

IDENTIFICACION GENETICA DE GANADO VACUNO MEDIANTE DNA: PRIMEROS RESULTADOS SOBRE ESTANDARIZACION INTERNACIONAL

Romero, A.; Vaquez, F.; Osta, R.; Martín, I.; Rodellar, C. y Zaragoza, P.

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

INTRODUCCION

Gran parte de la mejora de gando bovino en España, depende de la importación de semen y embriones. Las Asociaciones de ganaderos deben evaluar sus toros de forma sistemática, por ello es necesario que los hijos atribuidos a determinados reproductores, lo sean con toda seguridad, por lo que queda claro la necesidad de identificar los animales, para poder realizar los posteriores chequeos de parentesco.

De todos es conocido que según la legislación nacional e internacional la identificación en este momento debe realizarse con grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos (Zarazaga y cols., 1994).

Los continuos descubrimientos sobre los proyectos Genoma, y concretamente del bovino, ha originado que distintos grupos de investigación a nivel internacional estudien la posibilidad de utilizar otro tipo de marcadores a nivel del DNA. . Por esta razón la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) propuso que en su test de Comparación Internacional 1993-94, se realizará la primera prueba de análisis de algunos marcadores a nivel de DNA (además de los marcadores clásicos), con la idea de contrastar posteriormente los resultados obtenidos por los distintos laboratorios.

MATERIAL Y METODOS.

Para la realización de este trabajo se han analizado 129 animales de la especie bovina. Cuarenta muestras fueron enviadas por la ISAG y pertenecen a distintas razas: Holstein, Limousin, Longhorn, Hereford, Brahman, Angus, Simmental, Pinzgauer, Charolais. Las 89 restantes pertenecen a la raza Limousin y son animales emparentados.

Según las indicaciones de la ISAG se han analizado 9 marcadores a nivel dl DNA, 6 proteínas de la leche: CASA1, CASA2, CASB, CASK, LAA, LGB y 3 microsatelites: CYP21, D21S4 e ILSTS005.

La extracción de DNA se realizó a partir de sangre y semen (ROMERO, 1994), aproximadamente 250ng de DNA fueron utilizados en la amplificación .

Cada reacción de amplificación presentó un volumen final de 50 µl que contienen 60 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,01p. 100 de gelatina y 0,1 p. 100

Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 75 pm de cada oligonucleótido cebador, 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM) y una unidad de Taq DNA polimerasa.

Tras la amplificación el fragmento amplificado fue digerido con su específica enzima de restricción para observar los distintos genotipos, excepto en el caso de los microsatélites. Las características de cada PCR y las enzimas utilizadas para la detección del polimorfismo se observan en la Tabla 1.

La visualización de la amplificación se realizó en agarosa al 2%. La visualización de los fragmentos obtenidos tras la digestión con la enzima de restricción se realizó en agarosa al 4% (2% Nueve-2% normal). En el caso del microsatélite de la CASK la visualización del polimorfismo se hizo mediante gel de acrilamida al 6%.

Tabla 1.- Características del análisis del polimorfismo de los marcadores.

LOCUS	CEBADORES	Tº HIBRI. ºC	E. R.
CASK	Leveziel y cols.,1994	42	Hind-III
CASB	Medrano y Sharrow, 1991	59	Msp-I
CASA1	Osta ,1994	57	Hph-I
CASA2	Osta,1994	62	Mnl-I
LGB	Medrano y Aguilar-Córdova,1990	64	Hae-III
LAA	Osta ,1994	62	Msp-I
CYP21	Fries y cols., 1990	62	---
D21S4	Steffen y cols., 1993	58	---
ILSTS005	Brezinsky y cols., 1993	58	---

RESULTADOS Y DISCUSION.

Las 6 proteínas de la leche analizadas muestran dos alelos por locus, siendo importante señalar que en el caso LAA solo los animales provenientes de ganado Zebu han mostrado variación.

En los más de 30 laboratorios que han participado en el test de comparación internacional se han obtenido resultados idénticos, por ello estos polimorfismos de proteínas lácteas, identificadas a partir de DNA, pueden considerarse estandarizados a nivel internacional, tanto a nivel de su metodología, como en la interpretación objetiva de sus alelos (Conclusión de las XXIV International Conference on Animal Genetics, Praga 1994).

Los resultados obtenidos respecto al análisis de los microsatélites del DNA muestran, 15 alelos en el caso del CYP21, 16 alelos en el caso de D21S4 y 5 alelos en

ILST005, todos ellos con herencia mendeliana y codominante. La diferencia entre los alelos más cercanos es de una base.

De los tres microsatelites analizados, el D21S4 resultó, el más eficaz para el chequeo de parentesco, ya que el porcentaje de exclusión (Pe) fué el más elevado (84%) en comparación con los otros dos microsatelites CYP21 e ILSTS005, cuyo porcentaje de exclusión fué del 25% y 14% respectivamente.

Los resultados del test de comparación internacional muestran que la lectura de los microsatelites CYP21 y D21S4 es muy dificultosa, por lo que no ha habido unos resultados idénticos entre laboratorios y no han podido estandarizarse sus alelos. Según las conclusiones de XXIV International Conference on Animal Genetics (Praga 1994), para elegir marcadores a nivel del DNA, que puedan estandarizarse y posteriormente aplicarse en identificación y chequeo de parentesco, debería tenerse en cuenta que no tuvieran excesiva cantidad de alelos, para no dificultar su lectura.

Dado que conviene seguir estudiando las distintas aplicaciones que se obtienen del avance en los conocimientos del DNA, es objetivo del próximo test de comparación (1995-96), elegir de forma consensuada que marcadores son los más adecuados para que su estandarización pueda realizarse a nivel internacional. De esta forma debe quedar asegurada la continuidad de los archivos de marcadores genéticos de los Libros Genealógicos, existentes en las bases de datos de los distintos laboratorios.

BIBLIOGRAFIA.

- BREZINSKY, L.; KEMP, S.S. & TEALE, A.V. (1993). *Animal Genetics* **24**: 73
- FRIES, O.; EGGEN, A. & STRANZINGER, G. (1990). *Genomics* **8**: 403-406.
- LEVEZIEL, H.; RODELLAR, C.; LEROUX, C.; PEPIN, L.; GROHS, C.; VAIMAN, D.; MAHE, M.F.; MARTIN, P. & GROSCLAUDE, F.(1994). *Animal Genetics*, **25** :223-228.
- MEDRANO, J.F & AGUILAR-CORDOVA, E.(1990).*Biotechnology*, **8**: 144-146.
- MEDRANO, J.F. & SHARROW, L.(1991). *J. Dairy Sci.*, **74**: 282.
- OSTA, R.(1994). Tesis Doctoral. Unversidad de Zaragoza.
- ROMERO, A. (1994). Tesis de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- STEFFEN, P.; EEGEN, A.; DIETZ, A.; WOMACK, S.E., STRANZINGER, G. & FRIES, R. (1993). *Animal Genetics*. **24**: 121 - 124.
- ZARAZAGA, I; ZARAGOZA, P.; AMOREAN, B. y RODELLAR, C. (1994). *Mundo Ganadero*, **3**: 70-72