

# Análisis molecular de dos poblaciones de guajolotes nativos mexicanos y una línea comercial de pavos por RAPD's

## Molecular analysis of two native turkey populations and a commercial turkey line by means of the RAPD's technique

Juan Gabriel Trigueros Campos<sup>a</sup>, Joel E. López Meza<sup>a</sup>, Horacio Cano Camacho<sup>a</sup>, María Guadalupe Zavala Páramo<sup>a</sup>

### RESUMEN

A pesar de que los guajolotes (*Meleagris gallopavo*) son aves de importancia económica y cultural en nuestro país, hay poca información sobre su genoma. En este trabajo se realizó un avance sobre el establecimiento de la huella de ADN de guajolotes nativos (*M. gallopavo*) y de la línea comercial "Big-6 Large White". A partir de muestras de sangre, se aisló el ADN de 20 individuos de dos poblaciones de guajolotes nativos (Puruarán y Posta Veterinaria) y de 10 individuos de una población de pavos de la línea comercial "Big-6 Large White", y se realizaron ensayos tipo RAPD. Los resultados mostraron un alto nivel de fragmentos polimórficos entre las poblaciones. Se encontraron tres bandas con un tamaño de 920, 702 y 686 pares de bases (pb), altamente conservadas, que podrían ser utilizadas como marcadores dominantes *multilocus*. El análisis de bandas con un tamaño de 1198, 1282 y 462 pb, sugiere que la supuesta población nativa de Puruarán puede ser el resultado de una cruce entre guajolotes nativos y pavos comerciales. Adicionalmente, algunas de las bandas presentes en los pavos comerciales, pueden estar relacionadas con características específicas de interés comercial.

**PALABRAS CLAVE:** Guajolotes nativos, Pavos comerciales, Marcadores moleculares, RAPD's.

### ABSTRACT

Even though native turkey (*Meleagris gallopavo*) is an economically and culturally important poultry species in Mexico, very little genomic information is available. In this study an approach to determine genetic fingerprints of native turkey and of "Big-6 Large White" commercial line was carried out. DNA from 20 individuals from two native populations (Posta Veterinaria and Puruarán) and from 10 of commercial line "Big-6 Large White" was isolated from blood samples and amplified through the RAPD method. A high degree of polymorphic fragments were observed between populations. Three highly conserved bands 920, 702 and 686 base pairs (bp) in size are suggested to be used as multilocus dominant markers. Analysis of 1198, 1282 and 462 bp bands suggest that the population from Puruarán, supposed to be native, probably developed from native x commercial crosses. Some other bands are present exclusively in commercial lines, and could be related to productivity traits.

**KEY WORDS:** Native turkeys, Commercial turkeys, Molecular markers, RAPD's.

Los guajolotes fueron domesticados en México entre los años 200 A.C. y 700 D.C. y llevados a Europa inmediatamente después del descubrimiento de América, tal vez en el año 1500. Su difusión a través de Europa fue muy rápida y a mediados del siglo XVI, su tasa de difusión se estimaba en 40 a 50 km<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, en comparación con los pollos que

Turkeys were domesticated in Mexico between 200 BC and 700 AC and taken to Europe immediately after America's discovery, around 1500 AC. Its dissemination in Europe was very fast and halfway through the XVI<sup>th</sup> century was estimated at 40/50 km<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>, against 2/3 km<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> estimated for chickens when brought from Asia to Europe. Colonists took

Recibido el 30 de abril de 2002 y aceptado para su publicación el 3 de octubre de 2002.

<sup>a</sup> Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Apdo. Postal 53, Administración Chapultepec 58262, Morelia, Mich. Tel. y Fax: (4) 295 80 29 gzavalap@zeus.umich.mx, gzavpar@hotmail.com. Correspondencia y solicitud de separatas al cuarto autor.

se habían traído desde Asia a Europa, los cuales se desplazaron de 1.5 a 3 km<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Los colonizadores llevaron pavos desde Europa hacia el este de Norteamérica a comienzos del siglo XVII. Las aves se hibridaron con el pavo salvaje del Este (*M. silvestris*) resultando la raza Bronceada Americana, la base del pavo comercial actual<sup>(1)</sup>.

En México, la mayoría de los estudios realizados sobre el sistema de producción avícola familiar son descriptivos, basados en encuestas, y se ha hecho muy poco para caracterizar las unidades familiares de producción de las comunidades rurales. El progreso genético de las líneas de pavos comerciales ha registrado el incremento en el tamaño del cuerpo y la conformación de una forma excesiva, sin embargo, también se han registrado pérdidas en la propiedad reproductiva, producción de huevos, fertilidad y empollamiento<sup>(2)</sup>. Varios estudios, indican que el tipo de selección utilizada en el pasado por la industria de criadores de pavos, pudo haber contribuido a los problemas de malformaciones en las patas que sufren los pavos comerciales de crecimiento rápido<sup>(2)</sup>. Uno de los problemas que se presentan, es que no sólo se están perdiendo genes sobre los cuales no se conoce el valor productivo, sino que se pierden otros genes tales como aquéllos cuya expresión pudiera proporcionar resistencia a enfermedades, o características deseables.

Los RAPD's (amplificación al azar de ADN polimórfico), como marcadores moleculares, se han utilizado para analizar la relación y diversidad genética en pollos y pavos, evaluando el polimorfismo generado dentro y entre cuatro líneas de pollos comerciales y dos poblaciones de pavos comerciales (una con períodos productivos amplios y otra de aspecto comercial). En dicho estudio se analizaron 60 oligonucleótidos al azar, de los cuales 42 generaron polimorfismo, permitiendo crear un dendograma que presentó las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Se determinó que las distancias eran más cortas dentro de las especies y más largas entre ellas, lo cual confirma que los RAPD's son aplicables y reproducibles en este tipo de estudios<sup>(3)</sup>. En otro trabajo se utilizó este método para generar patrones de huella molecular útiles

turkeys from Europe to the east coast of North America at the beginning of the XVII<sup>th</sup> century. These birds crossed with the wild turkey of the east (*Meleagris silvestris*), which was the origin of the American Bronze breed, on which today's commercial turkeys are based<sup>(1)</sup>.

In Mexico, most of the studies carried out on family production systems are of a descriptive nature, based on surveys, and very little has been done to characterize family production units in rural communities. Genetic improvement in turkey commercial lines has excessively increased body size and shape, however, has also resulted in decreases in reproductive capacity, egg production, fertility and hatching<sup>(2)</sup>. Several studies indicate that breeding methods used in the past could have contributed to leg malformation seen in fast growing commercial turkeys<sup>(2)</sup>. One of the current problems is not only the loss of genes of unknown productive value, but also capable of providing disease resistance or other desirable characters.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) has been used as molecular markers to analyze the relationship and genetic diversity in chickens and turkeys, assessing polymorphism generated within and among four commercial chicken lines and two commercial turkey populations (one showing a long productive period and another with commercial aptitude). In that study, 60 oligonucleotids were analyzed at random, of which 42 generated polymorphism, allowing to generate a dendogram that showed phylogenetic relationships between populations. Distances were shorter within species and longer between them, which confirm that RAPDs can be applied and reproduced in these kind of studies<sup>(3)</sup>. In another study this method was applied to generate molecular fingerprint patterns to be able to differentiate turkey, hog, chicken, duck and goose meat<sup>(4)</sup>.

Other molecular markers, such as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) have been used to set up genetic fingerprints within and between two different turkey lines, and a great genetic diversity was found in those lines, establishing also a degree of relationship<sup>(5)</sup>. Studies

para diferenciar de manera específica la carne de pavos, cerdos, pollos, patos y gansos<sup>(4)</sup>.

También se ha utilizado otro tipo de marcadores moleculares, como los RFLP's (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) para establecer la huella genética dentro y entre dos diferentes líneas de pavos, encontrándose que existió una gran diversidad genética en esas líneas y estableciendo también el grado de parentesco<sup>(5)</sup>. Se han realizado estudios de diversidad genética en pavos de líneas comerciales, trabajo que sugiere que esta diversidad es similar a la que presentan las líneas comerciales de pollos<sup>(6)</sup>. Se ha intentado el uso de marcadores moleculares de microsatélites de pollos con la idea de facilitar la identificación de genes útiles<sup>(7)</sup> y actualmente debido a la importancia económica mundial, algunos investigadores están trabajando sobre la descripción y caracterización parcial de bancos genómicos de pavo, enriquecidos con secuencias repetidas simples (SSR) con la idea de desarrollar un mapa genético de utilidad pública<sup>(8)</sup>.

La población de guajolotes nativos mexicanos representa un fondo genético, que no ha sido explorado; y el objetivo del trabajo fue su caracterización molecular o conocimiento de su huella genética mediante RAPD's. La obtención de estos datos permitirá a futuro la identificación de bandas de ADN particulares que se consideren como características mendelianas, para ser utilizadas como marcadores moleculares en el mapa del genoma del guajolote, así como en el estudio de segregación de características de interés económico y clínico.

Se seleccionaron 30 guajolotes al azar: 10 guajolotes nativos de una población perteneciente a la Posta veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y proveniente de una colecta de huevos del estado de Guanajuato y Michoacán (20 huevos de Yuriria, Gto., 20 huevos de Tarímbaro, Mich. y 20 huevos de Morelia, Mich.); 10 guajolotes nativos de Puruarán (Municipio de Turicato, Mich.); y 10 pavos de la línea comercial "Big-6 Large White" de una población de una empresa localizada en la ciudad de Morelia, Mich.

on genetic diversity in commercial line turkeys have been carried out and results suggest that this diversity is similar to that found in chicken commercial lines<sup>(6)</sup>. Molecular markers of chicken microsatellites have been tried to use to help identify useful genes<sup>(7)</sup> and currently, due to its global economic importance, some researchers are working on the description and characterization of turkey genomic banks, enriched with simple sequence repeat (SSR) with the idea of building a public good genetic map<sup>(8)</sup>.

The Mexican native turkey population constitutes an unexplored genetic reserve, and the objective of this study was molecular characterization of *Meleagris gallopavo* or knowledge of its genetic fingerprint by means of the RAPD technique. These data could help in the future to identify specific DNA bands considered as mendelian characteristics to be used as molecular markers in the Mexican native turkey's genome map, as well as in studies on segregation of clinic and economic characters.

Thirty individuals were selected at random: 10 Mexican native turkeys from a population in the Posta Veterinaria of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, coming from eggs collected in the States of Michoacán and Guanajuato (20 eggs from Yuriria, Gto., 20 eggs from Tarímbaro, Mich. and 20 eggs from Morelia, Mich.) 10 from a Mexican native turkey population in Puruarán, Mich. and 10 turkeys from commercial line "Big-6 Large White" from a population in a producer's farm in Morelia, Mich. Blood was extracted from the birds wing's external cubital vein through an 0.5 ml insulin syringe. Collected blood was placed in a 10 ml sterile test tube with EDTA and kept at 4 °C until being processed.

DNA was purified through a method modified by Sambrook *et al.*<sup>(9)</sup>. Briefly described, starting from a 200 ml blood sample placed in a 1.5 ml micro tube and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min in an Eppendorff micro centrifuge. The resulting pellet was homogenized with 200 ml of 1.6 % SDS, and 80 ml of a 20 mg l<sup>-1</sup> lysozyme solution was added. This mixture was homogenized and incubated at

Se procedió a recolectar una muestra de sangre de la vena cubital externa de las aves, con una jeringa para insulina de 0.5 ml. La sangre recolectada fue depositada en un tubo de ensaye estéril de 10 ml con etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) y se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento.

La purificación de ADN se llevó a cabo por un método modificado de acuerdo a Sambrook *et al.*<sup>(9)</sup>. Brevemente, se partió de muestras de 200 ml de sangre, que se colocaron en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga (Eppendorf). Se recuperó la pastilla y se agregaron 200 ml de SDS 1.6 % (sodio dodecil sulfato), se homogenizó la mezcla y se agregaron 80 ml de solución de lisozima (20 mg/ml). Después de la homogenización de la mezcla, se incubó durante 20 min a 37 °C y se agregaron 290 ml de acetato de amonio 7.5 M, y se mezcló por inversión. Después de una nueva incubación por 5 min a temperatura ambiente, se agregó un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se homogenizó y centrifugó a 12,000 rpm por 10 min en una microcentrífuga. Se recuperó el sobrenadante y se precipitaron los ácidos nucleicos con dos volúmenes de etanol absoluto. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70 %, y después de dejarla secar se resuspendió en 100 ml de agua destilada, desionizada, estéril. Posteriormente, las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en una cámara de electroforesis (Owl Electrophoresis System). El gel se corrió a 70 voltios por 4 h en TBE (Tris-base 45 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.3)<sup>(9)</sup>. Se utilizó el marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder como estándar para la determinación del tamaño molecular (Gibco). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.3 mg/ml), vistos en un transiluminador de luz ultravioleta a 302 nm y fotografiados en un equipo de fotodocumentación (Eagle Eye II).

Los ensayos de RAPD's se realizaron por medio de un sistema comercial (RAPD Analysis Beads, Amersham), en un termociclador (Deltacycler System Ericomp). Cada mezcla de reacción (25 ml de volumen total) contenía 50 ng de ADN y 25 pmol de un oligonucleótido de secuencia aleatoria

37 °C for 20 min after which 290 ml of ammonium acetate 7.5M were added and mixed thoroughly. After a new 5 min incubation period at room temperature, one volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) was added, homogenized and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min in a micro centrifuge. The liquid phase was recuperated and nucleic acids were precipitated with 100 % ethanol. The resulting pellet was washed twice with 70 % ethanol and after drying was resuspended in 100 ml of deionized, sterile distilled water. Afterwards, these samples were separated by electrophoresis in a 1 % agarose gel in an electrophoresis chamber (OWL Electrophoresis System). This gel was run at 70 volts for 4 h in TBE, 8.3 pH<sup>(9)</sup>. A 1kb DNA Ladder was used as a molecular size marker as a standard for molecular size determination (Gibco). Gels were dyed with ethidium bromide (0.3  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), observed with ultraviolet light at 302 nm and photographed with an Eagle Eye II system.

The RAPD assays were carried out by means of a commercial system (RAPD Analysis Beads, Amersham), in a thermocycler (Deltacycler system Ericomp). Each test sample consisted of 50 ng DNA in 25 ml total volume and 35 pmol of a random sequence oligonucleotide (RAPD Analysis Beads, Amersham). Amplification was carried out under the following conditions: one cycle at 95 °C for 5 min followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min, 36 °C for 1 min and 72°C for 2 min. A group of 6 commercial oligonucleotides (Ready To Go, Pharmacia-Amersham) was used to carry out an amplification of a Mexican native turkey DNA sample and to choose some of them for the RAPD assays: 1)= 5'-d[GGTGCGGGAA]-3', 2)= 5'-d[TTTCGCTCC]-3', 3)= 5'-d[GTAGACCCGT]-3', 4)= 5'-d[AAGAGCCCGT]-3', 5)= 5'-d[AACGCGCAAC]-3' and 6)= 5'-d[CCCGTCAGCA]-3'. Once amplification was finished, the resulting products were size fractionated onto agarose 2 % gel in an electrophoresis chamber (Owl Electrophoresis System). This gel was run at 40 volts for 4 h in TBE<sup>(9)</sup>. A 1kb DNA Ladder was used as a molecular size marker as a standard for molecular size determination (Gibco). Gels were dyed with ethidium bromide (0.3  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), observed with

(RAPD Analysis Beads, Amersham). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 5 min seguido por 45 ciclos a 95 °C por 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 2 min. Se utilizó un grupo de seis oligonucleótidos obtenidos comercialmente (Ready To Go, Pharmacia Amersham), para llevar a cabo la amplificación de una muestra de ADN de guajolote y seleccionar alguno de ellos para los ensayos de RAPD: 1)= 5'-d[GGTGCGG GAA]-3', 2)= 5'-d[GTTTCGCTCC]-3', 3)= 5'-d[GTAGACCCGT]-3', 4)= 5'-d[AAGAGCCCG T]-3', 5)= 5'-d[AACGCGCAAC]-3' y 6)= 5'-d[CCCGT CAGCA]-3'. Una vez terminada la amplificación, los productos se separaron en un gel de agarosa al 2 % en una cámara de electroforesis (Owl Electrophoresis System). El gel se corrió a 40 voltios por 4 h en TBE<sup>(9)</sup>. Se utilizó el marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder como estándar de tamaño molecular (Gibco). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.3 mg/ml), vistos en un transiluminador de luz ultravioleta a 302 nm y fotografiados en un equipo de fotodocumentación (Eagle Eye II).

Las fotografías de los geles de RAPD's se analizaron en el software RFLPscan 2.1 (Scanalytics), a través del cual se calcularon de manera automática los pesos moleculares de los fragmentos amplificados y se obtuvo la estimación de los índices de similitud y de polimorfismo<sup>(10)</sup> de las tres poblaciones de guajolotes.

En general las 30 muestras de ADN analizadas se presentaron íntegras, al observarse una banda nítida sin degradaciones visibles. Adicionalmente, la técnica de extracción eliminó el ARN, el cual no fue visible en los geles ni como producto de degradación, al adicionar desde el inicio de la extracción el detergente SDS, de manera que no fue necesario hacer una limpieza final con el mismo SDS o RNAsa como recomiendan los protocolos<sup>(11)</sup>.

Inicialmente, con el propósito de seleccionar un oligonucleótido para la amplificación de las 30 muestras de ADN, se prepararon reacciones con seis alícuotas de 50 ng de ADN de uno de los guajolotes de la población de la Posta veterinaria,

ultraviolet light at 302 nm and photographed with an Eagle Eye II system.

The photographs were analyzed by means of a RFLPscan 2.1 software (Scanalytics), through which molecular weights of the amplified fragments were calculated automatically and a similarity index and polymorphism was estimated for each one of the three Mexican native turkey populations.

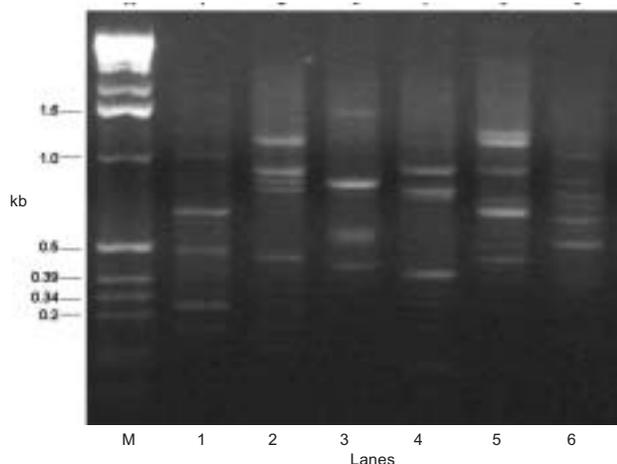
In general all of the 30 DNA samples were complete, as a sharp band without visible degradations could be observed. Besides, the extraction technique used eliminated all of the RNA, which wasn't visible either in gels or as a degradation product, adding from the beginning SDS detergent, in such way that no final cleaning, in accordance with recommendations in the corresponding protocols<sup>(11)</sup> with SDS o RNase, was necessary.

At the beginning, with the purpose of choosing an oligonucleotid for amplification of the 30 DNA samples, reactions with six proportional 50 ng of DNA from one individual of the Mexican native turkey Posta Veterinaria population were set up, and tested with the available six random sequence oligonucleotides (Figure 1). From among them number 5 (5'-d[AACGCGCAAC]-3' 5'-d[AACGCG CAAC]-3') (lane 5) was chosen because it showed product sizes (0.5 to 1.5 kb) and fragment quantity adequate for this study.

In Figure 2, lanes 1 to 10 show DNA amplification results for individuals of the Posta Veterinaria Mexican native turkey population. As can be seen, a low variation band pattern is present and of the three populations analyzed in this study, this one showed an intermediate band quantity. In accordance with test results from a 48 band total, 20 are shared inside the group, with a 41.6 % similarity index and 58.3 % polymorphism, in which the main shared bands were 920 and 702 pb (100 %). A 686 pb fragment was amplified in 80 % of the individuals, a 318 pb was present in 60 %, two fragments of 517 and 1198 pb were present in 50 % and one 803 pb fragment in 40 % of the individuals. A 1282 pb band was observed in 3 individuals (30 % of the total) (Figure 2, lanes 1, 5 and 10).

Figura 1. Amplificación al azar (RAPD's) del ADN de un guajolote nativo de la Posta veterinaria, con 6 oligonucleótidos de secuencia aleatoria.

Figure 1. Posta Veterinaria native turkey DNA RAPD with 6 random sequence oligonucleotids



2 % agarose gel with TAE buffer, dyed with ethidium bromide.

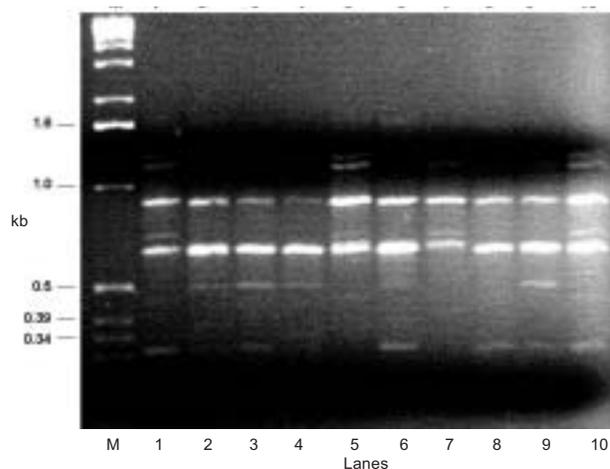
Lane M= 1 kb DNA Ladder molecular size marker. Lanes 1 to 6= oligonucleotid band pattern.

y se probaron los seis oligonucleótidos de secuencia aleatoria con que se contaba (Figura 1). Se seleccionó de entre ellos el oligonucleótido No. 5 (5'-d[AACGCGCAAC]-3') (carril 5) debido a que presentó un tamaño de productos (0.5 a 1.5 kb) y cantidad de fragmentos adecuados para el estudio.

En la Figura 2, los carriles 1 a 10 muestran los resultados de la amplificación de ADN de los individuos de la población de guajolotes nativos de la Posta veterinaria. Como se puede observar, se presentó un patrón de bandeo poco variado, y de las tres poblaciones utilizadas en el estudio, ésta presentó un número intermedio de bandas. De acuerdo al análisis, de un total de 48 bandas, 20 son compartidas dentro del grupo, con un índice de similitud de 41.6 % y un índice de polimorfismo de 58.3 %, donde las principales bandas compartidas fueron de 920 y 702 pb (100 %). Se amplificó un fragmento de 686 pb en el 80 % de los individuos; uno de 318 pb se presentó en el 60 %; dos fragmentos de 517 y 1198 pb en el 50 % y otro fragmento de

Figura 2. Patrón electroforético obtenido por RAPD's con 10 muestras de ADN de guajolotes nativos de la Posta

Figure 2. Electrophoretic pattern obtained through RAPD in 10 Posta Veterinaria native turkey samples



2 % agarose gel with TAE buffer, dyed with ethidium bromide.

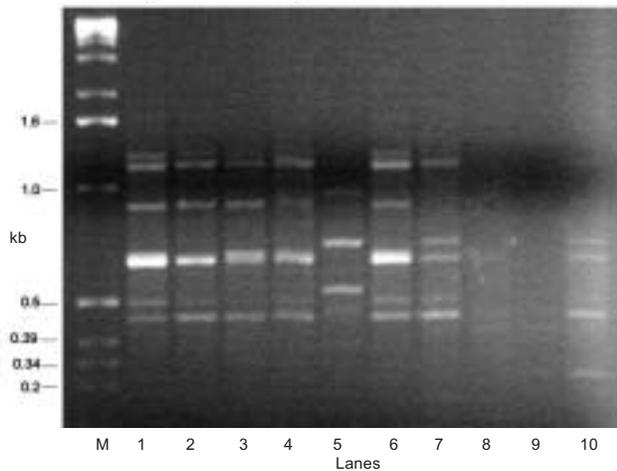
Lane M= 1 kb DNA Ladder molecular size marker. Lanes 1 to 10= band patterns.

In Figure 3, lanes 1 to 10 show DNA amplification results of individuals belonging to the Mexican native turkey Puruarán population. This group showed a very homogenous banding pattern, similar to that of the commercial turkey population. Of the 45 bands, 21 are shared within the group, with a 46.6 % similarity index and 53.3 % polymorphism, in which the main shared fragments within the population were 1192 and 462 pb (87.5 %), 517 pb (75 %), 1282, 920 and 686 pb (62.5 %) and 702 pb (50 %). Bands 995 and 560 pb (lane 6) were amplified in only one individual of this population, which weren't detected in individuals belonging to the other two populations. A 318 pb (lane 10) fragment was amplified from one individual (12.5 %). No DNA samples amplified in lanes 8 and 9, so they were eliminated from the statistical analysis.

In Figure 4, lanes 1 to 10 show DNA amplification results for individuals belonging to the "Big-6 Large White" commercial turkey population. This group

Figura 3. Patrón electroforético obtenido por RAPD's con 10 muestras de ADN de guajolotes nativos de Puruarán.

Figure 3. Electrophoretic pattern obtained through RAPD in 10 Puruarán native turkey samples



2 % agarose gel with TAE buffer, dyed with ethidium bromide

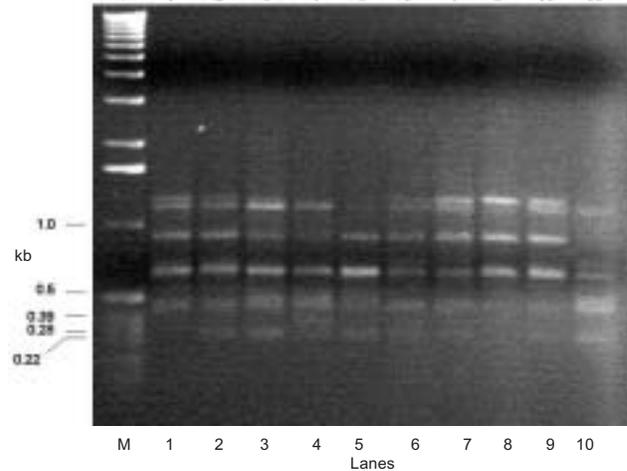
Lane M= 1 kb DNA Ladder molecular size marker. Lanes 1 to 6= oligonucleotid band pattern.

803 pb en el 40 % del total. Una banda de 1282 pb se presentó en tres individuos (Figura 2, carriles 1, 5 y 10), es decir en un 30 % del total.

En la Figura 3, los carriles 1 a 10 muestran los resultados de la amplificación de ADN de los individuos pertenecientes a la población de guajolotes nativos de Puruarán. Este grupo presentó un patrón de bandeado muy homogéneo y similar al patrón presentado por los pavos comerciales, con un total de 45 bandas, de las cuales 21 son compartidas dentro del grupo, con un índice de similitud de 46.6 % y un índice de polimorfismo de 53.3 %. Los principales fragmentos compartidos dentro de la población son de 1198 y 462 pb (87.5 %), 517 pb (75 %), 1282, 920 y 686 pb (62.5 %) y 702 pb (50 %). Se amplificaron bandas de 995 y 560 pb (carril 6) en un solo individuo de esta población, las cuales no se detectaron en ningún otro individuo de las otras dos poblaciones. Se amplificó un fragmento de 318 pb (carril 10) a

Figura 4. Patrón electroforético obtenido por RAPD's con 10 muestras de ADN de pavos de la línea comercial "Big-6 Large White".

Figure 4. Electrophoretic pattern obtained through RAPD in 10 commercial line "Big-6 Large White" turkeys



2 % agarose gel with TAE buffer, dyed with ethidium bromide

Lane M= 1 kb DNA Ladder molecular size marker. Lanes 1 to 6= oligonucleotid band pattern.

showed the greater band number (68 in total) of which 40 are shared, with a 58.8 % similarity index and 41.1 % polymorphism. The main shared fragments were those of 686 pb (100 %), 920 and 462 pb (90 %), 1282, 1198 and 318 pb (80 %), 803 pb (60 %) and 702 pb (50 %). A 517 pb fragment was present in four individuals.

Outstanding results are concentrated in Table 1. Comparisons between the three populations showed, in general, a high degree of polymorphic fragments, with molecular weight ranging from 1300 to 300 pb. However, the native turkey Puruarán population and the commercial turkey Big-6 line were more homogenous between them than with the Posta Veterinaria native turkey population.

Most of the generated bands are either shared or dominant<sup>(11,12)</sup>, with variations in proportion in each band for all populations. Well conserved bands at 920, 702 and 686 pb were found in all three

partir de un solo individuo, representando el 12.5 % del total. En los carriles 8 y 9 las muestras de ADN no amplificaron, por lo cual se eliminaron del análisis estadístico.

En la Figura 4, los carriles 1 a 10 muestran los resultados de la amplificación de ADN de los individuos pertenecientes a la población de pavos comerciales "Big-6 Large White". Este grupo presentó el mayor número de bandas, con un total de 68, de las cuales 40 son compartidas, con un índice de similitud de 58.8 % y un índice de polimorfismo de 41.1 %. Los principales fragmentos compartidos fueron los de 686 pb (100 %), de 920, y 462 pb (90 %), de 1282, 1198, y 318 pb (80 %), de 803 pb (60 %) y de 702 pb (50 %). Un fragmento de 517 pb se presentó en cuatro individuos.

Los resultados más sobresalientes de los análisis de las tres poblaciones se condensan en el Cuadro 1. La comparación entre las tres poblaciones de guajolotes nativos y pavos comerciales "Big-6 Large White", de manera general mostró un alto nivel de fragmentos polimórficos, con un peso molecular dentro del rango de 1300 a 300 pb. Sin embargo, la población de guajolotes nativos de Puruarán y los pavos comerciales Big-6 fueron más homogéneos entre sí que respecto a la población de guajolotes nativos de la Posta.

La mayoría de las bandas generadas son compartidas o de herencia dominante<sup>(11,12)</sup>, encontrándose variaciones en la proporción de cada banda para cada población. Se encontraron bandas de 920, 702 y 686 pb muy conservadas en las tres poblaciones (Figuras 2,3,4); entre los guajolotes

populations (Figures 2,3,4), all individual of the native turkey Posta Veterinaria population showed 920 and 702 pb bands and 80 % a 686 pb band. In the Puruarán population, 62.5 % showed the 920 and 686 pb bands and only 50 % the 702 pb band. In the commercial turkey population, 100 % showed the 686 pb band, 90 % the 920 pb band and in 50 % of these the 702 pb band was detected, because of which, they could be considered as dominant *multilocus*<sup>(12)</sup> markers for native turkeys.

The analysis of other bands suggests that the Puruarán alleged native turkey population could be the result of a cross between native and commercial turkeys, thus establishing blood ties<sup>(3)</sup>. A 1198 pb band was found conserved in 87.5 % of the Puruarán population and in 80 % of commercial turkeys but only in 50 % of the Posta Veterinaria individuals. Two bands, 1282 and 462 pb, were found conserved in 62.5 and 87.5 % in the Puruarán population and in 80 and 90 % of the commercial turkeys respectively. But in the Posta Veterinaria population the 1282 pb was conserved poorly (40 %) and the 462 pb wasn't generated at all. The Puruarán and Big-6 populations (Figure 4) share bands that could be related to some characteristics of specific commercial interest<sup>(11)</sup>, which are barely conserved in the Posta Veterinaria population.

Additionally, a 318 pb band was found conserved in the Posta Veterinaria (60 %) and commercial turkeys (80 %) but only in 12.5 % of the Puruarán individuals and a 803 pb band was found in the Posta Veterinaria (40 %) and commercial turkey (80 %) populations, but scarcely in Puruarán

Cuadro 1. Resultados obtenidos de los análisis de los RAPD's de las tres poblaciones de guajolotes.

Table 1 Results obtained through RAPD in the three native and commercial turkey populations.

	Molecular weight range (bp)	Number of individuals	Polymorphism Index (%)	Bands Total
Posta Veterinaria native turkeys	307-1309	10	58.33	48
Puruarán native turkeys	318-1299	8	53.33	45
Big-6 Large White commercial turkeys	313-1263	10	41.17	68

RFLPscan v 2.1 software was used for obtaining variables.

bp = Base pairs.

nativos las bandas de 920 y 702 pb se presentaron en todos los individuos y un 80 % de ellos presentó la banda de 686 pb; entre los guajolotes de Puruarán se encontró en un 62.5 % las bandas de 920 y 686 pb, y sólo el 50 % mostró la banda de 702 pb, y entre los pavos comerciales, el 100 % de los individuos presentó la banda de 686 pb, el 90 % la de 920 pb y en el 50 % de éstos se detectó la banda de 702 pb, por lo cual podrían ser consideradas como marcadores dominantes *multilocus*<sup>(12)</sup> de los guajolotes.

El análisis de otras bandas sugiere que la supuesta población nativa de Puruarán puede ser el resultado de una cruce entre guajolotes nativos tales como los de la Posta y pavos comerciales, estableciéndose así relaciones de parentesco<sup>(3)</sup>. Se encontró una banda de 1198 pb, 87.5 % conservada entre los guajolotes de Puruarán y 80 % en los pavos comerciales, pero sólo en un 50 % en los guajolotes de la Posta. Se encontraron dos bandas de 1282 y 462 pb 62.5 y 87.5 %, conservadas en los guajolotes de Puruarán, y 80 y 90 % en los pavos comerciales respectivamente. Pero en los guajolotes de la Posta la banda de 1282 se encontró poco conservada (40 %) y la banda de 462 pb no se generó. Las poblaciones de guajolotes nativos de Puruarán y los pavos comerciales Big-6 (Figura 4), son individuos que comparten bandas que pueden estar relacionadas con alguna o algunas características específicas de interés comercial<sup>(11)</sup>, que se encuentran muy poco en los guajolotes nativos de la Posta.

Adicionalmente, se encontró una banda de 318 pb, conservada entre los guajolotes de la Posta (60 %) y en los pavos comerciales (80 %), pero no conservada en los guajolotes de Puruarán (12.5 %), y se encontró una banda de 803 pb en los guajolotes de la Posta (40 %) y en los pavos comerciales (60 %), pero no se generó en los guajolotes de Puruarán. En general los datos correlacionaron con la idea de que a mayor selección se obtienen poblaciones más homogéneas, cuyo índice de similitud se ve incrementado con una consecuente disminución del índice de polimorfismo. Esto se puede explicar, si se considera que los pavos comerciales son individuos que están cruzados por consanguinidad tratando de conservar un solo fenotipo, de manera

individuals. In general, the data obtained corroborated the idea that for more selection a more homogenous population is obtained, whose similarity index shows an increase as the polymorphism index decreases. This can be explained by the fact that the commercial turkey population is made up by individual crossed in consanguinity trying to conserve only one phenotype, in such way that variability of the dominant marker bands<sup>(12)</sup> is lower when compared to that of the other two populations. Through selection, breeders have tried to obtain certain desirable commercial characteristics in a given population, and these phenotypic characteristics are conserved and therefore a certain genotype or genetic material.

The Puruarán population proved to be very homogenous. However, an individual was quite different which showed two polymorphic bands, 995 and 560 pb, which weren't found in the other individuals of this population nor in individuals of the other two populations. These bands should be looked for in DNA samples of populations different from those in this study.

The RAPD assay is a technique that generates *multilocus* markers which allow for its use in the generation of molecular fingerprints and identification of anonymous genes and analysis of quantitative characteristics. Therefore, it could be possible that in the future associate the bands conserved in commercial turkeys and not in the Posta Veterinaria native turkeys with those desirable commercial characteristics, as well as to associate bands conserved in the Posta Veterinaria population and not in commercial turkeys with characteristics of native turkeys, and which could be of importance if associated to disease resistance, productivity, etc.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our gratitude to Dr. Aureliano Juárez-Caratachea for his help in the collection of blood samples from the Posta Veterinaria individuals.

que la variabilidad de bandas de marcadores dominantes<sup>(12)</sup> es menor en comparación con las otras dos poblaciones. Con la selección los criadores pretenden obtener características comercialmente deseables de una población determinada, con lo cual se van conservando particularmente estas características fenotípicas, y por ello cierto material genético o genotipo.

La población de guajolotes nativos de Puruarán resultó ser muy homogénea, sin embargo, hubo un individuo diferente que presentó dos bandas polimórficas, una de 995 y otra de 560 pb, que no se encontraron dentro de la misma población ni en las otras dos poblaciones de este estudio, por lo cual se debe analizar si se presentan en nuevas muestras de ADN de otras poblaciones distintas a las de este estudio.

El ensayo tipo RAPD es una técnica que genera marcadores *multilocus*, que permiten su aplicación en la generación de huellas moleculares e identificación de genes anónimos y el análisis de características cuantitativas, por ello, es posible que en el futuro se pueda asociar las bandas que se presentan en pavos comerciales y no en guajolotes de la Posta con aquellas características deseables comercialmente, así como asociar las bandas que conservan los guajolotes de la Posta y no los pavos comerciales con características propias de los guajolotes nativos, y que pueden ser importantes si se asocian con resistencia a enfermedades, productividad, etc.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Aureliano Juárez Caratachea por la ayuda brindada para la colecta de las muestras

de sangre de los guajolotes nativos ubicados en la Posta Veterinaria de la FMVZ-UMSNH.

## LITERATURA CITADA

1. Crawford RD. Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkeys from the Americas. Archivos de Zootecnia. Córdoba, España: Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba; 1992.
2. Sánchez CJJ. Comportamiento productivo del pavo nativo mexicano. Heredabilidad del peso corporal e índice de eficiencia alimenticia [tesis licenciatura]. México, Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 1999.
3. Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor JK. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. *Poult Sci* 1996;75(5):579-584.
4. Calvo JH, Zaragoza P, Osta R. Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry paté. *Poult Sci* 2001;80:522-524.
5. Zhu JK, Nestor E, Patterson RA, Jackwood DJ, Emmerson DA. Measurement of genetic parameters within and between turkey lines using DNA fingerprinting. *Poult Sci* 1996;75(4):439-446.
6. Ye X, Zhu J, Velleman SG, Nestor KE. Genetic diversity of commercial turkey primary breeding lines as estimated by DNA fingerprinting. *Poult Sci* 1998;77(6):802-807.
7. Liu Z, Crooijmans RP, van der Poel J, Groenem M. Use of chicken microsatellite markers in turkey: a pessimistic view. *Anim Genetics* 1996;27:191-193.
8. Huang HB, Song YQ, Hsei M, Zahorchak R, Chiu J, Teuscher C, Smith EJ. Development and characterization of genetic mapping resources for the turkey (*Meleagris gallopavo*). *J Hered* 1999;90:240-242.
9. Sambrook J, Rusell DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed New York, USA: Spring Harbor Lab. Press; 2001.
10. RFLPscan, User Manual. Scanalytics, A Division of CSPI. Stratagene Cloning Systems. La Jolla California, USA. 1994;91:9-16.
11. Sunnuks P. Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 2000;15:199-203.
12. Hurme P, Savolainen O. Comparison of homology and linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of Scots pine (*Pinus silvestris* L.). *Mol Ecol* 1999;8:15-22.