ESTUDIO DE LAS RELACIONES DE LIGAMIENTO ENTRE MICROSATÉLITES DEL CROMOSOMA 6 EN EL GANADO OVINO DE RAZA CHURRA

Diez-Tascón C., Bayón Y., Arranz, J.J. y San Primitivo F.
Dpto. Producción Animal I, Universidad de León

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha logrado un importante avance en la elaboración de los mapas genéticos de las especies domésticas. En particular, los mapas de ligamiento, obtenidos mediante estudios de segregación familiar, han experimentado un importante impulso con la aparición de los marcadores de tipo microsatélite. La principal característica de estos marcadores es su elevado polimorfismo, siendo utilizados como loci "ancla" de referencia en la integración de los mapas físicos y de ligamiento. En cuanto al mapa de ligamiento ovino, el cromosoma objeto de mayor atención ha sido el 6, debido a que en él se ha localizado la mutación *Fec*B, responsable del fenotipo Booroola, además de los genes de las caseínas. Este cromosoma representa aproximadamente el 4,31% del genoma ovino (MATEJKA & CRIBIU, 1987) y presenta homología con el 6 bovino, el 4 humano, el 3 y el 5 murinos y el 8 porcino (LORD et al., 1996).

Los datos de ligamiento publicados en esta especie (CRAWFORD et al., 1995; MADDOX et al., 1996; de GORTARI et al., 1998), realizan estimaciones promedio de la frecuencia de recombinación, a partir de varias familias en las que intervienen diferentes razas ovinas. Sin embargo, la frecuencia de recombinación se encuentra influida por factores que, en ocasiones, no se encuentran totalmente contrastados, tales como: sexo, edad, familia, población, etc. (OTT, 1991). En nuestro estudio se analizan los datos de ligamiento para 12 microsatélites del cromosoma 6, a partir de la descendencia correspondiente a 10 sementales de raza Churra, con el objetivo de obtener un mapa de ligamiento conjunto y, por otra parte, posibilitar un análisis individual para cada familia que permita detectar posibles diferencias en la frecuencia de recombinación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre familias de ovejas medio-hermanas, descendientes de 10 sementales pertenecientes al núcleo de selección de la raza Churra. El número de hijas analizadas para cada familia se incluye en la Tabla 1, ascendiendo a un total de 879 ovejas. En la misma tabla se indican las 12 secuencias de tipo microsatélite del cromosoma 6, elegidas a partir de los mapas de ligamiento publicados (MADDOX et al., 1996; de GORTARI et al., 1998).

El análisis de cada microsatélite se realizó utilizando un marcado radiactivo incorporando [^{35}S]dATPαS, o bien introduciendo un oligonucleótido marcado con un fluorocromo (Cy5). Una vez realizada la electroforesis, y dependiendo de la técnica utilizada en cada caso particular, los genotipos individuales fueron identificados mediante visualización directa de una película de autorradiografía o mediante un equipo de secuenciación automática (ALFexpress®DNA Sequencer, Pharmacia Biotech).

El estudio de ligamiento se realizó mediante el programa CRI-MAP (LANDER & GREEN, 1987), que utiliza la función de Kosambi para calcular, a partir de las frecuencias de recombinación, la distancia en centimorgans entre los marcadores.

De forma simultánea se obtuvieron los haplotipos más probables de los sementales. Se utilizó el test de heterogeneidad de Morton (OTT, 1991) con el objetivo de detectar posibles errores en la identificación genotípica, procediéndose a una comprobación de los procesos de recombinación dobles y múltiples, mediante repetición de su análisis en el laboratorio. Con objeto de detectar posibles variaciones en la frecuencia de recombinación entre las distintas familias, se aplicó el test de Morton, basado en la comparación de los "lod scores" correspondientes a las frecuencias de recombinación, calculados utilizando la opción TWOPOINT del programa CRI-MAP.

Tabla 1. Individuos y marcadores analizados. Número de meiosis informativas.

Semental	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
N° hijas	52	41	86	147	46	115	118	69	138	67	
Marcador	Marcadores heterocigóticos en cada semental										N° meiosis
OarCP125		•	•		•	•	•	•	•	•	558
INRA133	•	•	•					•	•	•	329
McM53	•	•	•		•	•	•	•	•	•	534
OarAE101		•	•		•		•	•		•	336
BM143		•	•	•	•	•	•	•	•	•	625
BMS360	•		•	•	•		•	•	•	•	583
BM4621	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	740
BM4311	•	•		•		•		•	•		438
CSRD293	•	•	•			•	•	•	•		527
OarJMP8		•		•		•				•	293
McM214	•	•	•	•			•	•	•	•	565
OarJMP12	•		•	•				•	•	•	447
N° meiosis	40-49	28-40	58-82	101-130	34-44	80-107	79-99	45-60	91-115	40-62	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de procesos meioticos que resultaron informativos para cada marcador se presenta en la Tabla 1, con un rango comprendido entre 293 (OarJMP8) y 740 meiosis (BM4621), y una media de 498 meiosis por marcador. El mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino, obtenido para el conjunto de las familias estudiadas, presentó una extensión total de 139 cM (Kosambi) (Figura 1). De acuerdo con el mapa físico, OarCP125 es el marcador más centromérico y OarJMP12 el más telomérico.

Las distancias genéticas estimadas presentan un alto grado de coincidencia con las obtenidos por otros autores, con ligeras diferencias. Es necesario indicar que en nuestro trabajo se analizan familias de medio-hermanas y que el mapa corresponde exclusivamente a meiosis observadas en los machos, mientras que en otros casos se ha utilizado información de ambos sexos, elaborando un mapa promedio (MADDOX et al., 1996; de GORTARI et al., 1998). En este sentido, algunos estudios han encontrado diferencias en la frecuencia de recombinación entre ambos sexos en diferentes especies. En el caso concreto del ganado ovino, los resultados no son totalmente coincidentes. Así, mientras CRAWFORD et al. (1995) encuentran

una mayor frecuencia de recombinación en machos que en hembras, para un 67% de los intervalos examinados a lo largo de todo el genoma, LORD et al. (1996), al estudiar el cromosoma 6 ovino, sólo detectan diferencias significativas entre sexos, para un intervalo de los analizados.

El mapa de ligamiento obtenido en nuestro estudio puede considerarse representativo de los procesos meitóticos del cromosoma 6 en los machos de raza Churra. Su fiabilidad puede considerarse elevada por las razones que se indican seguidamente. En primer lugar, el número de meiosis informativas por marcador (media: 498, rango: 293-740) fue muy superior al aportado por otros autores, como CRAWFORD et al. (1995) (media: 140, rango: 18-209) o de GORTARI et al. 1998 (media: 197, rango: 12-624). Por otro lado, los intervalos entre marcadores adyacentes pueden considerarse adecuados, con un intervalo medio de 12,3 cM y sólo dos segmentos que superaron ligeramente los 20 cM. Además, no se detectaron fenómenos de recombinación doble en distancias genéticas inferiores a 20 cM, lo que sugiere, tal y como indican de GORTARI et al. (1998), una baja tasa de error en la identificación genotípica.

Aunque se observaron variaciones en las frecuencias de recombinación estimadas entre las 10 familias, el test de heterogeneidad indicó que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los intervalos analizados. Estos resultados parecen también fiables, dado el número de meiosis analizadas por cada marcador y semental (rango: 28-130, ver Tabla 1), que puede considerarse, en general, bastante elevado, con relación a los datos mencionados anteriormente para los estudios conjuntos de ligamiento. Un factor limitante de este tipo de estudios reside en el número de progenitores heterocigóticos para cada marcador, de forma que no todos los machos resultan informativos para los diferentes intervalos analizados. No obstante, en nuestro estudio este efecto queda paliado, al menos parcialmente, al estudiar un número elevado, tanto de sementales como de intervalos cromosómicos.

Figura 1. Mapa de ligamiento

OarCP125
16,9 cM
INRA133
17,1 cM
McM53
21,7 cM
OarAE101
6,4 cM
BM143
16,4 cM
BMS360
4,4 cM
BM4621
20,5 cM
BM4311
10,1 cM
CSRD293
4,5 cM
OarJMP8
12,7 cM
McM214
7,9 cM
OarJMP12

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRAWFORD, A.M., DODDS, K.G., PIERSON, C.A., EDE, A.J., MONTGOMERY., G.W., GARMONSWAY, H.G., BEATTIE, A.E., DAVIES, K., MADDOX, J.F. et al. (1995). *Genetics* **140:** 703-724.

DE GORTARI, M. J., FREKING, B. A., CUTHBERTSON, R. P., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. G., LEYMASTER, K. A., DODDS, K. G. et al. (1998). *Mammalian Genome* **9:** 204-209.

LANDER, E. S., GREEN, P. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84:** 2363-2367.

LORD, E.A., LUMSDEN, J.M., DODDS, K.G. (1996). *Mamm. Genome* **7:** 373-376.

MADDOX, J.F., DAVIES, K.P., CUTHBERTSON, R. (1996). *Anim. Genet.* **27 (Supl. 2):** 85-86.

MATEJKA, M, CRIBIU, E.P. (1987). *Génet Sel Evol.* **19:** 113-126.

OTT, J. (1991). *Analysis of human genetic linkage.* John Hopkins University Press, Baltimore MD, USA

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 1FD97-0225.