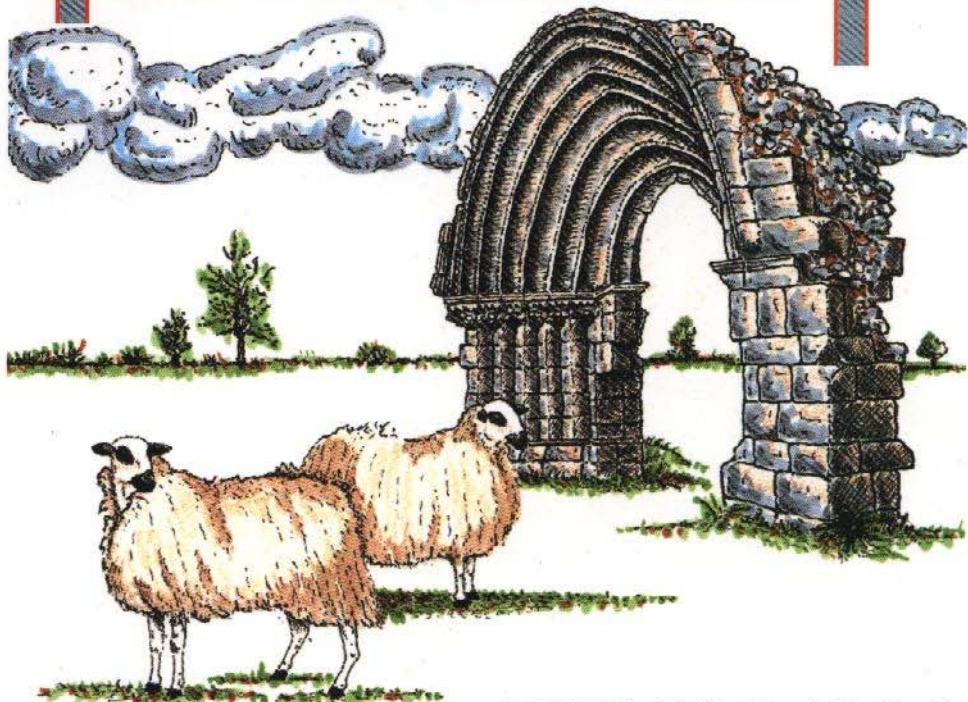




XIX JORNADAS CIENTIFICAS DE LA S.E.O.C.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA



BURGOS 1994



Junta de
Castilla y León

CONSEJERIA DE AGRICULTURA Y GANADERIA

XIX
JORNADAS
CIENTIFICAS
DE LA
S.E.O.C.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA

**XIX
JORNADAS
CIENTIFICAS
DE LA
S.E.O.C.**

Coordinador
Mariano Alonso de Miguel

BURGOS 1994

Coordinación de la edición
Luis Manuel Mediavilla de la Gala

Maquetación, diseño y tratamiento gráfico
Pablo Rodríguez Fernández-Cuesta

Portada:
José Girona Ratzke

Impresión y Encuadernación
Vicente Martín
Angel Temiño
Jesús Rodríguez

Publicaciones de la
Consejería de Agricultura y Ganadería
C/ Ferrári, 7
47001 - VALLADOLID

S.E. nº 14

ISBN: 84-7846-470-0
Depósito Legal: VA-12/96

Impreso en España

Printed in Spain

Imprenta: **Dirección General de Estructuras Agrarias**

CARACTERIZACION GENETICA DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA AGRUPACION CAPRINA CANARIA (A.C.C.)

PALMA MENDEZ, M., J.L. LOPEZ, R. GINES,
A.C. ARGUELLO y J.M. AFONSO.

Sección de Producción Animal. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

RESUMEN

Hemos analizado el ADN mitocondrial de cabras pertenecientes a las tres variedades de la A.C.C. (20 individuos de variedad majorera, 13 individuos de variedad palmera y 26 individuos de variedad tinerfeña), a nivel de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PLFR).

El ADN total fue aislado según el método de Leonard G. David y colaboradores (1986), cortado con enzimas de restricción (BamHI, EcoRI, HaeIII, HindIII, PstI y PvuII), separado en geles de agarosa (desde 0,7 a 1,5%), transferido a membranas de nylon mediante capilaridad (Southern, 1975), hibridado con los clones de ADN mitocondrial de oveja pBUZ-3, pBUZ-13 y pBUZ-19, cedidos por el Dr. J. Montoya, (Curr. Genet. 21, pp.235-240, 1992) y finalmente revelado mediante colorimetría y luminiscencia (Boehringer Mannheim).

La longitud promedio del ADN mitocondrial fue de 15,7 kb. con un total de 32 lugares de restricción, cuyos tamaños oscilaron desde unos 300 pbs. (en HaeIII) hasta unos 12 kbs. (en PstI). Cada enzima mostró como promedio unos 5 fragmentos, los cuales fueron idénticos en las tres variedades de la A.C.C.

INTRODUCCION

El ADN mitocondrial (ADNmt) se ha mostrado como una herramienta útil en estudios de micro y macroevolución (Awise y col., 1979 a, b ; Lansman y col., 1981; Brown, 1980; Brown y Simpson, 1981), por presentar una serie de características diferenciadoras con respecto a los genes nucleares. Así, el ADNmt muestra una tasa de mutación más elevada que los genes nucleares (Brown y col., 1979), es de herencia eminentemente materna (Hutchison y col., 1974; Lansman y col., 1983; Gyllensten y col., 1991; Hoeh y col., 1991) y adolece de recombinación (Birky, 1978; Olivo y col., 1983).

La A.C.C. ha sido objeto de análisis iónicos y proteicos en términos de concentración (Tuñón y col., 1984; Tuñón y col., 1989; García-Casas y col., 1992). Sin embargo no se ha realizado estudio alguno a nivel de ADNmt. En nuestro trabajo caracterizamos el ADNmt de la A.C.C. mediante corte con enzimas de restricción (RFLPs).

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Para el análisis del ADNmt de la A.C.C. se utilizaron muestras de las tres variedades que la constituyen: 20 individuos de la variedad Majorera, 26 de la Tinerfeña y 13 de la Palmera. Todas las muestras procedían de núcleos familiares distintos cuyos ancestros maternos siempre habían sido de las variedades antes mencionadas.

AISLAMIENTO DEL ADN TOTAL.

El ADN total fue purificado a partir de hígado según el método de L.G. David y col. (1986), con algunas modificaciones. Unos 500 mg de tejido se descongelaban sobre hielo, se añadía 10 ml de tampón de homogeneización preenfriado (0,1 M NaCl, 0,2 M sacarosa, 0,01 M EDTA, 0,3 M Tris-HCl pH 8,0) y se homogeneizaba durante 2 min a 3000 r.p.m. con un OMNI-MIXER sobre hielo. Después de añadirle 313 ul de SDS al 20%, se mezcló por inversión y se incubó a 65°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 1,75 ml de acetato potásico 8 M , mezclando por inversión e incubando durante 10min a -20°C. Luego se centrifugó 20 min a 20000g (4°C). Se tomó el sobrenadante al que se añadió un volumen de Fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 12000g durante 5 min a 4°C. El ADN total se precipitó mediante la adición de 1.5 volúmenes de isopropanol frío al sobrenadante y centrifugación a 12000g durante 5 min a 4°C. El sedimento se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en TE 1X, conservándose a 4°C hasta su uso.

TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS.

Las muestras fueron cortadas con siete endonucleasas: HaeIII (que reconoce 4 pares de bases), BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI y PvuII (que reconocen seis pares de bases), siguiendo las recomendaciones del proveedor (Boehringer Mannheim). Las digestiones se corrieron en geles de agarosa (desde un 0,7% a un 1.5%) en TAE 1X y TBE 0.5X, a 2 V/cm. Los geles se tiñeron durante 15 min en una solución de bromuro de etilo (0,5 ug/ml) y se observaron a luz ultravioleta (300 nm).

AMPLIFICACION DE LA SONDA Y MARCAJE.

Para la detección del ADNmt caprino se utilizaron los clones del ADNmt ovino pBUZ-3, pBUZ-13 y pBUZ-19, cedidos por el Dr. J. Montoya de la Universidad de Zaragoza. Se hicieron maxipreparados (Sambrook y col. 1989; WIZARD MAXIPREP System, PROMEGA), se desinsertaron los fragmentos utilizando las enzimas BamHI, HindIII y EcoRI (Villalta y col., 1992) y finalmente se marcaron con digoxigenina según las recomendaciones del proveedor (Boehringer Mannheim).

TRANSFERENCIA Y HIBRIDACION.

Los geles fueron depurinados, desnaturalizados y neutralizados (Sambrook y col. 1989), y los fragmentos de restricción transferidos a membranas de nylon (Hybond-N) mediante capilaridad (Southern, 1975). Los filtros fueron prehibridados, hibridados y revelados según recomendaciones del proveedor (Boehringer Mannheim). Los pesos moleculares de los fragmentos

de restricción fueron estimados usando ADN de Lambda cortado con HindIII y ADN de pBluescript KS(+/-) cortado con AccI, EcoRI y HpaII, y aplicando el método de Schaffer y Sederoff (1981).

RESULTADOS Y DISCUSION

La longitud media estimada del ADNmt de la A.C.C. fue de 15.700 pbs, lo cual concuerda con su estimación mediante microscopía electrónica (Upholt y Dawid, 1977). El número total de lugares de restricción fue de 32, y los tamaños de los fragmentos de restricción oscilaron entre 298 pbs en HaeIII y 14'4 Kbs en EcoRV (ver tabla I).

Cada una de las 7 enzimas mostró un único patrón de bandas (ver tabla I), con lo que una sola nucleoforma apareció en las tres variedades de la A.C.C. Esto contrasta con las diferencias halladas por otros autores en concentraciones iónicas y frecuencias génicas (Tuñón y col., 1984; Tuñón y col., 1989; García-Casas y col., 1992). Estos resultados preliminares parecen poner de manifiesto la reciente historia evolutiva del ganado caprino en el archipiélago, la homogeneidad de la población fundadora, así como la evolución divergente de los ADNs nuclear y mitocondrial de la A.C.C.

Upholt y Dawid (1977) analizaron una Nubiana y una "europea" (un ejemplar perteneciente a la Universidad de John Hopkins, posiblemente La Mancha, Saanen, Toggenburg o Alpina) para las enzimas EcoRI y HindIII. Comparando nuestros resultados para las mismas enzimas en la A.C.C. (ver tabla II), puede observarse como en ambos casos nuestros patrones son los mismos que los del ejemplar "europeo", ya que la Nubiana pierde una diana y gana otra para las enzimas EcoRI y HindIII, respectivamente. Aunque estos datos acercan más el origen materno de la A.C.C. a razas europeas que africanas, estudios más extensos deben ser realizados para clarificar el origen y contenido genético de la A.C.C.

Tabla I. Fragmentos de Restricción de la A.C.C.

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.	NUMERO DE DIANAS DE RESTRICCIÓN.	LONGITUD DE FRAGMENTOS (KBS).
BamHI	4	7'107; 3'372; 3'263; 1'921
EcoRI	5	4'403; 3'847; 3'168; 2'604; 1'172
EcoRV	2	14'440; 1'260
HaeIII	12	2'952; 2'710; 2'616; 1'545; 1'156; 1'082; 0'843; 0'664; 0'611; 0'490; 0'398; 0'298.
HindIII	3	11'290; 2'522; 1'914
PstI	2	12'122; 4'508
PvuII	4	6'302; 5'098; 3'647; 0'724

Tabla II. Fragmentos de Restricción de los ADNmts; A.C.C., Nubiana (NU) y "europea" (EU).

EcoRI			HindIII		
A.C.C.	EU	NU	A.C.C.	EU	NU
---	---	9'0	11'3	12'1	---
4'4	4'7	---	---	---	8'2
3'8	4'0	---	---	---	4'0
3'2	3'3	3'4	2'5	2'4	2'5
2'6	2'6	2'6	1'9	1'6	1'6
1'2	1'2	1'2			

BIBLIOGRAFIA

- AVISE, J.C., R.A. LANSMAN Y R.O. SHADE, (1979a). *Genetics* 92:279-295.
- AVISE, J.C., C.G. DAVIDSON, J. LAREM, J.C. PATTON Y R.A. LANSMAN, (1979b). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:6694- 6698.
- BIRKY, C.W., (1978). *Ann. Rev. Genet.* 12:471-512.
- BROWN,W.M.,M.GEORGE y A.C. WILSON, (1979).*Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 76:1967-1971.
- BROWN, G.G. y M.V. SIMPSON, (1981). *Genetics* 97:125-143.
- BROWN, M.W. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3605-3609.
- DAVID, L.G., M.D. DIBNER y J.F. BATTEY, (1986). *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier.
- GARCIA-CASAS, C., A. MORENO, J. CAPOTE Y M.R. DE LA HABA, (1992). *Small Ruminant Research* 7: 361-368.
- GYLLENSTEN, U., D. WHARTON, A. JOSEFSSON Y A.C. WILSON, (1991). *Nature (Lond.)* 352:255.
- HUTCHINSON, C.A. III, J.E. NEWBOLD, S.S. POTTER Y M.M. EDGELL, (1974). *Nature* 251: 536-538.
- HOEH, W.R., K.H. BLAKELY y W.M. BROWN, (1991). *Science* 251:1488.
- LANSMAN, R.A., R.O. SHADE, J.F. SHAPIRA y J.C. AVISE, (1981). *J.Mol.Evol.* 17: 214-226.
- LANSMAN, R.A., J.C. AVISE, C.F. AQUADRO, J.F. SHAPIRA y S.W. DANIEL, (1983). *Evolution* 37: 1-16.
- OLIVO, P.D., M.J. VAN DE WALLE, P.J. LAIPIS y W.HAUSWIRTH, (1983). *Nature* 306: 400-402.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. y Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed.

- Cold Spring Harbor LABORATORY. COLD SPRING HARBOR. NY. (1989). Southern, E., 1975. J. Mol. Biol. 98: 503.
- TUÑON, M.J., P. GONZALEZ, M. DIAZ y M. VALLEJO, (1984). An.Fac.Vet.León. 30: 127-135.
- TUÑON, M.J., P. GONZALEZ y M. VALLEJO, (1989). Anim.Genet. 20:205-212.
- UPHOLT, W.B. y I.B. DAWID, (1977). Cell. 11: 571-583.
- VILLALTA, M., P. FERNANDEZ-SILVA, B. BELTRAN, L. ENQUITA, M.J. LOPEZ-PEREZ Y J. MONTOYA, (1992). Curr. Genet. 21:235-240.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECEMOS A D. J. CAPOTE (CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA - TENERIFE) Y A D. LUCIO (LA PALMA) LAS MUESTRAS DE LA A.C.C..

ASÍMISMO, AGRADECER AL DR. J. MONTOYA EL QUE NOS HAYA CEDIDO SUS CLONES DE OVEJA.

HA SIDO FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE UNIVERSIDADES E INVESTIGACIÓN DEL GOBIERNO DE CANARIAS (P.I. 91/125 A J.M. AFONSO).