EVOLUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA A NIVEL MOLECULAR EN UNA RAZA OVINA SOMETIDA A SELECCIÓN: LA RAZA MANCHEGA

Pérez, E.M., Lozano, J.M., Bouzada, J.A., Gallego, R.*, Pérez-Guzmán, M.D. y Montoro, V.
CERSYRA. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha.
Avda. del Vino, 6. 13.300 Valdepeñas (Ciudad Real) lpcersyra@jccm.es
*AGRAMA Ctra. Madrid s/n. 02.080 Albacete

INTRODUCCIÓN

La puesta en marcha de un esquema de selección genética lleva consigo, entre otras cosas, la necesidad de establecer unos índices de selección que den como resultado un progreso genético importante, pero manteniendo a su vez unos niveles de diversidad genética adecuados. La caracterización genética de estos animales permitirá corregir asignaciones incorrectas de paternidad, así como conocer los niveles de variabilidad genética a nivel molecular existentes en la población y diseñar los apareamientos más adecuados para su mantenimiento.

En el presente estudio se han analizado 4.478 animales de raza Manchega, nacidos entre los años 1988 y 2000. Con ello se pretende estudiar cómo está afectando el esquema de selección al que está siendo sometida esta raza, a la diversidad alélica y a las frecuencias genotípicas de dos proteínas sanguíneas, que no están siendo objeto de selección, así como 10 secuencias genómicas presuntamente neutras, como son los microsatélites de ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: La muestra consistió en 4.478 animales procedentes de 73 ganaderías pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Manchega, divididos en 10 grupos según el año de nacimiento. Los animales nacidos con anterioridad al año 1991 fueron estudiados conjuntamente. El número de animales analizados en cada año queda desglosado en la tabla 1.

Tabla 1. Animales analizados por año.

Año	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Animales	179	125	229	344	405	435	362	607	1.013	779

Muestras biológicas: Consistieron en suero sanguíneo y leucocitos de los animales objeto de estudio.

Electroforesis de proteínas: se utilizó el método descrito por Garzón *et al.* (1991). En el presente estudio sólo se analizaron hemoglobina y transferrina.

Extracción de ADN: Se obtuvo de muestras de sangre enriquecidas en leucocitos empleando el procedimiento de Miller *et al.* (1988).

PCR: Fueron llevadas a cabo en 3 reacciones "Multiplex" (Bragança *et al.*, 1999) y una simple. El programa de amplificación usado fue el siguiente: 4 minutos a 94° C., 32 ciclos de 30 segundos' a 94° C, 45 segundos a 58° C y 1 minuto a 72° C y para finalizar 4 minutos a 72° C. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl (5µl de DNA patrón, 1 µl Tampón 10X, 0.4 µl de dNTPs 2 mM cada uno de ellos, 0.2 µl cada uno de los cebadores 16 µM, 0.2 µl de RedTaqTM polimerasa de Pharmacia (1 Unidad/µl) y 2.2 µl de H2O MilliQ) utilizando un

GeneAmp PCR System 9600 de Perkin-Elmer. Los microsatélites amplificados, así como el cromosoma en el que se encuentran y el número de alelos detectados en cada uno de ellos, quedan reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Localización cromosómica y número de alelos encontrados en los microsatélites analizados.

LOCI	BM 143	BM 8125	CSSM 031	ILSTS 005	INRA 006	CSSM 066	ILSTS 011	MCM 53	RM 006	BM 6526
LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	6	17	23	7	1	9	9	6	5	26
NÚMERO DE ALELOS	16	8	20	9	13	19	9	13	8	10

Electroforesis de ADN: Las muestras consistieron en 3 µl del producto de PCR y 3 µl de formamida, se desnaturalizan a 94° C y se enfrían en hielo durante 3 minutos. La migración se llevó a cabo en un gel de secuenciación (4.25 % poliacrilamida. 7M urea) durante 4-5 horas en un secuenciador automático ALF express DNA sequencer de Pharmacia Biotech. Los resultados fueron analizados con el Fragment ManagerTM 1.2 de Pharmacia Biotech.

Información generada: La variabilidad genética fue estimada analizando las frecuencias alélicas y genotípicas así como el grado de heterocigosis a lo largo de los distintos años, para cada uno de los doce loci estudiados, empleando para ello la versión actualizada (mayo de 2000) del software de genética de poblaciones Genepop (Raymond *et al.*, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se reflejan los valores de heterocigosis observada y esperada para cada uno de los doce loci estudiados en los diez años en los que se dividió la muestra.

El nivel de significación utilizado fue del 5% ($p<0,05$), o del 1% ($p<0,01$) dependiendo de los casos. No ha sido detectado en ninguna ocasión un exceso significativo de heterocigotos. En la tabla 3 aparecen destacados los casos en los que el defecto de heterocigotos resultó estadísticamente significativo. Se observa que este defecto se concentra en tres loci mayoritariamente: ILSTS005, ILSTS011 y BM143, localizados en los cromosomas 7, 9 y 6 respectivamente.

Resulta interesante el hecho de encontrar estas desviaciones entre los heterocigotos esperados y observados en el locus BM143, cuya ubicación en el mapa de ligamiento del cromosoma 6 ovino es muy próxima a la de los loci codificadores de las caseínas (Maddox *et al.*, 1996) y que ha sido relacionado, en vacuno lechero, con cantidad de leche, Kg de grasa y porcentaje de proteína, por diversos autores (Zhang *et al.*, 1998 y Mosig *et al.*, 1998). En el locus McM53, también situado en el cromosoma 6, no se ha detectado un déficit de heterocigotos tan manifiesto, por lo que podría ser objeto de estudio para trabajos posteriores el situar nuevos marcadores genéticos en esa zona.

En cuanto a la variabilidad alélica encontrada, no se constata una pérdida de alelos evidente con el paso de los años (Pérez *et al.*, datos no publicados), lo que hace pensar que a pesar de la selección genética a la que se encuentra sometida la raza, no se está perdiendo, por el momento, variabilidad genética a nivel molecular.

Tabla 3. Heterocigosis observadas (HeO) y esperadas (HeE).

		Hb	Tf	BM 143	BM 8125	CSSM 031	ILSTS 005	INRA 006	CSSM 066	ILSTS 011	MCM 53	RM 006	BM 6526
	HeO	39	138	89	42	52	40	19	53	31	8	6	9
1991	HeE	39,19	128,91	100,53	41,94	55,86	44,98	22,3	56,32	26,31	8,87	5,62	10,76
	Δ	0,19 n.s.	-9,09n.s.	11,53**	-0,06 n.s.	3,86 n.s.	4,98 n.s.	3,3 n.s.	3,32 n.s.	-4,69 n.s.	0,87*.	-0,38 n.s.	1,76 n.s.
	HeO	29	88	67	33	42	34	17	51	26	6	7	8
1992	HeE	32,53	87,76	72,88	32,89	42,7	36,07	18,03	49,3	28,35	6,23	5,69	5,88
	Δ	3,53 n.s.	-0,24 n.s.	5,88**	-0,11 n.s.	0,70 n.s.	2,07 n.s.	1,03 n.s.	-1,7 n.s.	2,35 n.s.	0,23 n.s.	-1,31 n.s.	-2,12 n.s.
	HeO	58	163	117	78	111	92	32	113	55	25	11	21
1993	HeE	54,73	166,33	121,11	81,83	108,9	93,24	32,11	114,72	57,32	23,76	8,71	24,96
	Δ	-3,27 n.s.	3,33 n.s.	4,11 n.s.	3,83 n.s.	-2,10 n.s.	1,24 n.s.	0,11 n.s.	1,72 n.s.	2,32*	-1,24 n.s.	-2,29 n.s.	3,96*.
	HeO	78	235	155	122	159	137	52	164	89	39	14	35
1994	HeE	76,09	246,55	153,63	124,17	169,31	146,13	55,72	162,78	92,15	34,7	15,23	36,88
	Δ	-1,91 n.s.	11,55*.	-1,37 n.s.	2,17 n.s.	10,31 n.s.	9,13*	3,72 n.s.	-1,22 n.s.	3,15 n.s.	-4,30 n.s.	1,23 n.s.	1,88 n.s.
	HeO	100	279	159	181	242	205	66	233	115	49	24	53
1995	HeE	102,08	286,59	165,2	179,02	246,64	207,39	71,07	243,77	128,8	45,57	26,94	41,35
	Δ	2,08 n.s.	7,59 n.s.	6,20**	-1,98 n.s.	4,64 n.s.	2,39 n.s.	5,07 n.s.	10,77**	13,80**	-3,43 n.s.	2,94 n.s.	-11,65 n.s.
	HeO	88	279	141	228	295	246	92	300	161	67	39	76
1996	HeE	86,27	271,78	137,06	227,8	313,34	270,78	91,5	303,06	166,37	66,4	37,81	70,26
	Δ	-1,73 n.s.	-7,22 n.s.	-3,94 n.s.	-0,20 n.s.	18,34 n.s.	24,78**	-0,50 n.s.	3,06 n.s.	5,37**	-0,60 n.s.	-1,19 n.s.	-5,74 n.s.
	HeO	80	196	107	201	277	236	87	262	130	113	49	109
1997	HeE	79,47	194,9	106,35	203,83	287,57	243,75	85,89	265,59	145,07	109,1	54,17	108,3
	Δ	-0,53 n.s.	-1,10 n.s.	-0,65 n.s.	2,83 n.s.	10,57 n.s.	7,75 n.s.	-1,11 n.s.	3,59 n.s.	15,07**	-3,90 n.s.	5,17*	-0,70 n.s.
	HeO	141	393	358	149	196	174	24	184	104	110	70	102
1998	HeE	133,1	393,44	361,63	146,08	194,35	171,15	24,12	185,81	103,04	106,46	74,04	100,25
	Δ	-7,90 n.s.	0,44 n.s.	3,63**	-2,92 n.s.	-1,65 n.s.	-2,85 n.s.	0,12 n.s.	1,81 n.s.	-0,96 n.s.	-3,54 n.s.	4,04 n.s.	-1,75 n.s.
	HeO	235	698	280	557	810	636	294	829	369	34	19	39
1999	HeE	244,75	697,42	296,18	568,55	827,19	682,61	285,56	838,22	386,55	30,79	18,69	37,23
	Δ	9,75 n.s.	-0,58 n.s.	16,18*	11,55 n.s.	17,19*	46,61**	-8,44 n.s.	9,22 n.s.	17,55**	-3,21 n.s.	-0,31 n.s.	-1,77 n.s.
	HeO	60	130	125	451	573	503	-	558	291	321	164	302
2000	HeE	56,91	136,28	130,90	442,79	579,23	530,478	-	551,94	300,46	309,30	159,95	290,93
	Δ	-3,09 n.s.	6,28 n.s.	6,9*	-8,21 n.s.	6,23*	27,478*	-	-6,06 n.s.	9,46 n.s.	-11,7 n.s.	-4,05 n.s.	-11,07 n.s.

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alford, R.L.; Hammond, H.; Coto, I.; Caskey, C., 1994. Am. J. Human Genet. 55: 190-195.

Blott, S.C.; Williams, J.L.; Haley, C.S., 1998. Animal Genetics 29: 202-211.

Bragança, P.; Arranz, J.J.; San Primitivo, F., 1999. ITEA 20: 306-308.

Čepica, S.; Wolf, J.; Hojný, J.; Vacková, I.; Schröffel Jr, J., 1995. Animal Genetics 26: 135-140.

Garzón, A.I.; Martínez, J.; Montoro, V., 1990. XXV Jor. de Genética Luso-Españolas. 58.

Hernández, D., 1999. Bovis 99: 39-54.

Maddox, J.F.; Davies, K.P.; Cuthbertson, R., 1996. Animal Genetics 27: 85-86.

Miller. S.A.; Dykes. D.D.; Polesky. H.F., 1988. Nuc. Acids Res.. 16: 1215.

Pemberton, J.M.; Coltman, D.W.; Coulson, T.N.; Slate, J., 1998. Microsattelites, evolution and applications. Oxford University Press: 151-164.

Pérez, E.M.; Bouzada, J.A.; Lozano, J.M.; Acero F.J.; Jiménez-Gamero, I.; Gallego, R.; Montoro, V., 2000. Jornadas Cientificas de la S.E.O.C. XXV: 277-280.

Pepin, L.; Amigues, Y.; Lépingle, A.; Berthier, J.L.; Bensaid, A.; Vaiman, D., 1995. Heredity. 74: 53-61.

Raymond, M.; Rousset, F., 1995. Genepop (updated version 3.2a, 2000): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heridity, 86: 248-249.

Tixier-Boichard, M.; Kritchmann, N.; Morisson, M.; Bordas, A.; Hillel, J., 1996. Animal Genetics 27: 163-169.

Zhang, Q. *et al.*, 1998. Genetics 149: 1959-1973.