

POLIMORFISMO DE ANHIDRASA CARBONICA, PROTEINA-X Y HEMOGLOBINA EN MERINO ESPAÑOL.

(CARBONIC ANHYDRASE, X-PROTEIN AND HEMOGLOBIN POLYMORPHISM IN SPANISH MERINO SHEEP),

por

Moreira, L., D. Llanes, A. Muñoz, M. Barbancho y A. Rodero

Departamento de genética. Sección de grupos sanguíneos y polimorfismo bioquímico (CSIC). Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. (España).

Palabras clave: Producción animal. Oveja. Anhidrasa carbónica. Hemoglobina. Polimorfismo eritrocitario. Proteína X.

Keywords: Animal production. Carbonic anhydrase. Erythrocytic polymorphism. Hemoglobin. Sheep. X-protein.

Summary

We have studied, by starch gel electrophoresis, in a Spanish Merino population subdivided in 6 subpopulations, the erythrocytic polymorphism of carbonic anhydrase (CA), X-protein and hemoglobin (Hb). The following frequencies have been found: Carbonic anhydrase: $CA^S = 0.952$, $CA^F = 0.058$; X-protein: "+" = 0.656, "-" = 0.344, Hemoglobin: $Hb^A = 0.327$, $Hb^B = 0.673$. By the assumption of H-W equilibrium we have estimated for the x allele a frequency of 0.586.

We have applied to the data obtained the Lewontin & Krakauer test, that indicated us that the differences between gene frequencies of the 6 subpopulations are due to aleatory factors, and the Hill test, that indicated us there is no linkage disequilibrium in the gametic frequencies between the CA and Hb loci.

Resumen

Se estudia en una población de Merino español, subdividida en 6 subpoblaciones, mediante electroforesis en gel de almidón, el polimorfis-

Recibido para publicación el 23-9-1982.

mo eritrocitario de anhidrasa, proteína X y hemoglobina.

Encontramos las siguientes frecuencias: anhidrasa carbónica: $CA^S = 0.952$; $CA^F = 0.058$; proteína-X: "+" = 0.656; "-" = 0.344; hemoglobina: $Hb^A = 0.327$; $Hb^B = 0.673$. Admitiendo la existencia de equilibrio H-W para proteína-X, estimamos una frecuencia del alelo x de 0.586.

A los datos obtenidos hemos aplicado la d6cima de Lewontin & Krakauer, que nos indica que las diferencias en las frecuencias g6nicas de las 6 subpoblaciones son debidas a factores aleatorios, as6 como la de Hill, que apunta a la inexistencia de disequilibrio de ligamento en lo que respecta a las frecuencias gam6ticas entre los loci CA y Hb.

Las t6cnicas para la producci3n de reactivos espec6ficos para ant6genos de gl3bulos rojos (Fergusson (2)) abrieron el campo de las investigaciones sobre marcadores gen6ticos en especies dom6sticas. Los m6todos bioqu6micos de electroforesis en gel de almid3n (Smithies (11)) vendr6an a ampliarlo mediante los polimorfismos bioqu6micos y enzim6ticos. Dentro de la amplia gama de posibilidades que para la investigaci3n biol3gica y zoot6cnica se abrieron con estos trabajos, no son las menos importantes aquellas que tienen por finalidad el an6lisis de la estructura gen6tica de las poblaciones y, m6s concretamente, la caracterizaci3n de razas en base a la naturaleza y frecuencia de sus alelos. Esta caracterizaci3n hace posible seguir la variaci3n que experimenta una raza debido a procesos tales como diversificaci3n geogr6fica, lo que puede traer consigo respuestas a procesos selectivos, mejorantes y de adaptaci3n, a los distintos medios ambientales, o la pr6ctica en gran escala de la inseminaci3n artificial, que modifica profundamente las frecuencias g6nicas. As6 mismo es posible realizar estudios sobre el proceso de formaci3n de las razas; cuanto m6s parecidas gen6ticamente sean dos razas, m6s emparentadas est6n; es decir, m6s pr3ximas se hallan en el arbol geneal3gico de la especie. Dentro de este campo se lleva a cabo en nuestro Departamento una l6nea de investigaci3n que abarca a la especie ovina y, dentro de ella, a la raza merina. La importancia de estos trabajos viene dada por la raza sobre la que se realizan, una raza que ha dado origen al mayor n6mero de variedades y que se ha extendido por todo el mundo. Continuando en esta l6nea, se presentan en este trabajo datos referentes a los polimorfismos eritrocitarios de anhidrasa carb3nica, prote6na-X y hemoglobina. Hasta ahora no se hab6a abordado el estudio de los polimorfismos sangu6neos en lo que se refiere a la raza pura,

en su tronco español, origen de todas las variantes que se puedan encontrar en merino.

Revisión bibliográfica

Anhidrasa carbónica.

Tucker y col. (13) pusieron de manifiesto la existencia de dos bandas (S y F) que determinaban tres fenotipos: S, SF y F, controlados por un par de alelos autosómicos codominantes: CA^S y CA^F. Estas bandas se tiñen con colorantes específicos de proteínas así como con alfa-naftilacetato, dada la actividad esterásica de esta enzima. En todas las razas estudiadas el alelo CA es el más frecuente, con valores superiores en general a 0,9 (Tucker y col. (13), Fesus (3); Makaveev y Tjankov (8) y Prebska y Rembiesa (9)).

Proteína-X.

Este polimorfismo, descrito por Tucker y col. (13), consiste en la existencia de seis bandas, que se tiñen con colorantes específicos de proteínas: dos de ellas, 1ª y 5ª en orden decreciente de migración a pH = 7,4, aparecen en todas las muestras; tres bandas, 2ª, 4ª y 6ª, están las tres presentes (fenotipo X positivo) o las tres ausentes (fenotipo X negativo). Una banda más, la 3ª, está presente en algunas muestras negativas. Mostraron que el fenotipo positivo tiene herencia dominante frente al negativo. Cuando el pH del medio se ajusta a 7,6, las bandas variables cambian de posición respecto a las constantes y ocupan las posiciones 2ª, 5ª y 6ª. Existe gran variabilidad en cuanto a la frecuencia del alelo x, que determina el fenotipo negativo, en las razas estudiadas (Tucker y col. (13) y Fesus (3)).

Hemoglobina.

De las variantes encontradas, las más frecuentes en las formas domésticas de ovinos son la Hb^A y Hb^B (Harris y Warren (4)), controladas por un par de alelos autosómicos codominantes: Hb^A y Hb^B. Otras formas encontradas son: Hb (Blunt y Evans (1)); Hb (Vaskov y Efremov (14)) y Hb^E (Jhon y Jhon, (6)).

Material y métodos

Los animales usados en este trabajo pertenecen a la población de merino español localizada en Hinojosa del Duque (Córdoba). Esta población, creada en 1971 y subdividida en 6 lotes o subpoblaciones que se mantienen reproductivamente aislados, está compuesta de animales procedentes de diversas regiones consideradas como cuna de la raza, y mantienen en la actualidad su pureza de origen.

La técnica utilizada en la detección de los polimorfismos es la de electroforesis en gel de almidón. El tratamiento de las muestras, así como el método de elaboración de los geles y desarrollo de la electroforesis es la descrita por Rodero y col. (10). Para la detección de anhidrasa carbónica y proteína-X hemos seguido el método descrito por Tucker y col. (13). Para la de hemoglobinas, el descrito por Rodero y col. (10).

Resultados y discusión

Anhidrasa carbónica.

Hemos detectado las dos bandas S y F, coincidiendo con las descritas por Tucker y col. (13). Las frecuencias genotípicas y génicas, así como el ji-cuadrado de equilibrio para los lotes, aparecen en la tabla I. Como puede apreciarse, existe gran homogeneidad entre los lotes, por lo cual la variabilidad, calculada por $S^2 = 1/N (\sum n_i p_i) - \bar{p}^2$, donde N es el total de muestras analizadas, n_i , el número de muestras de cada lote; p_i , la frecuencia del alelo CA^S en cada lote; y \bar{p} , la frecuencia media de este mismo alelo, es muy pequeña: 0,00027. Por otra parte, el coeficiente de consanguinidad, como consecuencia de la subdivisión en lotes, considerando que los apareamientos se realizan al azar, lo hemos estimado, según Cavalli-Sforza y Bodmer, por $F = S_p^2 / \bar{p}(1 - \bar{p})$, obteniendo un valor de 0,0058.

La alta frecuencia del alelo $CA^S = 0,952$ concuerda con lo encontrado en las demás razas estudiadas. Esta alta frecuencia hace poco fiables las décimas estadísticas de comparación de frecuencias que pudieran emplearse y, por tanto, sus resultados serían muy dudosos.

Proteína-X.

Los resultados coinciden en lo fundamental con lo descrito por Tucker y col. (13), en cuanto a los fenotipos encontrados; sin embargo,

MORERA ET AL.: POLIMORFISMO DE AC, PROTEINA X Y HEMOGLOBINA EN MERINO.

se han hallado algunas muestras en las que faltaba alguna de las tres bandas que, según estos autores, deberían aparecer siempre juntas en las muestras positivas. Esto lo consideramos debido a la escasa tinción que presentan estas bandas, lo que hace difícil visualizarlas a veces; por consiguiente, estas muestras se han considerado también como positivas.

La tabla II muestra las frecuencias fenotípicas observadas, así como las frecuencias génicas estimadas bajo la hipótesis de equilibrio genético. La variabilidad, calculada mediante la fórmula anteriormente citada, es de 0,0032. El coeficiente de consanguinidad debido a la subdivisión de la población en lotes es $F = 0.0132$.

La diferencia entre las frecuencias del fenotipo negativo en machos y hembras (0,465 y 0,331, respectivamente) no es estadísticamente significativa ($z = 1,76$; $P > 0,05$). Este resultado coincide con los de Tucker y col. (13), lo que llevaba a estos autores a descartar que este polimorfismo pudiera estar controlado por un gen ligado al sexo.

Hemos comparado la frecuencia del alelo x ($q_x^1 = 0,586$) con las encontradas en otras razas por diversos autores. Los resultados se recogen en la figura 1, en la que las razas han sido agrupadas según su origen étnico y se ha comparado, mediante pruebas z, la frecuencia promedio en cada grupo. Estos datos muestran que las diferencias parecen responder a diferencias reales entre razas más que a efectos del azar: muestreo, deriva genética, etc.

Hemoglobina.

Se han detectado los dos tipos más frecuentes en ovejas domésticas: HbA y HbB, llamando HbA a la de mayor movilidad electroforética. La tabla III muestra las frecuencias encontradas así como el ji-cuadrado de equilibrio. La variabilidad para la frecuencia promedio del alelo Hb^A es de 0,0015. El coeficiente de consanguinidad, como consecuencia de la subdivisión en lotes, es $F = 0,0072$.

Vamos a discutir seguidamente la evolución en la frecuencia del alelo Hb^A comparando estos datos con los aportados por Rodero y col. (10), para esta misma población. Veremos con ello la influencia de la selección de animales realizada en una determinada explotación, sobre la representatividad de las frecuencias génicas calculadas para un determinado polimorfismo. La tabla IV recoge estos resultados.

Vemos que la diferencia entre la frecuencia global en los dos años (0,348 y 0,327) no es significativa ($z = 0,754$); para los lotes, los valores z son igualmente no significativos, variando desde el lote 5º ($z = 0,364$) hasta el lote 1º ($z = 1,86$), en el que el valor es próximo

MORERA ET AL.: POLIMORFISMO DE AC, PROTEINA X Y HEMOGLOBINA EN MERINO.

al significativo (1,96). En este lote 1º la diferencia entre las hembras (0,471 y 0,304), en los dos años, sí es significativa ($z = 2,774$; $P < 0,01$). La magnitud de la fluctuación en las frecuencias tiende a disminuir cuando aumenta el número de muestras analizadas, lo cual pone de manifiesto la importancia de que los datos sobre frecuencias de polimorfismos estén apoyados en un número de muestras no pequeño.

Hemos realizado el análisis de máximo desequilibrio de ligamiento para los loci CA y HB, propuesto por Hill (5) y modificado por Weir y Cockerham (17), en el que se estima D_w (dentro de individuos) sobreentendiendo que D_b (entre individuos) es igual a 0. Este análisis se completa con el propuesto por Burrows, recogido en Weir y Cockerham (16); en el que se calcula la D global, teniendo en cuenta D_w y D_b . El resultado se muestra en la tabla V.

El valor negativo de D (que también hemos expresado en términos de coeficiente de correlación, R) nos indica que los gametos se encuentran en fase de repulsión, pero el ji-cuadrado así como R nos da los valores no significativos. Hemos realizado la prueba z para comparar ambos R en los términos que propone Weir (15). Si la diferencia entre ambos R hubiese sido significativa sería como consecuencia de que D_b , que no es considerada en el método de Hill, es diferente de cero y por lo tanto existiría una componente de D motivada por un apareamiento no al azar. El resultado de la tabla V nos muestra que $D_b = 0$ y por lo tanto los gametos se aparean al azar en las seis subpoblaciones, no detectándose diferencias entre la distribución de frecuencias gaméticas de los seis lotes.

Lewontin y Krakauer (7) proponen una dódima de significación de ji-cuadrado basada en la estimación de la varianza del coeficiente F en razón de la varianza esperada de este mismo coeficiente, con grados de libertad igual al número de loci menos uno. El objeto de esta prueba es detectar el comportamiento neutral o selectivo de diversos loci muestreados en diferentes poblaciones. Con respecto a los loci CA y Hb hemos obtenido los resultados que muestra la tabla VI. El valor no significativo del ji-cuadrado indica que no ha habido selección diferencial sobre ninguno de los dos loci, ya que los valores observados de F son más homogéneos de lo que cabría esperar si hubiese habido una presión de selección significativa. Los resultados de esta tabla nos confirma que las diferencias en las frecuencias génicas de las seis subpoblaciones son debidas a factores aleatorios que producen deriva genética, o a una fuerte migración entre las subpoblaciones, lo que queda descartado por tratarse de lotes completamente cerrados bajo control humano..

Tabla I. Polimorfismo de anhidrasa carbónica. Frecuencias genotípicas, gónicas y χ^2 de equilibrio de Hardy-Weinberg.

| Lote | Nº de muestras | Frecuencias genotípicas observadas | | | | Frec. gónicas | | | Frec. genotípicas esperadas | | | χ^2 |
|-----------------|----------------|------------------------------------|-------|-------|-------|---------------|-----------------|-------|-----------------------------|-------|------------|----------|
| | | SS | SF | FF | SCA | CA | CA ^F | SS | SF | FF | | |
| Lote 1 | 143 | 0,874 | 0,119 | 0,007 | 0,934 | 0,066 | 0,066 | 0,872 | 0,124 | 0,004 | 0,246 n.s. | |
| Lote 2 | 35 | 0,971 | 0,029 | 0,000 | 0,986 | 0,024 | 0,024 | 0,972 | 0,048 | 0,000 | 0,288 n.s. | |
| Lote 3 | 83 | 0,904 | 0,084 | 0,012 | 0,946 | 0,054 | 0,054 | 0,894 | 0,103 | 0,003 | 2,618 n.s. | |
| Lote 4 | 43 | 0,953 | 0,047 | 0,000 | 0,977 | 0,023 | 0,023 | 0,954 | 0,046 | 0,000 | 0,246 n.s. | |
| Lote 5 | 117 | 0,914 | 0,086 | 0,000 | 0,957 | 0,043 | 0,043 | 0,917 | 0,082 | 0,000 | 0,234 n.s. | |
| Lote 6 | 21 | 0,905 | 0,095 | 0,000 | 0,952 | 0,048 | 0,048 | 0,908 | 0,092 | 0,000 | ----- | |
| Población total | 442 | 0,907 | 0,088 | 0,005 | 0,952 | 0,048 | 0,048 | 0,906 | 0,094 | 0,000 | 0,973 n.s. | |

MORERA ET AL.: POLIMORFISMO DE AC, PROTEINA X Y HEMOGLOBINA EN MERINO.

Tabla II. Polimorfismo de la proteína-X. Frecuencias fenotípicas observadas y frecuencias génicas suponiendo equilibrio genético.

| | Nº de muestras | F. fenotípicas observadas | | F. génicas estimadas | |
|--------------------|-------------------|------------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | | + | - | x | |
| Lote 1 | 143 | 0,664 | 0,336 | 0,421 | 0,579 |
| Lote 2 | 35 | 0,514 | 0,486 | 0,303 | 0,697 |
| Lote 3 | 83 | 0,602 | 0,398 | 0,369 | 0,631 |
| Lote 4 | 43 | 0,605 | 0,395 | 0,371 | 0,629 |
| Lote 5 | 117 | 0,744 | 0,256 | 0,494 | 0,506 |
| Lote 6 | 21 | 0,667 | 0,333 | 0,423 | 0,577 |
| Población total | 442 | 0,656 | 0,344 | 0,414 | 0,586 |

Tabla III. Polimorfismo de hemoglobinas. Frecuencias genotípicas, génicas y χ^2 de equilibrio de Hardy-Weinberg.

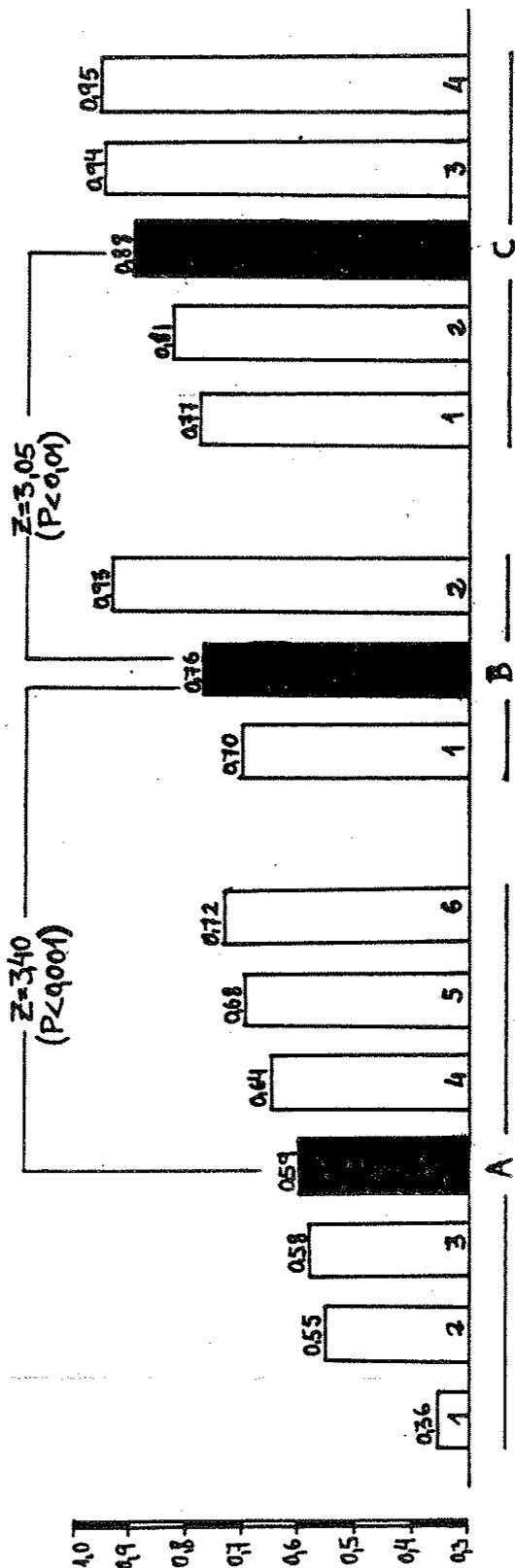
| Lote | Nº de muestras | Frecuencias genotípicas ob- servadas | | | Frec. génicas | | | Frec. genotípicas esperadas | | | χ^2 |
|--------------------|-------------------|---|-------|-------|-----------------|-----------------|-------|--------------------------------|-------|------------|----------|
| | | AA | AB | BB | Hb ^A | Hb ^B | AA | AB | BB | | |
| Lote 1 | 143 | 0,112 | 0,427 | 0,461 | 0,325 | 0,675 | 0,106 | 0,439 | 0,455 | 0,112 n.s. | |
| Lote 2 | 35 | 0,143 | 0,514 | 0,343 | 0,400 | 0,600 | 0,160 | 0,480 | 0,360 | 0,179 n.s. | |
| Lote 3 | 83 | 0,120 | 0,458 | 0,422 | 0,349 | 0,651 | 0,122 | 0,455 | 0,423 | 0,004 n.s. | |
| Lote 4 | 43 | 0,116 | 0,535 | 0,349 | 0,384 | 0,616 | 0,147 | 0,473 | 0,380 | 0,738 n.s. | |
| Lote 5 | 117 | 0,085 | 0,385 | 0,530 | 0,278 | 0,722 | 0,077 | 0,401 | 0,522 | 0,201 n.s. | |
| Lote 6 | 21 | 0,095 | 0,381 | 0,524 | 0,286 | 0,714 | 0,082 | 0,408 | 0,510 | ----- | |
| Población total | 442 | 0,109 | 0,437 | 0,454 | 0,327 | 0,673 | 0,107 | 0,440 | 0,453 | 0,028 n.s. | |

Tabla IV. Frecuencia del alelo Hb^A en Rodero y col. (10) y en el presente trabajo.

| | Rodero y col. (10) | Presente trabajo | z | |
|--------------------|-----------------------|---------------------|-------|------------|
| Lote 1 | 0,429 | 0,375 | 1,866 | (P > 0,05) |
| Lote 2 | 0,320 | 0,400 | 0,786 | (P > 0,05) |
| Lote 3 | 0,308 | 0,349 | 0,692 | (P > 0,05) |
| Lote 4 | 0,416 | 0,383 | 0,369 | (P > 0,05) |
| Lote 5 | 0,296 | 0,277 | 0,364 | (P > 0,05) |
| Población total | 0,348 | 0,327 | 0,754 | (P > 0,05) |

MORERA ET AL.: POLIMORFISMO DE AC, PROTEINA X Y HEMOGLOBINA EN MERINO.

Figura 1. Polimorfismo de la proteína-X. A: Razas de origen (o cruces) merino. 1: Merino (USA); 2: Rambouillet; 3: Merino español; 4: Targhee; 5: Columbia; 6: Merino húngaro. B: Razas del tipo "caras negras" británicas. 1: Suffolk; 2: Southdown. C: Razas de aptitud mixta. 1: Lincoln; 2: Dorset Horn; 3: Clun Forest; 4: Wels Mountain. [] Frecuencia del alelo x; [] Frecuencia promedio dentro de cada grupo.



Bibliografía

1. Blunt, M.H. and J.V. Evans. Changes in the concentration of potassium in the erythrocytes and hemoglobin types in Merino sheep under severe anemic stress. Nature (London) 200: 1215-1216 (1963).
2. Fergusson, L.C. Heritable antigens in the erythrocytes of cattle. J. Immunol. 40: 213-242 (1941).
3. Fesus, L. Further studies on the genetically determined red cell and serum polymorphism in the Hungarian Merino sheep. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet. 3 Suppl. 1: 20 (1972).
4. Harris, H. and F.L. Warren. Occurrence of electrophoretically distinct hemoglobins in ruminants. Biochem. J. 60: 29 (1955).
5. Hill, W.W.G. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. Heredity, 33: 229-239 (1974).
6. Jhon, M.E. and M. Jhon. A new hemoglobin alfa-chain variant in sheep. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet. 8, 4: 183-190 (1977).
7. Lewontin, R.C. and J. Krakauer. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. Genetics, 74: 175-195 (1973).
8. Makaveev, T.S. and J. Tjankov. Study on the genetic polymorphism of erythrocyte carbonic anhydrase in some sheep breeds in Bulgarian. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet. 3 Suppl. 1: 54 (1972).
9. Porebska, N. and B. Rembiesa. Red cell carbonic anhydrase polymorphism in some sheep breeds in Poland. Proceeding of the XVIth Int. Conf. on Anim. Blood Grps. Biochem. Genet. Leningrado. (1979).
10. Rodero, A., R. Garzón, J. Luque, D. Llanes, C. Povedano, J.M. Rodero, M. Vallejo e I. Zarazaga. Fundamentos históricos y genéticos del Merino español. Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. (1977).
11. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels. Biochem. J. 61: 629-641 (1955).

MORERA ET AL.: POLIMORFISMO DE AC, PROTEINA X Y HEMOGLOBINA EN MERINO.

12. Tucker, E.M. Genetic markers in the plasma and red blood cells. En "The blood of sheep: composition and function".: 123-153. H.E. Blunt (Edit.) Springer. Berlin and New York (1975).
13. Tucker, E.M. Y. Suzuki and C. Stormont. Three new phenotypic systems in the blood of sheep. Vox Sang. 13: 246-262 (1967).
14. Vaskov, B. and G. Efremov. Fourth hemoglobin type in sheep. Nature (London). 216: 593-594 (1967).
15. Weir, B.S. Inference about linkage disequilibrium. Biometrics. 35: 235-254 (1979).
16. Weir, B.S. and C.C. Cockerham. Testing hypothesis about linkage disequilibrium with multiple alleles. Genetics, 88: 633-642 (1978).
17. Weir, S.B. and C.C. Cockerham. Estimations of linkage disequilibrium in randomly mating populations. Heredity. 42: 105-111 (1979).