

POSTER

POLIMORFISMOS DE DNA EN LAS RAZAS OVINAS MERINO Y CHURRA LEBRIJANA

DNA POLYMORPHISMS IN MERINO AND CHURRA LEBRIJANA SHEEP BREEDS

Zamorano, M.J.¹, J. Ruiter ², S. Townsend², R. Cruickshank², M. Bruford², K. Byrne², A. Rodero¹, y J.L. Vega-Pla³

¹Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Avenida de Medina Azahara s/n. 14005-Córdoba. España.

²Institute of Zoology. Zoological Society of London . Regent's Park, NW1-4RY Londres (Reino Unido).

³Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Apartado Oficial Sucursal 2. 14071-Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Recursos genéticos. PCR. Microsatélites. Heterocigosidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic resources. PCR. Microsatellites. Heterocigosity.

RESUMEN

Las razas ovinas Merino y Churra son dos de las más importantes ovejas explotadas en España. En el primer caso, el estudio de sus características genéticas se justifica por la importancia que ha tenido en el origen de otras razas ovinas productoras de lana. La raza Churra Lebrijana se encuentra próxima a la extinción por lo que es necesario iniciar programas para la recuperación de sus recursos genéticos.

SUMMARY

The Merino and Churra Lebrijana ovine breeds are two of the most important sheeps developed in Spain. In the first case, the study of its genetic characteristics is justified by the importance it has have in the origin of other wool breeds. The Churra Lebrijana sheep breed is next the extinction therefore it is necessary to begin a conservation programme of its genetic resources.

INTRODUCCIÓN

La raza ovina Merino autóctono es el merino más antiguo y salió de España y contribuyó a la formación de las estirpes actuales distribuidas por todo el mundo. Los Reyes de Castilla y León velaron por su conservación y por el desarrollo de esta raza que, al producir la mejor lana de las conocidas, constituía una importantísima riqueza nacional. Es una raza principalmente explotada en régimen extensivo y mayoritariamente en zonas desfavorecidas y, sin duda, adaptada a las condiciones naturales de la España semiárida y a la dehesa. Constituye pues un patrimonio que hay que mantener en pureza por razones genéticas, ecológicas y no sólo históricas.

En cuanto a la raza Churra Lebrijana, habría que destacar que de todos

las variantes del tronco Churro peninsular es el único que escapa a una especialización de carácter lechero, además de ser el más adaptado para desenvolverse en zonas húmedas y fuertemente salinas del sur de la Península Ibérica. Este tronco llegó a extenderse por toda la península que-

dando más tarde relegada a pequeños núcleos que por su aislamiento dieron origen a ecotipos tan diferentes entre sí que hicieron aparecer al Churro Lebrijano en el área de la depresión del Guadalquivir. También hay que destacar que (Rodero *et al.*, 1994) estos animales probablemente son la base

Tabla I. Frecuencias alélicas con marcadores microsatélites en ovejas de raza Churra Lebrijana (CL) y Merino Autóctono Español (MAE). (Allele frequencies of microsatellites in Churra Lebrijana (CL) and Autochthonous Spanish Merino (MAE) breeds).

MAF4			MAF33			MAF65			MAF70		
Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE
161		0,014	124		0,039	127		0,018	131		0,092
163		0,027	126	0,083	0,039	129	0,150	0,214	133		0,303
171		0,067	130	0,083		131	0,650	0,446	135		0,013
173		0,095	132	0,042		133	0,100	0,286	139		0,013
175	0,167	0,054	134	0,167	0,026	137		0,018	141		0,171
177	0,400	0,041	136		0,079	139		0,018	143	0,500	0,224
179		0,323	138	0,375	0,618	141	0,100		145	0,094	0,105
181	0,200	0,122	140	0,208	0,184				147	0,250	
183	0,100	0,041	142	0,042					153		0,079
191	0,100	0,095	146		0,014				155	0,125	
193		0,054							169	0,031	
195		0,067									
197	0,033										

MAF209			OARAE54			OARAE129			OARCP20		
Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE
112	0,192	0,081	128	0,214	0,090	134		0,068	71	0,438	0,051
118	0,038		130	0,036	0,013	136		0,273	73	0,031	0,103
120		0,203	134	0,536	0,321	140		0,045	75		0,192
122	0,038		142	0,179	0,166	142		0,045	77		0,013
124	0,308	0,350	144		0,166	146		0,114	81	0,531	0,564
126		0,068	146		0,154	148		0,250	83		0,051
130	0,038		150	0,035	0,090	150		0,182	93		0,026
132	0,154	0,095				154		0,023			
134	0,231	0,054									
136		0,135									
138		0,014									

POLIMORFISMOS DE DNA EN DOS RAZAS OVINAS ESPAÑOLAS

Tabla I (continuación). Frecuencias alélicas con marcadores microsatélites en ovejas de raza Churra Lebrijana (CL) y Merino Autóctono Español (MAE). (Allele frequencies of microsatellites in Churra Lebrijana (CL) and Autochthonous Spanish Merino (MAE) breeds).

OARCP34			OARCP38			OARFCB20			OARCP134		
Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE
114	0,099	0,329	116		0,048	94	0,031	0,013	90		0,167
116	0,167	0,224	118		0,468	96	0,469	0,192	96		0,017
118	0,167	0,145	120		0,129	98	0,125	0,103	100		0,100
120		0,039	122		0,097	100		0,154	102		0,150
122	0,400	0,237	124		0,129	106	0,125	0,076	108		0,250
124	0,167	0,013	126		0,129	108	0,031	0,076	112		0,033
126		0,013				110	0,219	0,026	114		0,033
						114		0,013	116		0,032
						120		0,103	120		0,067
						122		0,244	122		0,117
									140		0,017
									142		0,017

OARFCB128			OARFCB193			OARJMP29			SHCC		
Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE	Alelos	CL	MAE
113	0,033	0,103	100		0,032	117	0,033		183		0,105
115	0,700	0,538	104		0,032	125		0,026	187		0,026
123	0,033		106		0,177	129		0,051	189		0,039
125	0,233	0,167	112		0,113	131	0,067	0,103	191	0,093	0,079
127		0,115	116	0,033	0,048	133		0,026	193	0,188	0,013
129		0,077	118	0,433	0,532	137	0,133	0,103	195	0,093	
			120	0,467	0,065	139	0,367	0,500	197	0,063	0,276
			122	0,067		141	0,400	0,178	199		0,184
						143		0,013	201	0,063	0,158
									205		0,026
									207	0,469	
									209	0,031	0,093

genética de muchas razas ovinas de América. Actualmente la situación de la raza es bastante precaria, existiendo muy pocos núcleos de animales puros.

El interés en la conservación y recuperación de las dos razas ovinas citadas justifica el esfuerzo que se realiza con este trabajo, que forma

parte de un estudio global de comparación de la variabilidad genética de algunas razas ovinas europeas.

Grosclaude en 1973 apuntaba la urgencia de activar las investigaciones que se basan en el polimorfismo bioquímico para análisis filogenético y medida de la evolución genética ante

la desaparición de ciertas razas y la homogeneización de otras. En la actualidad y con la llegada de las últimas metodologías de biología molecular, se dispone de nuevas herramientas a utilizar para cubrir estos objetivos. Así, dentro de los polimorfismos de DNA, los microsatélites proporcionan muchas de estas ventajas en los estudios de variabilidad genética dentro y entre poblaciones (Moazami-Goudarzi, *et al.*, 1994). El objetivo fundamental que se plantea es la caracterización de dos muestras con un panel de microsatélites y apuntar así unos datos valiosos para posteriores estudios genéticos de estas poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tipifican 38 muestras de raza Merino autóctono español procedentes del Centro de selección y reproducción ovina de Hinojosa del Duque (Córdoba). Los animales se escogieron al azar dentro de las siete líneas existentes en el centro.

En el caso de la raza Churra Lebrijana se estudian solamente 16 animales de una finca de Alcolea (Córdoba) y que proceden de un núcleo mantenido por la Facultad de Veterinaria de Córdoba.

Se obtienen muestras sanguíneas por punción de la vena yugular.

El protocolo de extracción de DNA consiste en lavados sucesivos para lisar las células, seguida por una digestión de la proteínas con proteinasa K y precipitación salina (Muller *et al.*, 1988).

Se amplifican un total de 16 marcadores para la raza Merino autóctono español y 13 para la Churra Lebrijana

mediante la PCR (Polymerase Chain Reaction) propuesta por Saiki *et al.* en 1985.

Las preparaciones de la PCR se realiza en un volumen final de 10ml, en un tampón 50mM KCl, 10mM Tris-ClH pH 8,3, 0,1 p.100 Triton X-100, con dNTPs 1,25mM cada uno, 2,5mM MgCl₂, 2,5 pmoles de cada cebador, 1,3 unidades de Taq DNA polimerasa y 20 ng de DNA. La reacción se somete a ciclos de tiempo y temperatura: un ciclo de desnaturalización de 1 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 60 seg a 93°C, 60 seg a 50, 55 o 60°C (dependiendo del microsatélite) y 10 ciclos de 60 seg a 93°C y 60 seg a 57°C (para todos igual) y, finalmente, un ciclo de extensión de 10 min a 72°C .

Los productos de amplificación se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6 p.100 en un secuenciador automático (ABI 373A). La caracterización posterior de los tamaños se realizó utilizando un marcador de tamaños y un análisis de regresión que se realizan con los sistemas informáticos del secuenciador.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas se procedió al recuento directo de los alelos y como medida de la variabilidad se calculó también el grado de heterocigosis por *locus* mediante la fórmula propuesta por Nei y Roychoudhry (1974).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias alélicas se expresan en la **tabla I** y los valores de heterocigosis en la **tabla II**.

Todos los microsatélites presentan

POLIMORFISMOS DE DNA EN DOS RAZAS OVINAS ESPAÑOLAS

Tabla II. Heterocigosidad (H) con marcadores microsatélites en ovejas de raza Churra Lebrijana (CL) y Merino Autóctono Español (MAE). (Heterocigosity (H) of microsatellites in Churra Lebrijana (CL) and Autochthonous Spanish Merino (MAE) breeds).

H	MAF	MAF	MAF	MAF	MAF	OARAE	OARAE	OARCP
	4	33	65	70	209	54	129	20
CL	0,75	0,76	0,54	0,66	0,84	0,63		0,53
MAE	0,95	0,57	0,67	0,81	0,81	0,81	0,84	0,63

H	OARCP	OARCP	OARFCB	OARCP	OARFCB	OARFCB	OARJMP	SHCC
	34	38	20	134	128	193	29	
CL	0,75		0,70		0,45	0,59	0,68	0,72
MAE	0,76	0,72	0,85	0,86	0,65	0,67	0,72	0,87

polimorfismo con un número de alelos entre 12 para el MAF4 y OARCP134 en la raza Merino autóctono y 3 en el OARCP20 en la raza ChurraLebrijana.

Los valores de heterocigosidad por *locus* varían entre 0,57 para el MAF33 y 0,95 para el MAF4 en la raza Merino autóctono. En la población de Churra Lebrijana los valores están comprendidos entre 0,45 para el OARFC128 y 0,84 para el MAF209.

La heterocigosidad media en la población de Merino está en torno al 76 p.100. La muestra de la raza Churra

Lebrijana, aunque muy pequeña, presenta un grado de heterocigosidad media del 66 p.100, relativamente alto si se compara con el obtenido en la primera donde la muestra es mayor y representa siete líneas de explotación.

La variabilidad genética encontrada en ambas poblaciones mediante este tipo de marcadores es elevada, lo que indica que se trata de unos paneles de marcadores muy interesantes para completar dicha información con posteriores estudios enfocados a realizar la conservación genética de estas razas.

BIBLIOGRAFÍA

- Grosclaude F., J.C. Mercier and B. Ribadeau. 1973. Genetic aspects of cattle casein research. *Neth. Mil Dairy J.*, 27: 328-340.
- Moazami-Goudarzi, K., D.Vaiman, D. Mercier, C. Grohs, J.P. Furet, H. Leveziel et P. Martin. 1994. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines francaises: premiers resultants. *Genet. Sel. Evol.*, 26: 155-165.

ZAMORANO ET AL.

Nei M. and A.K. Roychoudhry. 1974. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.

Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated

cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.

Rodero E., J.V. Delgado, A. Rodero y M.E. Camacho. 1994. Conservación de razas autóctonas andaluzas en peligro de extinción. Consejería de Agricultura y Pesca Junta de Andalucía.