

POLIMORFISMOS DE 13 MICROSATÉLITES EN UNA LINEA SELECCIONADA DE CONEJOS.

J. S. Vicente , M.P. Viudes-de-Castro[†], R. Lavara, E. Mocé.
Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción
Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia
46071-Valencia (España), Jvicent@dca.upv.es
[†]División de Producción Animal
EPSO, Universidad Miguel Hernández
03312-Orihuela, Alicante (España), mp.viudes@umh.es

INTRODUCCIÓN

La identificación de marcadores genéticos suficientemente polimórficos en una especie facilita la elaboración del mapa genético, así como la identificación de un individuo, de una población o quizás la detección de QTL's. De los 157 microsatélites localizados en genes de ADN nuclear detectados en el banco de secuencias nucleótidas de conejo de EMBL por van Lith y Zutphen (1996), 13 han sido descritos por van Haeriges *et al.* (1996) y otros 18 han sido localizados y desarrollados a partir de la construcción de una genoteca de pequeños fragmentos de restricción obtenidos de ADN de estirpes salvajes de *Oryctolagus cuniculus* (Mougel *et al.*, 1997; Surridge *et al.*, 1997). Los estudios realizados con algunos de estos marcadores se han dirigido fundamentalmente a estudios evolutivos y de caracterización de razas de esta especie (Monnerot *et al.*, 1996).

En los trabajos realizados el número de alelos por marcador oscila entre 2 (locus Lap7) y 15 (locus Sol33) presentando la mayor parte de ellos una frecuencia alélica entre 0,14 y 0,25 (4-7 alelos por marcador).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la diversidad alélica de 12 de estos marcadores genéticos sobre individuos de una línea seleccionada de conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 22 conejos machos pertenecientes a la línea R de la U.P.V.. La extracción del ADN se realizó a partir de fragmentos de oreja mediante el kit QIAmp (QIAGEN). La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de 10µl que contenía en torno a 20ng de ADN, 1µM de cada cebador, 100µM de dGTP, dCTP, dTTP, y 5µM de ATP, 0,04µl de dATP- P^{α33} a 3,7*10¹³Bqmmol⁻¹, 75mM de tampón TRIS-HCl (Promega), 1 a 1,5 mM de Cl₂Mg y 0,2 u de Taq-polimerasa (Promega).

Las condiciones de amplificación de cada uno de los microsatélites se describe en la Tabla 2. La extensión final de cada una de las amplificaciones fue de

10 minutos a 72°C. El ADN amplificado fue mezclado con 3 l de solución stop y calentado a 95°C durante 5 minutos antes de cargar un gel desnaturalizante al 6% de poliacrilamida.

Tabla 1. Microsatélites utilizados y nº de alelos observados (van Haeringes <i>et al.</i> 1996, Mougel <i>et al.</i> , 1997; SurrIDGE <i>et al.</i> , 1997).					Tabla 2. Condiciones de amplificación de los microsatélites.		
Locu s	Origen	Nº EMBL	Nº de alelos	Tamaño (pb)	Locus	Cl ₂ Mg/PCR	Ciclo
Sat2	α_{s1} - Caseína	M77195	4	251-253	Sat2	1,0 mM	(94°C-30s/55°C-30s/72°C-30s)*36
Sat3	Mielina P ₂	J03744	7	146-162	Sat3	1,5 mM	(94°C-30s/60°C-30s/72°C-30s)*30
Sat4	α -Caseína	M33582	5	195-240	Sat4	1,0 mM	(94°C-30s/60°C-30s/72°C-30s)*30
Sat5	Clon	X99887	6	206-234	Sat5	1,0 mM	(94°C-30s/60°C-30s/72°C-30s)*30
Sat7	Clon	X99888	6	183-195	Sat7	1,5 mM	(94°C-30s/60°C-30s/72°C-30s)*30
Sat8	Clon	X99889	4	136-158	Sat8	1,0 mM	(94°C-30s/60°C-30s/72°C-30s)*30
Sat12	Clon	X99891	4	122-138	Sat12	1,0 mM	(94°C-30s/55°C-30s/72°C-30s)*30
Sat13	Clon	X99892	5	114-128	Sat13	1,0 mM	(94°C-30s/55°C-30s/72°C-30s)*36
Sat16	Clon	X99890	3	109-115	Sat16	1,5 mM	(94°C-30s/55°C-30s/72°C-30s)*30
Sol33	Clon	X94683	15	189-219	Sol33	1,0 mM	(94°C-30s/52°C-30s/72°C-30s)*35
Sol44	Clon	X94684	9	178-208	Sol44	1,0 mM	(94°C-30s/62°C-30s/72°C-30s)*35
Lap5	MAE		5	112	Lap5	1,0 mM	(94°C-30s/61°C-30s/72°C-30s)*30
Lap6	ANA		6	240	Lap6	1,0 mM	(94°C-30s/61°C-30s/72°C-30s)*30

MAE: Molécula 1 de adhesión endotelial.

AN-A: Arilmanina N-acetiltransferasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de alelos y su frecuencia en los microsatélites evaluados para la línea R (Tabla 3) fue menor que los observados en las estirpes de conejo silvestre que sirvieron para la puesta a punto de estos marcadores y ligeramente inferior a la observada en diferentes razas de conejo (Bolet *et al.*, 2000). El número medio de alelos para los 9 microsatélites (Sat2 a Sat16) en razas como el Gigante de España, la liebre Belga o el Gigante de Flandes es similar a la obtenida en la línea R (3,2) y ligeramente inferior al Blanco de Viena (4,2) frente al conejo silvestre en España (9,1; Vachot, 1996). Los marcadores Sat5, Sol44 y Lap6 no muestran ninguna variabilidad (un sólo alelo de 228, 210 y 232 pb, respectivamente) y sobre todos los marcadores Sol33 y Sol44 evaluados en poblaciones de conejo silvestre en Gran

Bretaña con un elevado número de alelos (9 y 15) tan sólo presentan en la línea R 2 y 1 alelo respectivamente.

Por lo tanto, la diversidad genética derivada del uso de estos marcadores es muy baja y dificulta su utilización dentro de esta línea seleccionada.

Tabla 3. Número y frecuencia de los alelos observados.

Sat2	Sat3	Sat12	Sat4	Sat7	Sat8	Sat13	Sat16	Sol33	Lap5
Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr	Alelo-Fr
249-0.296	164-0.023	134-0.182	241-0.409	195-0.068	156-0.205	128-0.400	113-0.046	214-0.841	120-0.796
247-0.273	162-0.364	130-0.409	238-0.364	191-0.500	140-0.409	120-0.550	111-0.159	207-0.159	110-0.204
241-0.386	158-0.023	126-0.273	195-0.227	183-0.432	136-0.386	114-0.050	109-0.796		
239-0.045	150-0.059	122-0.136							

Alelo-Fr: tamaño del alelo en pares de bases y frecuencia observada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los consejos y ayuda técnica de la Dra. M. Monnerot y N. Dennebouy del CNRS de Gif sur Yvette.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto de CICYT AGF98-0470.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolet, G., Brun, J.M., Monnerot, M. y col. 2000. Evaluation and conservation of european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genetic resources. First results and inferences. VII World Rabbit Congress, Vol A: 281-316.
- Monnerot, M., Loreille, O., Mougél, F., Vachot, A.M., Dennebouy, N., Callou, C., Vigne, J.D. 1996. The European Rabbit: wild population evolution and domestication. VI World Rabbit Congress, Vol 2: 331-334.
- Mougél, F., Mounolou, J-C, Monnerot, M. 1997. Nine polymorphic microsatellites loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* 18: 58.
- SurrIDGE, A.K., Bell, D.J., Rico, C., Hewitt, G.M. 1997. Polymorphic microsatellites loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics* 28: 302-305.
- Vachot, A.M. 1996. Homologies et singularités interspecífiques et intraspécífiques. Tesis Doctoral, Universidad Paris XI Orsay.
- Van Haeringes, W. A., den Bieman, M., van Zutphen, L.F.M., van Lithz, H.A. 1996. Polymorphic microsatellite DNA markers in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Exp. Anim. Sci* 38: 49-57.
- Van Lithz, H.A., van Zutphen, L.F.M. 1996. Characterization of rabbit DNA-microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence data base. *Animal Genetics* 27: 387-395.