26	1.50					7.14			
		27	0.75				2				
		28	0.75					3.57			
		29	0.75					3.57			
		30	1.50				4				
		31	0.75					3.57			
		33	3.01				8				
		34	4.51	4			2			10	
		35	2.25	2			2				

Tabla 1. Distribución en la población estudiada de los fenotipos o modelos obtenidos al hibridar la sonda HBB con el DNA genómico digerido con la enzima TaqI. Entre paréntesis se indica el número de animales testados por raza. (\*) Los modelos 1 a 35 son los indicados en la Figura 21a.