



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DE OVEJAS PELIBUEY CON ACTIVIDAD**  
**REPRODUCTIVA CONTINUA MEDIANTE POLIMORFISMOS DE**  
**ADN**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ANTONIO ROLDÁN ROLDÁN**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO**  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal,  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A *Eve* por ser mi compañera de viaje y la persona que más me ama, me entiende y me soporta en este universo. El logro de uno nos pertenece a ambos.

Para mis padres *Pablo* y *Victoria*, mis hermanos *Marce*, *Yeny* y *Roberto*, mis sobrinos *Víctor* y *Enrique* y para mi abuelita *Félix* por apoyarme en todo momento y darme todo su amor.

Para *Javier* y *Karin* por su confianza y por hacerme sentir en familia.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y amigo Dr. Javier Valencia por compartirme sus conocimientos y experiencias, por estar siempre al pendiente de mí y por corregirme cuando lo necesito, gracias por todo lo que hace por mí.

Al Dr. Raúl Arredondo por su tiempo, por enseñarme las técnicas en el laboratorio y ser parte fundamental en mi formación, gracias por todas sus pláticas.

Al Dr. Luís Zarco por sus valiosos comentarios y observaciones durante la realización de este trabajo, por tener siempre un poco de tiempo para atenderme.

A la Dra. María Guadalupe Zavala por su asesoría en la parte técnica y en el análisis de los resultados.

A mis sinodales Dr. José Manuel Berruecos, Dra. María Elena Flores, Dr. Rogelio Alonso y Dr. Jaime Gallegos por su tiempo en la revisión y por sus comentarios que permitieron enriquecer este trabajo.

Al Proyecto PAPIIT IN 219115 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta tesis.

Al CONACYT por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A todos mis amigos y hermanos, Alejandra, Anita, Ariana, Juan, Lalo, Luis, Pablo, Roberto, Rodrigo y Sheila por todo su apoyo y confianza, por ser un excelente grupo de trabajo, por estar conmigo en los momentos difíciles y de diversión.

A la Dra. Sara Caballero por su apoyo y por todas las oportunidades que me ha brindado.

A todas las ovejas, que aunque trabajamos con ellas sin pedirles permiso nos regalan una vasta cantidad de conocimientos.

A la vida, por ser tan maravillosa y regalarme todos los días tanta magia.

**Tlasojkamati mauitsotsin.**

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	6
Bases genéticas de la estacionalidad reproductiva .....	6
Marcadores moleculares .....	7
Polimorfismos del receptor para melatonina 1A en ovejas con distinta estacionalidad reproductiva .....	9
RAPD .....	11
Identificación de marcadores RAPD específicos de especie .....	15
Identificación de razas ovinas mediante el uso de marcadores RAPD ....	17
Otras aplicaciones del RAPD .....	20
Análisis de la información .....	21
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	27
MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
Aislamiento de ADN .....	28
Iniciadores .....	29
Condiciones de PCR .....	29
Electroforesis y tinción .....	31
Métodos estadísticos .....	32
RESULTADOS .....	32
DISCUSIÓN .....	34
CONCLUSIONES .....	37
LITERATURA CITADA .....	38
CUADROS .....	45
FIGURAS .....	47
ANEXO .....	53
	IV

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Comparación entre los protocolos de aislamiento de ADN	45
Cuadro 2. Resultados obtenidos con los iniciadores RAPD utilizados	45
Cuadro 3. Resultados de la frecuencia alélica y polimórfica en general, en las ovejas de los grupos continua, estacional, CEPIPSA y CEIEGT	46
Figura 1. <i>Representación de cada una de las etapas del PCR, para la amplificación de un segmento específico de ADN mediante el uso de iniciadores flanqueadores de la región 5' y 3'.</i>	47
Figura 2. <i>Representación de las variaciones del PCR en el método de RAPD.</i>	48
Figura 3. <i>Geles de agarosa con la banda de ADN de las extracciones realizadas a cada una de las muestras de sangre de las treinta y cinco ovejas.</i>	49
Figura 4. <i>Matriz de datos generada a partir de los 21 iniciadores en las 35 ovejas Pelibuey.</i>	50
Figura 5. <i>Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo continuo.</i>	51
Figura 6. <i>Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo continuo y estacional.</i>	51
Figura 7. <i>Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo estacional.</i>	52

## RESUMEN

**ANTONIO ROLDÁN ROLDÁN.** Identificación de ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua mediante polimorfismos de ADN (bajo la dirección de: Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez).

La oveja presenta una actividad reproductiva estacional durante los días cortos. En la actualidad se han identificado ovejas Pelibuey que pueden reproducirse de forma continua durante todo el año, sin embargo se necesita de al menos tres años de seguimiento para su identificación. Por esto, surge la necesidad de encontrar el marcador genético que permita la rápida identificación de animales con actividad reproductiva continua. Por las características del método de Amplificación aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD) y sus buenos resultados en la identificación genética de la especie ovina, representa una opción viable en la búsqueda de algún marcador genético que permita catalogar a las ovejas por su actividad reproductiva estacional o continua, motivo por el cual se realizó el presente trabajo. Se utilizaron 35 ovejas Pelibuey adultas, 11 ovejas continuas y cuatro estacionales del Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) y, cuatro ovejas continuas y 16 estacionales del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT). A todas las hembras se les tomó por venopunción yugular 4 mL de sangre con tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Las muestras se depositaron en microtubos estériles de 1 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C. Para el aislamiento de ADN se estandarizó un protocolo diseñado para aves. Se utilizaron 29 oligonucleótidos (de 10 pb de longitud en promedio) probados exitosamente en ovinos. Para observar las bandas amplificadas, se realizaron electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, los cuales se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador y se fotografiaron para su documentación y posterior análisis. Los patrones de bandeo RAPD fueron registrados por la presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada muestra en cada locus. Los registros se combinaron posteriormente para la construcción de una matriz de datos única. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa computacional gratuito "Popgene versión 1.31". Ocho iniciadores fueron eliminados por no amplificar bandas, con los 21 restantes se obtuvieron 95 bandas, con un promedio de 4.5 bandas por iniciador (2 como mínimo y un máximo de 7 bandas), con una longitud desde los 200 hasta los 1,500 pb. Se cubrió un rango promedio de 670 pb, el menor con 250 pb y el más largo con 1,100 pb. Diecisiete bandas (17.9%) presentaron un patrón monomórfico, las restantes 78 bandas (82.1%) manifestaron un patrón polimórfico. Se encontraron 95 loci para el grupo estacional y 94 loci para el grupo continuo, una banda de 200 pb obtenida con el iniciador UBC 771 ausente en el grupo continuo también estuvo ausente en 13 ovejas (65%) del grupo estacional. Quince bandas fueron monomórficas solo para uno de los dos grupos, ocho en las continuas y siete en las estacionales, sin embargo, el porcentaje máximo de ausencia de esta banda en el grupo contrario fue de 19.8. El número y porcentaje de loci polimórficos fue de 70 y 73.68, respectivamente en el grupo estacional, mientras que en el continuo de 71 y 74.74, respectivamente. La heterocigosis esperada en general fue de 0.329, mientras que en el grupo continuo fue de 0.303 y en el estacional de 0.296. La identidad genética de Nei encontrada en las ovejas fue de 0.9410 entre continuas y estacionales, y de 0.923 entre las del CEPIPSA y CEIEGT. El dendrograma de asociación genética sitúa a ambos grupos en la misma rama. Se concluye que con los iniciadores RAPD utilizados en el presente estudio no se encontró

algún marcador que permitiera diferenciar genéticamente a las ovejas Pelibuey con actividad reproductiva estacional de las continuas. Sin embargo, el método es útil para realizar estudios de asociación genética en esta raza.

## ABSTRACT

Identification of Pelibuey sheep with continuous reproductive activity by DNA polymorphism.

The sheep presents a seasonal activity during short days, recently it has been identified Pelibuey ewes that continue to cycle throughout the year, although three years of following are needed in order to identify them. This is the importance of finding a genetic marker that allows an easiest identification of animals with continuous reproductive activity. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) constitutes the main reason of this study as it represents a viable option on the research of a genetic marker that allows the differentiation of ewes according to their seasonal reproduction, due to the characteristics of the RAPD method and excellent results on the genetic identification of the ovine species. For this work 35 Pelibuey ewes were used, 11 continuous ewes and four seasonal from Center for Education, Practice and Research in Animal Production and Health (CEPIPSA) and four continuous and 16 seasonal from Center for Education, Research and Extension in Tropical Livestock (CEIEGT). Blood samples (4 mL) were collected from jugular vein into EDTA containing tubes. Blood was stored into sterile microtubes (-80°C). For DNA isolation a standard poultry protocol was used. Twenty nine successful ovine tested oligonucleotide primers were used (10 bp average longitude). The PCR amplified products from sheep DNA samples were separated electrophoretically on ethidium bromide stained agarose gel and visualized on a transilluminator under UV light and photo documented for later analysis. RAPD banding patterns were scored for the presence (1) and the absence (0) of bands for each locus. The scores were then pooled for constructing a single data matrix. The statistical analysis of the data was performed using the free software "Popgene version 1.31" computer program. Eight primers were eliminated because the amplified products weren't available, with the remaining 21 primers 95 banding patterns were obtained with an average 4.5 bands per primer (2 maximum and 7 bands minimum), with longitudes from 200 to 1,500 bp. An average rank of 670 bp was covered from 250 bp to 1,100 bp longitudes. Seventeen bands (17.9%) presented a monomorphic pattern while the remaining 78 bands (82.1%) a polymorphic pattern. For the seasonal group 95 loci were found compared to 94 loci found in the continuous one, a band of 200 bp obtained with the UBC 771 primer was absent in the continuous flock and in 13 ewes (65%) of the seasonal group. Fifteen bands were monomorphic for only one of the two groups, eight in continuous and seven in seasonal, however, the maximum rate of absence of this band in the opposite group was 19.8. The number and average of polymorphic loci was 70 and 73.68 respectively on the seasonal group whereas in the continuous was 71 and 74.74 respectively. The expected heterozygosity on both groups was 0.329, resulting in 0.303 on the continuous group while the seasonal presented 0.296. The Nei's genetic identity found on the ewes was 0.9410 between continuous and seasonal, and 0.923 between the CEPIPSA and CEIEGT. Finally the genetic association dendrogram places both groups on the same branch. This investigation demonstrates that with the RAPD primers used on this study no marker was found that allows to genetically differentiate seasonal ewes from continuous ones. Never the less the method is useful for genetic association studies on the breeding.



## INTRODUCCIÓN

Los ovinos son clasificados como reproductores estacionales de días cortos debido a que su época reproductiva se inicia al final de verano y principios de otoño, cuando las horas luz disminuyen. La época de anestro comienza a finales del invierno, cuando las horas luz aumentan, y se caracteriza por la ausencia de ovulación (Hafez, 1952; Karsch *et al.*, 1984; Arroyo *et al.*, 2006).

En los ovinos existen marcadas diferencias raciales en cuanto al grado de estacionalidad, pues las razas provenientes de latitudes mayores a los 35°, como las inglesas (Suffolk, Hampshire, Scottish blackface), exhiben una marcada estacionalidad (Malpaux *et al.*, 1996; Valencia y Arroyo, 2005), mientras que las razas originarias de zonas mediterráneas o menos septentrionales (Merino, Rambouillet, Dorset, Dorper) manifiestan una estacionalidad menor. Existen otras razas, originarias de latitudes tropicales o subtropicales, en las que esta estacionalidad es mucho menos marcada o prácticamente nula; la raza Pelibuey pertenece a este último grupo (Trujillo, 2005; Valencia y Arroyo, 2005).

En México se han realizado varios seguimientos de la actividad estral (Valencia *et al.*, 1981; Heredia *et al.*, 1991; González *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1994) y ovulatoria (Martínez *et al.*, 1995) de la oveja Pelibuey con el objeto de conocer su actividad reproductiva a lo largo del año. De estos estudios se puede concluir que si bien la oveja Pelibuey presenta una reducción de su actividad estral entre los meses de enero y julio, siempre hay una proporción variable de ovejas, entre el 15 y el 80 %, que se mantienen ciclando durante ésta época. Esto sugiere que existen hembras de esta raza que no son estacionales, por lo que potencialmente pueden reproducirse durante los meses considerados como de “anestro estacional” (Valencia y Arroyo, 2005).

Para identificar a las ovejas que manifiestan actividad reproductiva durante los meses de anestro y a lo largo de todo el año, Valencia *et al.* (2002, 2003) hicieron el seguimiento de diciembre a julio de un grupo de hembras previamente identificadas como continuas o como estacionales, en presencia o ausencia del macho, sin embargo, no encontraron diferencias entre los grupos continuo y estacional debido probablemente a una

incorrecta categorización de los grupos. Para obtener datos del comportamiento de estas ovejas durante el resto del año, Arroyo (2006) seleccionó 10 ovejas Pelibuey adultas a las cuales les hizo un seguimiento de la actividad ovárica durante dos años consecutivos mediante la determinación periódica de las concentraciones plasmáticas de progesterona, encontrando que seis ovejas mostraron actividad ovulatoria continua durante los dos años.

Todos los estudios mencionados se realizaron en ovejas que se mantuvieron permanentemente sin gestar, parir o lactar. Sin embargo, se ha visto que la estacionalidad reproductiva se expresa más claramente cuando se desafía a los animales, por este motivo y siguiendo con algunas modificaciones el protocolo realizado por Hanocq *et al.* (1999), a partir del 2006 en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), Topilejo, D.F. y del 2007 en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), Martínez de la Torre, Ver., se ha realizado el seguimiento en un grupo de ovejas con el objeto de identificar y establecer grupos de ovejas continuas y estacionales (Valencia *et al.*, 2010).

El protocolo de identificación de los dos tipos de animales ha consistido en empadrear a las ovejas en los meses de junio y julio, para que paran en noviembre y diciembre, lleven a cabo sus tres meses de lactación y sean destetadas en marzo. Posteriormente, se les toma una muestra de sangre en la tercera semana de abril y otra en la cuarta semana para analizar las concentraciones plasmáticas de progesterona por radioinmunoensayo en fase sólida y así poder identificar a las ovejas con actividad ovulatoria. Se consideran como ovejas continuas a las que ovulan durante el mes de abril (la época de anestro más profundo) durante al menos tres años consecutivos, y las que no lo hacen son estacionales (Hanocq *et al.*, 1999). Es importante mencionar que aquellas ovejas que manifiestan actividad reproductiva en el mes de abril en este protocolo, lo hacen a pesar de haber llevado la carga fisiológica de la gestación y la lactación, encontrarse en plena época de anestro y mantenerse aisladas de los machos. Con este protocolo se han identificado 11 ovejas continuas y 4 estacionales en el CEPIPSA, mientras que en el CEIEGT, se tienen 4 ovejas continuas y 16 estacionales.

Aún cuando este protocolo es efectivo para la identificación de ovejas continuas, se requiere de varios años de seguimiento para lograr caracterizar a cada oveja, la cual para ese momento puede encontrarse hacia el final de su vida reproductiva. Por esto, surge la necesidad de encontrar un marcador genético que permita la rápida identificación de animales con actividad reproductiva continua y que al mismo tiempo permita establecer las bases para poder entender el mecanismo fisiológico implicado en la regulación reproductiva estacional de la oveja Pelibuey.

El método de Amplificación Aleatoria de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) Polimórfico o RAPD (por sus siglas en inglés), se basa en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y es una poderosa herramienta en el análisis de diferencias genéticas. Esta prueba detecta diferencias en el ADN debidas a variaciones en los fragmentos amplificados a partir de ADN genómico usando un solo iniciador con una secuencia arbitraria de nucleótidos. Este método ha sido ampliamente utilizado en las especies productivas ya que es simple, rápido y permite el análisis de un gran número de marcadores genéticos a partir de pequeñas cantidades de ADN, sin necesidad de tener el conocimiento previo de la secuencia genómica de la especie en cuestión (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). En los ovinos se ha utilizado en su identificación genética, para medir el grado de distanciamiento genético entre los ovinos y otras especies, para la identificación de marcadores específicos de especie (Kantannen *et al.*, 1995; Appa Rao *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1998; Devrim *et al.*, 2007b), y para estudiar las relaciones genéticas entre distintas razas ovinas de diferentes regiones geográficas (Gong *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Rezende *et al.*, 2005; Devrim *et al.*, 2007a; Elmaci *et al.*, 2007; Eman *et al.*, 2008; Kunene *et al.*, 2009). Su aplicación también ha dado buenos resultados en la identificación de individuos con características productivas superiores (Alves *et al.*, 2005; Khalil *et al.*, 2008), por lo cual el método de RAPD representa una buena opción en la búsqueda de algún marcador molecular que permita catalogar a las ovejas por su actividad reproductiva estacional.

El objetivo del presente estudio es encontrar algún marcador genético que permita diferenciar a las ovejas con actividad reproductiva continua de las estacionales mediante el método de RAPD.

## **REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **Bases genéticas de la estacionalidad reproductiva**

Aunque normalmente se considera que el fotoperiodo es el principal regulador de la actividad reproductiva estacional, en realidad el papel del fotoperiodo es alinear los ritmos circadianos endógenos a un periodo de 24 horas y el ritmo circanual endógeno de reproducción a un periodo de 365 días (Robinson and Karsch, 1988). En ausencia de señales ambientales, como cuando se mantiene a los animales en un fotoperiodo constante (Almeida and Lincoln, 1984; Karsch *et al.*, 1989) o al realizar la desconexión funcional de la oveja con la percepción de la luz ambiental mediante enucleación de los ojos (Legan and Karsch, 1983), pinealectomía (Bittman *et al.*, 1983) o gangliectomía cervical superior (Lincoln *et al.*, 1989), los ritmos biológicos pueden correr libremente con un periodo cercano a las 24 horas (ritmos circadianos) o a 365 días (ritmos circanales), mostrando que pueden generarse de manera endógena. En esta situación los animales revierten a un ritmo biológico inherente, el cual, en el caso de la oveja, puede mantener las variaciones estacionales en la actividad reproductiva incluso durante varios años (Karsch *et al.*, 1989). Sin embargo, estos ciclos endógenos no duran exactamente 24 horas o 365 días, por lo que gradualmente se van desfasando, mientras que en el animal intacto el fotoperiodo los modifica ligeramente para mantenerlos precisamente ajustados a un día o un año de duración.

Varios autores (Ricordeau, 1982; Notter, 1986; Hanrahan, 1987; Tchamitchia, 1988; Notter *et al.*, 1998) han mencionado que la variabilidad observada en la estacionalidad reproductiva está al menos parcialmente controlada por mecanismos genéticos. En un ejemplo de esto, Dyrmondsson *et al.* (1980) demostraron una asociación significativa entre el gen del color del pelaje y la actividad sexual fuera de estación en ovejas de Islandia.

Se han encontrado diferencias genéticas en la estacionalidad reproductiva entre razas y entre individuos pertenecientes a una misma raza. Por ejemplo, diferentes ovejas de origen Británico mantenidas en la misma locación manifiestan diferencias en la duración de su época reproductiva (Hafez, 1952). Otro ejemplo muy claro es el obtenido durante el estudio de identificación realizado para este trabajo, en el que se encontró que algunas ovejas Pelibuey son capaces de ciclar de manera continua, aún durante la época de anestro, mientras que otras ovejas mantenidas bajo las mismas condiciones no lo hacen (Valencia *et al.*, 2010).

Por otra parte, Hanocq *et al.* (1999) identificaron ovejas con actividad ovulatoria espontánea en abril, y al medir sus parámetros genéticos encontraron coeficientes de heredabilidad y repetibilidad de 0.20 y 0.30, respectivamente, lo que va de acuerdo con lo reportado por otros autores (Hanrahan and Quirke 1986; Hanrahan, 1987; Smith *et al.*, 1992), quienes encontraron heredabilidades de 0.2 a 0.32 para esta característica. Todos estos datos indican que la estacionalidad reproductiva está regulada por mecanismos genéticos, mismos que no han sido identificados de manera precisa.

### **Marcadores moleculares**

Los loci (posición que ocupan los genes a lo largo de un cromosoma; plural del griego locus, lugar) pueden ser analizados mediante técnicas moleculares y constituyen marcas, puntos de referencia dentro del genoma que son conocidos como marcadores moleculares. Estos marcadores son características del ADN que pueden diferenciar a dos o más individuos y son heredables de una generación a otra. Por lo tanto, un marcador molecular es un fragmento de ADN polimórfico (con variantes) que nos permite distinguir entre diferentes grupos taxonómicos, poblaciones, familias o individuos (Ríos *et al.*, 2009).

Las primeras técnicas que se utilizaron para el análisis genético de las especies productivas mediante marcadores moleculares fueron los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) visualizados por hibridación (Southern blot) y los microsatélites (Cushwa and Medrano, 1996). La técnica RFLP se basa en la obtención de fragmentos de ADN de distinta longitud

mediante digestión en secuencias específicas con enzimas de restricción. Estos fragmentos se separan mediante electroforesis y posteriormente son transferidos a membranas de nailon para ser hibridados con una sonda marcada (fragmento de ADN de secuencia conocida utilizado para identificar secuencias idénticas) y ser detectados con un anticuerpo específico, formando conjugados que emiten fluorescencia y permiten identificar bandas específicas (Ríos *et al.*, 2009). Aunque viable, esta técnica es laboriosa, incómoda, costosa e incompatible con el gran proceso analítico requerido para algunas aplicaciones.

El descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa -una de las más revolucionarias técnicas de la biología molecular de las últimas décadas - ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas más fáciles y efectivas (Arredondo, 1993). Entre estas, se tiene a los polimorfismos por microsatélites, una de las sucesoras en el establecimiento de la relación genética entre especies productivas. Los microsatélites son secuencias de 2 a 6 pares de bases repetidas en tándem, las cuales se amplifican por PCR y presentan un alto grado de polimorfismo, sin embargo, requieren información de la secuencia blanco en el ADN para diseñar los iniciadores de amplificación, ya que ciertas secuencias son más polimórficas en algunas especies que en otras, hecho que limita su uso. Otras dificultades de los microsatélites es que no marcan uniformemente el genoma, los fragmentos son difíciles de clonar, y aunque son marcadores codominantes funcionan como marcadores dominantes si se les utiliza como sondas, con lo que se reduce la información potencial para la genotipificación (Dodgson *et al.*, 1997).

El método de PCR se basa en tres etapas (ver figura 1): i) una de desnaturalización de la doble cadena de ADN genómico para formar dos hebras simples a las que los iniciadores pueden unirse, lo que generalmente se alcanza a 95° C; ii) otra de alineamiento de cada uno de los iniciadores (generalmente, con una longitud de 18-25 nucleótidos y con una secuencia basada en la información de la secuencia del ADN molde) a su respectiva cadena molde para flanquear la región específica que va a ser amplificada. La temperatura de esta etapa varía dependiendo de las características del iniciador, como longitud, porcentaje de GC (Guanina, Citocina) y Tm (temperatura de

fusión) pero en términos generales debe ser 5° C por debajo de su Tm; iii) y la última de extensión, que es de 72° C, temperatura a la cual trabaja de forma óptima la ADN *Taq* polimerasa para la síntesis de la copia de la cadena molde a la cual se unió el iniciador. Estas tres etapas forman un ciclo que se repite de manera secuencial entre 30 a 45 veces para poder obtener un gran número de copias de doble cadena de los fragmentos de ADN de interés. El producto sintetizado en un ciclo sirve como molde en el siguiente (Erich and Arnheim, 1992; Marle-Köster and Nel, 2003).

Los fragmentos son generalmente visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, teñidos con bromuro de etidio o plata.

### **Polimorfismos del receptor para melatonina 1A en ovejas con distinta estacionalidad reproductiva**

La melatonina secretada por la glándula pineal durante las horas de oscuridad es la hormona encargada de regular los ritmos circadianos y la estacionalidad reproductiva de los mamíferos. Para esto, la melatonina utiliza receptores, dentro de los cuales se conoce que el receptor para melatonina 1a (MTNR1A) de los mamíferos tiene que ver con los cambios en la estacionalidad reproductiva ocasionados por la melatonina (Weaver *et al.*, 1996).

Los estudios iniciales de estacionalidad con marcadores moleculares se llevaron a cabo trabajando con el receptor para Melatonina 1a, el cual se sabe que de alguna forma está involucrado en la estacionalidad reproductiva de la oveja. Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en todo el organismo y muestra cierto grado de variación a nivel del exón II (Barret *et al.*, 1997; Messer *et al.*, 1997). Pelletier *et al.* (2000) trabajaron con este receptor en las ovejas *Mérinos d'Arles* del trabajo de Hanocq *et al.* (1999), formando dos grupos de ovejas, aquellas que ovulaban regularmente en la primavera y las que nunca ovulaban en la primavera. A todas las ovejas se les amplificó el exón II y mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, con la enzima de restricción *MnII*, se genotipificaron por la presencia (+) o ausencia (-) del sitio de corte para esta enzima en ambos grupos; encontraron una asociación entre el genotipo homocigótico ausente (- -) y el grupo de ovejas que nunca ovularon en la

primavera. Resultados similares también se obtuvieron posteriormente en ovejas Ile-de-France (Hernández *et al.*, 2005).

En un estudio en el que se investigó el efecto del receptor de melatonina 1a sobre la fertilidad y prolificidad obtenida en partos de otoño, se seleccionaron ovejas cruzadas (50% Dorset, 25% Rambouillet y 25% Finnsheep) con base en la fertilidad obtenida en empadres de mayo y junio. Los autores encontraron dos sitios polimórficos para las enzimas de restricción *MnII* y *RsaI*, asignando los alelos *M* y *m* para la presencia y ausencia, respectivamente, al sitio de corte para *MnII* y los alelos *R* y *r* para la presencia o ausencia, respectivamente, al sitio de corte para *RsaI*. No se encontró efecto del genotipo MTNR1A sobre la fertilidad y prolificidad en este grupo de ovejas (Notter *et al.*, 2003).

Más recientemente, se intentó determinar si existía alguna relación entre el gen MTNR1A y la estacionalidad reproductiva. Para esto se estudiaron dos grupos de razas, las que mostraban actividad reproductiva no estacional (Small Tail Han y Hu) y las estacionales (Dorset, Suffolk y el Merino Alemán). Al igual que en el estudio anterior, se trabajó con las enzimas de restricción *MnII* y *RsaI*. Se encontró una asociación entre los genotipos *MM*, *RR* y la actividad reproductiva no estacional y entre los genotipos *mm*, *rr* y la actividad reproductiva estacional de las ovejas (Chu *et al.*, 2006).

Este mismo método fue utilizado también por Mateescu *et al.* (2009) en ovejas Dorset y  $\frac{3}{4}$  Dorset x  $\frac{1}{4}$  East Friesian, las cuales se mantenían en un sistema de aceleramiento de partos (STAR), con información de su primero y segundo parto. A estas ovejas se les amplificó un fragmento del gen del receptor para melatonina 1a, para genotipificarlas con las enzimas de restricción *MnII* y *RsaI*. Las ovejas con al menos un alelo *M* concebían a menor edad, podían ser cubiertas y concebir fuera de época y presentaban un intervalo menor entre el segundo y tercer parto, comparadas con las que expresaban el alelo *m*. Este estudio mostró por primera vez una asociación entre el gen MTNR1A y la frecuencia de partos, lo que demuestra la importancia de este gen como un marcador potencial de ADN hacia la característica de actividad reproductiva fuera de estación.

Si bien en estos dos últimos trabajos se encontró una asociación entre el gen MTNR1A y la ausencia de estacionalidad reproductiva, estos se realizaron haciendo



comparaciones entre razas y cruces de razas, sin una rigurosa categorización entre animales continuos y estacionales, hecho que limita la obtención de resultados claros.

## **RAPD**

El método de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico propone la utilización de iniciadores arbitrarios para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma mediante la técnica de PCR. Se ha utilizado ampliamente para la identificación genética de distintas especies, debido a que este método es simple, rápido y permite el análisis de un gran número de marcadores genéticos, utilizando pequeñas cantidades de ADN, sin el requerimiento de la clonación, secuenciación o alguna otra forma de caracterización del genoma.

El RAPD surgió en el año de 1990 por dos grupos de investigación, el de Welsh y McClelland (1990), y el de Williams *et al.* (1990). Estos grupos publicaron de manera simultánea y en la misma revista sus trabajos. Sin embargo, en el año siguiente Caetano-Anollés *et al.* (1991a) publicaron un método similar, motivo por el cual se les atribuye también el desarrollo de este método. Welsh y McClelland (1990) llamaron al método “arbitrarily primer PCR” (AP-PCR) y señalan que este método es rápido y simple, con el que se puede trabajar cualquier tipo de ADN sin tener conocimiento previo de la biología molecular de los organismos que van a ser investigados, además que puede ser utilizado para obtener polimorfismos (expresados como bandas separadas por electroforesis) que pueden ser usados como marcadores para mapeo genético en una amplia variedad de organismos utilizando diferentes iniciadores de secuencias arbitrarias. Los iniciadores, de una longitud de alrededor de 20 pares de bases, pueden ser elegidos de grupos estándar, ya conocidos, no obstante que hayan sido utilizados para otros propósitos, con el objetivo de permitir que los resultados sean comparables entre laboratorios. Los datos obtenidos por este método permiten diferenciar individuos estrechamente relacionados, pertenecientes a la misma especie, por lo que este método puede ser útil para trabajar con un gran número de individuos dentro de una población y puede ser utilizado en programas reproductivos, mapas genéticos, genética de poblaciones y epidemiología.

Williams *et al.* (1990) denominaron al método como “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD); y lo destacaron como un proceso simple, basado en la amplificación de segmentos aleatorios de ADN genómico con iniciadores de secuencias arbitrarias de nucleótidos, que producen bandas polimórficas que sirven como marcadores genéticos, los cuales fueron llamados marcadores RAPD. Los autores propusieron el uso de iniciadores considerando las siguientes restricciones, solo 9 ó 10 nucleótidos de longitud, con una composición entre 50 y 80% de GC y sin secuencias palindrómicas. Cada iniciador amplifica por PCR varios segmentos de ADN (detectados por electroforesis en geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio), en muchos de los cuales aparecen polimorfismos entre las especies analizadas. Un hecho importante es que casi todos los marcadores RAPD presentan un carácter dominante ya que no es posible distinguir si un segmento de ADN ha sido amplificado de un locus que es heterocigótico (1 copia) u homocigótico (2 copias). Mientras que marcadores RAPD codominantes son rara vez detectados como segmentos de ADN de distinto tamaño amplificados a partir de un mismo locus. Los autores mencionan que los marcadores RAPD pueden ser apropiados para la elaboración de mapas genéticos, aplicaciones reproductivas en plantas y animales y para obtener huellas genéticas, con particular uso en estudios de genética de poblaciones.

El tercer grupo, integrado por Caetano–Anollés *et al.* (1991a) llamaron al método de detección genética entre organismos “DNA Amplification Fingerprinting” (DAF) y propusieron el uso de un solo iniciador de secuencia arbitraria de tan solo 5 bases de longitud, el cual produce un complejo patrón de bandeo que debe ser visualizado por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con plata. Este método resultó eficiente para detectar variaciones entre humanos y entre cultivos de soya.

A diferencia del PCR convencional, en el método RAPD se utilizan cantidades mínimas de ADN a las que se une un solo iniciador de corta longitud (5-21 pb) y secuencia arbitraria. En la etapa de alineamiento el iniciador se alinea con la secuencia complementaria presente en el ADN molde, pero es necesario que otro iniciador con la misma secuencia arbitraria se alinee con la cadena opuesta, en una orientación y distancia adecuada (la máxima distancia de inserción entre los dos iniciadores debe ser

igual o menor a las 2,500 pb) para que un fragmento sea amplificado (Cushwa and Medrano, 1996) (Figura 2). Diversos autores mencionan que cuando se utilizan temperaturas de alineamiento suficientemente bajas, se espera que los iniciadores alineen en una gran cantidad de lugares en la cadena de ADN, permitiendo amplificar un número de fragmentos (1 a 10 o más) de distintos loci, durante la misma reacción (Welsh and McClelland, 1990; Waugh and Powel, 1992). El polimorfismo que se detecta puede deberse a inserciones, eliminaciones o un simple cambio en un par de bases, que modifican o eliminan el sitio de unión del iniciador; o también a inserciones en la secuencia genómica que separan los sitios de inserción del iniciador a una distancia que no permite la amplificación (Enrech, 2000).

Debido a su herencia dominante, los marcadores RAPD se expresan como presencia o ausencia de un producto amplificado, lo cual se traduce en una pérdida de información si se les compara con marcadores heredados de forma codominante (RFLP o microsatélites). Sin embargo, los marcadores RAPD proveen una enorme fuente de datos y por lo tanto pueden ser más informativos sobre la estructura de las poblaciones y su diversidad genética (Enrech, 2000). El número, reproducibilidad e intensidad de las bandas puede verse afectado por algunos parámetros tales como la concentración de ADN, la temperatura de alineamiento, la longitud y secuencia del iniciador y la concentración de sales. Cada iniciador de longitud idéntica pero de distinta secuencia, presenta un patrón de bandeo diferente en el mismo ADN (Welsh and McClelland, 1990).

Cuando se utilizan temperaturas de alineamiento desde las de baja astringencia (35-50°C) hasta las de alta astringencia (60°C), el patrón de bandeo cambia ligeramente al aumentar la temperatura, hasta alcanzar un punto en el cual la temperatura es demasiado elevada como para que los iniciadores puedan llevar a cabo un alineamiento efectivo con la hebra de ADN, por esto, se puede concluir que en el método AP-PCR se puede utilizar un amplio rango de temperaturas con las que se obtienen bandas reproducibles y que la temperatura de alineamiento se debe ajustar para distintos genomas e iniciadores, tomando en cuenta la secuencia y longitud de estos (Welsh and McClelland, 1990).

Las bandas generadas se pueden clasificar de acuerdo a su intensidad de tinción (fuerte, mediana, débil) con el bromuro de etidio, lo cual puede ser un reflejo de la especificidad de la amplificación (Enrech, 2000). Se ha observado una amplia variación en la intensidad de las bandas, reproducible entre experimentos. Esta variación se puede deber a múltiples copias de la región amplificada en el molde, o a la eficiencia con la cual regiones particulares son amplificadas (Marle-Köster and Nel, 2003).

Desde la publicación del método RAPD, una de las principales preocupaciones fue la posibilidad de reproducir los resultados obtenidos. Para poder garantizar la repetibilidad de los resultados, al iniciarse un estudio con aplicación de este método, se deben establecer las condiciones óptimas en los dos pasos fundamentales del proceso: la extracción y la amplificación del ADN (Enrech, 2000). En la extracción es importante el uso de protocolos bien establecidos o kits comerciales que eviten al máximo el uso de sustancias contaminantes que precipiten junto con el ADN o bien evitar el manejo excesivo que lleve a la destrucción parcial del ADN. Por otra parte, es importante establecer las condiciones de PCR, dado que ligeros cambios en los tiempos y temperaturas pueden llevar a drásticas modificaciones, ya que es una técnica altamente sensible (Dodgson *et al.*, 1997). Así mismo, se debe tener un gran cuidado en la concentración óptima de los elementos de la solución de PCR (Polimerasa, ADN, iniciadores,  $Mg^{++}$ ), que podrían llevar al fracaso de la amplificación, todo esto debido a que estas alteraciones afectan la unión efectiva del iniciador y por ende la falla en la amplificación. Por ejemplo, en un estudio se encontró que la mayor fuente de variación en la reacción de RAPD se debió a la variabilidad en las preparaciones comerciales de la *Taq* ADN polimerasa (Meunier and Grimont, 1993). Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación, estas deben permanecer sin variación durante todo el experimento.

Para confirmar que las bandas observadas correspondan a la amplificación del ADN genómico y no a artefactos del iniciador, el ADN debe ser omitido para reacciones control en cada iniciador. El cambio de un solo oligonucleótido en la secuencia del iniciador determina si un segmento dado de ADN pueda ser amplificado o bien que el patrón de bandeo sea distinto (Williams *et al.*, 1990).

Los marcadores RAPD pueden ser comprobados con marcadores RFLP ya probados en la segregación de individuos, estos marcadores RAPD pueden ser más informativos debido a que alinean en distintas regiones, que pueden coincidir con otros marcadores RFLP, cubren espacios que dejan los marcadores RFLP y se extienden hasta regiones teloméricas (Williams *et al.*, 1990).

Ciertos iniciadores pueden producir patrones no relacionados entre animales no relacionados y patrones idénticos en animales muy cercanos. Se cree que los sitios de unión de los iniciadores están localizados aleatoriamente a lo largo del genoma blanco y pueden flanquear tanto las regiones conservadas como las altamente variables (Caetano-Anollés *et al.*, 1991b).

La técnica de PCR se popularizó por su aparente simplicidad y altas probabilidades de reproductibilidad; desafortunadamente, debido a la necesidad de conocer la secuencia del ADN, se vio limitada en algunas de sus aplicaciones, pero a partir del uso de iniciadores de secuencia arbitraria como en el método RAPD, se abrió un nuevo campo para el uso del PCR.

El método RAPD fue adoptado desde su publicación debido a que es simple y de bajo costo, no requiere marcadores radiactivos, utiliza cantidades mínimas de ADN, provee una enorme fuente de datos y por lo tanto, es altamente informativo sobre la estructura de las poblaciones y su diversidad genética.

Debido a todas estas características el método RAPD se ha usado de manera idónea para la identificación genética de los ovinos, para diferenciarlos de otras especies y encontrar variaciones y distanciamientos raciales entre distintas zonas geográficas.

### **Identificación de marcadores RAPD específicos de especie**

Entre los usos del RAPD destacan los encaminados a la diferenciación genética de los ovinos con las distintas especies productivas, principalmente con el resto de los rumiantes (bovinos y caprinos).

En esta sección se describe una serie de artículos enfocados al uso de marcadores RAPD específicos para la identificación de distintas especies productivas, entre ellas los ovinos.

Kantanen *et al.* (1995) trabajaron con marcadores RAPD para detectar variaciones entre bovinos y ovinos. Para esto utilizaron cinco razas nativas finlandesas de vacas (108 individuos) y 15 ovejas finlandesas de color blanco y gris. En el caso de los bovinos probaron 57 oligonucleótidos, de los cuales solo 11 amplificaron bandas, mientras que para los ovinos, de 40 oligonucleótidos probados, solo 13 lograron amplificar. Encontraron que dos de 10 fragmentos mostraron homología entre las dos especies y que tres marcadores eran específicos para bovino y siete para ovino. Mencionan que existe un alto grado de distanciamiento genético entre estas dos especies y un alto grado de homogeneidad en el rebaño ovino, cosa que no sucede en los bovinos como lo indicaban pruebas de sangre y proteínas.

En un análisis de RAPD, Joshi *et al.* (1998) usaron iniciadores arbitrarios en diferentes especies animales: oveja, cabra, bovino, búfalo y perro. Utilizaron tres oligonucleótidos (10 pb) con dos programas de PCR, uno con baja astringencia y otro con alta astringencia, observaron que al aumentar la temperatura de alineamiento durante la fase inicial del ciclo disminuye el número de bandas pero éstas son más específicas para la identificación. Encontraron perfiles individuales únicos para cada especie, en términos de número y posición de las bandas. Este estudio muestra que este método es altamente sensible y que ligeros cambios permiten eliminar bandas inespecíficas y quedarse solo con aquellas que dan información confiable de las variaciones en las secuencias.

Appa Rao *et al.* (1996) hicieron la detección de marcadores RAPD específicos de especie en animales de granja, trabajando con cuatro especies: oveja, cabra, bovino Cebú de la India y búfalo. Utilizaron 14 iniciadores (Operon Technologies), los cuales generaron 542 marcadores RAPD, lo que demuestra que con pocos iniciadores se puede obtener una gran cantidad de información. Calcularon el coeficiente de similitud entre los patrones de las bandas y los datos que obtuvieron demostraron un bajo coeficiente de homología (0.15-0.34) entre las distintas especies debido a la gran diversidad que existe entre cada una. Encontraron marcadores específicos de cada especie que pueden ser utilizados para su identificación taxonómica.

En un estudio realizado en especies productivas estrechamente relacionadas, Devrim *et al.* (2007b) hicieron la determinación de marcadores genéticos específicos de especie

por RAPD, trabajando con muestras de oveja, cabra y bovino (20 animales/grupo). Probaron 15 oligonucleótidos y solo cinco amplificaron, analizaron la distancia genética mediante el coeficiente de Nei y obtuvieron 39 loci de los cuales, 16 bandas fueron específicas de especie. Encontraron una identidad genética entre la cabra y la oveja de 0.498, pero estas dos especies están distanciadas genéticamente de los bovinos 0.87 y 0.77, respectivamente. De este estudio se desprende que no todos los marcadores RAPD son informativos para todas las especies, pero la información que brindan permite hacer una clara distinción genética aún entre especies a las que siempre se les ha asignado un parentesco cercano.

En todos estos trabajos, con el uso del método RAPD es posible obtener marcadores que permiten identificar y clasificar genéticamente a los ovinos de otras especies productivas, pero al mismo tiempo el RAPD es útil para establecer el grado de homología genética entre los individuos pertenecientes a distintas especies mediante el número de bandas que comparten. Por esto, se menciona que el método RAPD es muy eficiente para la identificación de especies, especialmente para aquellas que están relacionadas (Devrim *et al.*, 2007b).

### **Identificación de razas ovinas mediante el uso de marcadores RAPD**

En esta sección se describen varios artículos orientados a estudiar las relaciones genéticas entre distintas razas ovinas de diferentes regiones geográficas, utilizando marcadores RAPD.

Los primeros estudios que se hicieron para medir el grado de relación genética entre razas de una región en particular, utilizando el método RAPD, se realizaron en ovinos de China y de la India. Gong *et al.* (2002) en China, trabajaron con siete razas endémicas y tres razas importadas. De 43 oligonucleótidos que probaron, solo 35 fueron polimórficos. Encontraron que el porcentaje de marcadores polimórficos entre las razas era del 66.2, con un índice de polimorfismo genético para cada población de 0.91, lo que indica una alta variación genética entre las razas. En un estudio realizado en razas ovinas de la India, se utilizaron cuatro razas endémicas: Marwari, Mandya, Madras roja y Muzaffarnagarasi (20 animales por raza). Se probaron seis oligonucleótidos (Operon

Technologies) y con todos se lograron amplificar bandas. Un oligonucleótido amplificó para las cuatro razas y se encontró que al menos un oligonucleótido era específico para cada raza. El distanciamiento genético en estas cuatro razas fue muy bajo (0.07-0.19), lo cual indica una estrecha cercanía genética (Kumar *et al.*, 2004). En los dos estudios anteriores se observa que mediante el método RAPD es posible conocer que tan emparentados se encuentran los individuos de una región, ya que mientras las razas ovinas chinas presentan una alta variación genética, las de la India se han mantenido sin grandes variaciones debido tal vez a que sus rebaños han permanecido sin la introducción de nuevos individuos, pero que al mismo tiempo indica un alto grado de consanguinidad.

Rezende *et al.* (2005) estudiaron la variabilidad genética en razas ovinas brasileñas de pelo. Trabajaron con cinco razas de pelo: la Santa Inés y las razas con las que dieron origen a la raza Santa Inés: Rabo Largo, Somalí, Morada Nova y Bergamasca (238 animales en total). Probaron 140 iniciadores y solo 19 amplificaron bandas polimórficas, de las cuales obtuvieron 44 loci. Aquí se puede observar la importancia en la selección de iniciadores probados con éxito, ya que en el estudio de ovinos de la India (Kumar *et al.*, 2004) el 100% de los iniciadores probados amplificaron, mientras que en este estudio solo el 13.5% de los iniciadores probados lograron amplificar bandas polimórficas. Todas las razas presentaron marcadores genéticos específicos y se encontró una diferencia racial total del 14.5%, lo que indica un bajo grado de distanciamiento genético entre este grupo de razas brasileñas. Los autores reportan que la Raza Santa Inés está emparentada con la Bergamasca en un 97% y la Rabo Largo con estas, en un 81%.

En razas turcas de ovinos, Elmaci *et al.* (2007) hicieron un análisis de ADN polimórfico mediante RAPD en tres razas turcas: Kirvircik, Gökceada y Sakiz (108 individuos en total), para ello probaron 15 iniciadores, de los cuales seleccionaron ocho y obtuvieron 82 loci. No se encontraron bandas que estuvieran presentes solo en una raza y ausentes en las demás, es decir, con estos iniciadores no se obtuvieron bandas positivas que funcionaran como marcadores moleculares para la identificación genética de alguna de las tres razas. Reportan un porcentaje de loci polimórficos de 80.4 para la Kirvircik, de



78 para la Gökceada y de 73.1 para la Sakiz, y una diversidad genética total de 0.22. Al construir el dendrograma encontraron dos ramas, una con la raza Kirvircik y otra con las razas Gökceada y Sakiz.

Devrim *et al.* (2007a) hicieron un estudio del polimorfismo genético y la diversidad de razas ovinas del Noreste de Anatolia. Trabajaron con 91 animales de cuatro razas: Morkaraman, Akkaramann, Tuj y Hemshin, probaron 50 iniciadores y solo 12 fueron polimórficos, logrando amplificar 71 loci, de los que 66 (92.6%) fueron polimórficos. Al realizar el dendrograma encontraron la división de las razas en dos grupos, uno formado por Morkaraman y Akkaramann y el otro por Tuj y Hemshin, lo cual tiene relación con el origen geográfico y distribución de estas razas.

En un estudio de la variación genética mediante el uso de RAPD entre cinco razas ovinas egipcias (Eman *et al.*, 2008): Ossimi, Rahmani, Barki, Saidi y Sohagi, se probaron cinco iniciadores, con los cuales se amplificaron 57 bandas, de las que 98.2% fueron polimórficas. Se encontró que seis bandas eran específicas de raza y una alta (0.83-0.97) similitud genética entre las cinco razas. Al realizar el dendrograma observaron que las razas se dividen en dos grupos: uno formado por las razas Ossimi y Rahmani y el otro se divide en dos, la Barki y las Saidi y Sohagi. Al analizar los últimos estudios es importante mencionar que el método RAPD permite conocer cuáles fueron las razas que sirvieron de base para la creación de nuevas razas y qué tanto se han distanciado genéticamente éstas a lo largo del tiempo. Incluso se ha podido comprobar que las variaciones genéticas son acordes con el grado de distanciamiento geográfico.

Algunos autores mencionan que es posible combinar los datos genéticos y fenotípicos en una base de datos para su análisis. Kunene *et al.* (2009) hicieron para esto un estudio de la diversidad genética y fenotípica en la población de ovejas de Zulu. Trabajaron con tres poblaciones con un total de 52 ovejas Zulu. Probaron 21 iniciadores (Operon Technologies) y solo seis produjeron bandas. Obtuvieron 2,744 bandas, de las cuales el 40% fueron polimórficas, este dato demuestra que los iniciadores RAPD son altamente informativos. El análisis genético mostró una alta similitud (88-94%) entre las tres poblaciones, valores que se relaciona con los datos fenotípicos observados. Los autores

hacen mención de la importancia de conocer esta información y sus implicaciones para los programas de explotación y conservación.

### **Otras aplicaciones del RAPD**

El método RAPD también ha sido utilizado para identificar y mapear marcadores polimórficos en el pedigrí de las ovejas del “AgResearch International Mapping Flock (IMF)” (Cushwa *et al.*, 1996), para esto se utilizaron hijos e hijas de ocho hermanos registrados en el pedigrí de la IMF, probando 131 iniciadores de secuencia arbitraria de 10 nucleótidos de longitud. Cuarenta y cinco de los cincuenta y tres marcadores obtenidos fueron mapeados en los mapas de asociación genética de la IMF, de estos, 44 marcadores RAPD fueron asignados a un cromosoma en específico y al menos un marcador se localizó en 17 de los 26 autosomas y en ambas cromosomas sexuales. Los polimorfismos obtenidos fueron comprobados mediante evaluación de pedigrí, análisis de segregación y Southern blot. Los investigadores reportan que los resultados obtenidos demuestran que el método RAPD es una poderosa herramienta para la identificación de polimorfismos que pueden ser usados como marcadores para la construcción de un mapa de asociación genética en ovinos.

Otra aplicación del método RAPD ha sido en la identificación de individuos con características productivas o adaptativas superiores. En gallinas al realizar cruzamientos y retrocruzamientos entre líneas puras Rhode Island roja y blanca, diferenciadas por características como producción y calidad del huevo fue posible detectar marcadores RAPD que distinguieron a las líneas puras (Wei *et al.*, 1997). En un estudio también de cruzamiento entre dos líneas puras de conejos para obtener líneas sintéticas utilizadas como líneas paternas y maternas, se utilizaron un total de 526 hijas de la quinta generación para establecer diferencias entre individuos utilizando marcadores RAPD. Las características evaluadas fueron entre otras, tamaño de la camada al nacimiento y destete, peso de la camada al nacimiento, 7 días, 21 días y al destete, peso corporal a las cuatro y ocho semanas de edad. El análisis permitió identificar tres marcadores RAPD que explicaban desde un 10 hasta un 16.8% las variaciones encontradas en las distintas características productivas entre las cepas (Khalil *et al.*, 2008). En un trabajo realizado

en 17 generaciones de tres líneas de codornices japonesas, dos seleccionadas (para la producción de carne y huevo) y otra control, los resultados sugirieron que los marcadores RAPD representan una herramienta útil para el estudio de la variabilidad genética entre las dos líneas de codornices seleccionadas y el grupo control (Ali *et al.*, 2002). El método RAPD se utilizó para identificar toros Nelore con un inicio de la maduración reproductiva temprano o tardío, el dendrograma obtenido a partir de los patrones RAPD permitió la diferenciación de las clases fenotípicas. Los autores concluyeron que los marcadores RAPD pueden ser usados en programas reproductivos para identificar genotipos que favorezcan la maduración sexual precoz en toros Nelore (Alves *et al.*, 2005).

### **Análisis de la información**

Un alelo es una forma alterna de un gen. Si el gen corresponde a una secuencia específica de nucleótidos a lo largo de una molécula de ADN, los alelos representan las diferentes secuencias de nucleótidos que son posibles para ese locus específico. La variabilidad genética es necesaria para que se lleve a cabo la evolución, ya que si todos los individuos de una población son homocigóticos para el mismo alelo de un locus en particular, las frecuencias alélicas no cambiarían de una generación a otra y la evolución no sería posible. Por otra parte, cuanto mayor sea el número de loci variables y mayor la cantidad de alelos en cada uno de estos locus, mayor es la probabilidad que cambie la frecuencia de los alelos en la siguiente generación.

La frecuencia génica o alélica es el concepto utilizado para cuantificar la variación genética y se define como una medida de la presencia de un alelo dado en una población; es decir, la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo (p o q).

Es imposible estudiar todos los loci de una población para identificar aquellos que sean polimórficos, para tal fin se toma una muestra de loci génicos. Si la muestra se toma al azar, puede ser representativa y los resultados aplicables a toda la población. Es importante tomar en cuenta que entre mayor sea el tamaño de la muestra, existe mayor probabilidad de encontrar loci polimórficos.

La frecuencia genotípica se obtiene dividiendo el número de veces que se observa el genotipo deseado AA, Aa o aa (dominante, heterocigótico y recesivo, respectivamente), entre el número total de genotipos. Si se tiene establecida la relación entre los genotipos y los fenotipos, es posible transformar las frecuencias fenotípicas en frecuencias genotípicas. Esto se facilita en marcadores codominantes, ya que los individuos heterocigóticos presentan un fenotipo distinto de los dominantes y recesivos, por ejemplo, un color de pelaje gris, contra blanco y negro. Mientras que en marcadores dominantes solo es posible distinguir dominantes y recesivos, ya que los heterocigóticos quedan incluidos en los dominantes, siguiendo el ejemplo anterior solo existe blanco o negro.

La ley de Hardy-Weinberg (H-W) dice que en ausencia de fuerzas evolutivas como mutación, migración, deriva génica y selección natural, en poblaciones con apareamiento al azar, el proceso de la herencia no cambia las frecuencias alélicas ni las frecuencias genotípicas de un locus dado, por lo tanto, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. El apareamiento al azar indica que todos los individuos tienen la misma posibilidad de apareamiento, independientemente de su constitución genética. Las frecuencias genotípicas de equilibrio en cualquier locus deben alcanzarse en una sola generación de apareamiento al azar.

Esta ley podría explicarse con el siguiente ejemplo: En un gen con dos alelos, A y a, la frecuencia del alelo A es p y la frecuencia del alelo a es q. Las frecuencias genotípicas para la generación 0 quedarían de la siguiente manera  $AA=p^2$ ,  $Aa=2pq$  y  $aa=q^2$ . Si el apareamiento es aleatorio, la probabilidad de que cualquier alelo del gameto femenino se reúna con cualquier alelo del gameto masculino será la misma. Esto se puede observar de manera más clara en el siguiente cuadro.

♂ / ♀	A (p)	a (q)
A (p)	A+A=AA p+p=p <sup>2</sup>	A+a=Aa p+q=pq
a (q)	A+a=Aa p+q=pq	a+a=aa q+q=q <sup>2</sup>

Si se resumen los resultados del cuadro para la generación 1 se obtendrían las siguientes frecuencias genotípicas: AA=p<sup>2</sup>, Aa=2pq y aa=q<sup>2</sup>, como se puede observar estas frecuencias son las mismas que la generación anterior.

La ley de H-W establece las condiciones (irreales) de lo que sucede cuando no existe la evolución, por esto, nos sirve de hipótesis nula para entender los cambios que se presentan en nuestra población.

Con un marcador dominante, pueden observarse solo dos clases genotípicas: AA+Aa y aa; es decir, una de las clases homocigóticas se confunde con el heterocigoto. El gel con el patrón de bandas de un marcador dominante para un locus mostrará, para cada individuo, ya sea una banda o ninguna. Las bandas se registran con un 1 si están presentes y un 0 si están ausentes. El cálculo de la frecuencia alélica (p, q) se realiza de la siguiente forma:

Cálculo de la frecuencia esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$(p^2+2pq)+q^2=1$$

Donde:

$p^2+2pq$ = número de individuos que presentan el alelo A\_ (AA+Aa)

$q^2$ = número de individuos que presentan el alelo aa

Cálculo de la frecuencia observada:

$$P1+P2=1$$

Donde:

$P1= n1/N=$  (número de individuos que presentan el alelo A\_)/ (número total de individuos)

$P2= n2/N=$  (número de individuos que presentan el alelo aa)/ (número total de individuos)

$q = \sqrt{P_2}$  y por consecuencia,

$p + q = 1$  y

$p = (1 - q)$

Mediante el uso del método RAPD no es posible identificar a los individuos heterocigóticos, pero si se puede estimar el número esperado de heterocigotos en una población para un determinado locus, utilizando la siguiente fórmula:

$$2pqN$$

Donde:

$p, q$  = es la frecuencia alélica para un determinado locus

$N$  = número total de individuos.

*Modificado de IPGRI-Cornell University, 2007*

Otra medida de la variabilidad genética es la frecuencia promedio de individuos heterocigóticos por locus o heterocigosis de una población. Este se obtiene calculando primero la frecuencia de individuos heterocigóticos para cada locus y después se saca la media de estas frecuencias para todos los loci. La frecuencia observada de heterocigosis ( $H_{obs}$ ) es el número total de heterocigóticos observados divididos entre el número de individuos muestreados. Es una buena medida de la variación porque estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en una población sean diferentes. Otro indicador de variación genética en las poblaciones naturales es la heterocigosidad esperada ( $H_{esp}$ ) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esta heterocigosidad puede ser calculada como  $1 - \text{sumatoria de } p^2$ , siendo  $p^2$  la varianza estándar entre subpoblaciones. Se obtiene una descripción más exacta de una población cuando se analizan muchos loci distintos y la media de la  $H_{esp}$  se calcula como el promedio de la heterocigosidad esperada. La heterocigosis es la medida de variación genética utilizada por la mayoría de los genetistas de poblaciones.

A través del Índice de fijación o estadístico  $F$  de Wright es posible caracterizar la distribución genotípica de dos alelos en un locus, basándose en la diferencia entre la heterocigosidad encontrada y la esperada por el equilibrio de H-W. Los estadísticos de  $F$  pueden calcularse a partir de la heterocigosis observada en los diferentes niveles

jerárquicos (individuos, subpoblaciones y población total). El entrecruzamiento no aleatorio de las subpoblaciones es descrito por  $F_{IS}$  y se define como la reducción de la heterocigosis de un individuo causada por el entrecruzamiento no aleatorio dentro de su población (Wright, 1980). Dos gametos son correlacionados si ambos presentan dos alelos idénticos por descendencia.  $F_{IS}$  es calculada como  $1 - (H_{obs}/H_{esp})$ . Si los valores de heterocigosidad son idénticos, entonces  $F_{IS}$  es cero, la población está en equilibrio de H-W y no hay correlación entre los gametos unidos. La endogamia nos indica que se observan menos heterocigóticos de los que se esperarían en el equilibrio de H-W, el valor de  $F$  sería mayor que cero y no existiría correlación entre la unión de gametos. La exogamia al contrario, nos indica que se observan más heterocigóticos de los que se esperarían en H-W, con un valor de  $F$  menor que cero. La correlación es negativa porque es más probable que los gametos que conforman a los cigotos lleven alelos que no son idénticos por descendencia.

El entrecruzamiento aleatorio entre poblaciones  $F_{ST}$  es el grado de correlación existente entre gametos unidos al azar dentro de una subpoblación con respecto a los gametos unidos en la población total, describe la situación particular de una subpoblación (Wright, 1951).  $F_{ST}$  se calcula como  $1 - (H_{esp} \text{ en la subpoblación} / H_{esp} \text{ en la población total})$ .  $F_{ST}$  es positiva cuando hay restricción en el flujo génico entre las subpoblaciones porque los gametos de una subpoblación llevan alelos que derivan más a menudo de un antecesor común en comparación con los gametos de la población total.

Un método propuesto por Masatochi Nei (1973), es ampliamente utilizado para estimar la diferenciación genética entre dos poblaciones a partir de los datos obtenidos en la electroforesis en gel. Este método se basa en el cálculo de la identidad genética a través del cálculo de la proporción de genes que tienen una estructura en las dos poblaciones, y de la distancia genética, que estima el número de sustituciones alélicas por locus que han ocurrido en la evolución independiente de las dos poblaciones. Hay una sustitución alélica cuando uno o un grupo de alelos son reemplazados por otros distintos. La distancia genética puede variar desde 0 hasta infinito, ya que un locus puede experimentar más de una sustitución alélica completa.

Existen diversos programas computacionales que permiten formar bases de datos con la información de las bandas obtenidas con cada iniciador en todos los individuos y así, calcular las frecuencias alélicas para los distintos locus en la población y entre las distintas subpoblaciones. Algunos de ellos como el programa POP GENE (Yeh *et al.*, 1999), incluso permiten obtener el dendrograma de la relación genética entre los individuos.

Los resultados se pueden reportar como el porcentaje de bandas o loci polimórficos o como la diversidad genética estimada en la población y entre las subpoblaciones. Los patrones de bandeo obtenidos pueden clasificarse como productos monomórficos que permiten caracterizar a los organismos a nivel de especie, o como productos polimórficos con los que se determina la identidad individual (Caetano-Anollés *et al.*, 1991a y b) mediante bandas positivas (presentes solo en esos individuos) y negativas (ausentes solo en esos individuos) (Eman *et al.*, 2008).



## **HIPÓTESIS:**

Existen diferencias genéticas entre las ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua y estacional que pueden ser detectadas mediante el empleo de polimorfismos tipo RAPD.

## **OBJETIVOS:**

Establecer las condiciones de aislamiento de ADN y de PCR para encontrar la secuencia de iniciadores que permitan obtener polimorfismos tipo RAPD en el ovino Pelibuey.

Evaluar la diferenciación por RAPD de ovejas con actividad reproductiva continua y estacional.

Identificar marcadores RAPD en ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron 35 ovejas Pelibuey adultas que habían sido previamente clasificadas (Valencia *et al.*, 2010) como continuas (11 en CEPIPSA y cuatro en CEIEGT) o como estacionales (cuatro en CEPIPSA y 16 en CEIEGT). A todas las hembras se les tomó una muestra de 4 mL de sangre por venopunción yugular utilizando tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Las muestras se depositaron en microtubos estériles de 1 mL y se transportaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  hasta su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el ultracongelador del laboratorio de Biología Molecular y Biofísica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Todo el manejo de las muestras, desde su colección hasta su almacenamiento, se realizó con las condiciones de esterilidad adecuadas para evitar contaminaciones. Adicionalmente, para estandarizar la técnica de aislamiento de ADN se tomaron muestras de sangre a cuatro ovejas.

### **Aislamiento de ADN**

Para el aislamiento de ADN a partir de sangre, se trabajó con los protocolos modificados de Bailes *et al.* (2007) y CTAB (Aldrich and Cullis, 1993), y con un Kit comercial específico para ovinos (Chargeswitch©, Invitrogen). Los protocolos se encuentran en el área de anexos.

Los aislamientos fueron evaluados por medio del espectrofotómetro para medir la absorbencia UV a una longitud de onda de 260 y 280 nm ( $A_{260}$  y  $A_{280}$ ), y de esta forma poder cuantificar el rendimiento y la pureza. El rendimiento se calculó a partir de la fórmula: 1 unidad de  $A_{260} = 50\ \mu\text{g/mL}$ , mientras que la pureza se calculó a partir del cociente ADN/proteína mediante la  $R_{260/280} = A_{260}/A_{280}$ . También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas del ADN obtenido, utilizando diferentes cantidades de ADN (1, 5 y 10  $\mu\text{L}$ ). Esto con el fin de comparar y comprobar los datos obtenidos con el espectrofotómetro. Una vez que se probaron y estandarizaron los tres protocolos, se seleccionó el protocolo más simple, rápido y con el que se obtuvo un buen rendimiento de ADN para poder

trabajar un gran número de amplificaciones con un solo aislamiento. Este protocolo se utilizó para trabajar con todas las muestras.

Al ADN obtenido de todas las muestras sanguíneas se le realizó la misma evaluación que en la estandarización y posteriormente se almacenó en criotubos perfectamente identificados, a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **Iniciadores**

Se utilizaron 29 oligonucleótidos (de 10 pb de longitud en promedio) probados exitosamente en ovinos (Joshi *et al.*, 1998; Tahmoorespur *et al.*, 2003; Rezende *et al.*, 2005; Eman *et al.*, 2008), los cuales se mandaron sintetizar a Sigma Aldrich. Estos iniciadores se evaluaron utilizando el programa Oligo Analyzer (Kuulasma, 2002), para conocer su  $T_m$ , porcentaje de G-C y formación de estructuras secundarias. La secuencia y características de estos iniciadores se encuentran en anexos.

Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en una solución TE8 (anexos), a una concentración  $100\ \mu\text{M}$  y posteriormente se prepararon a una concentración 1:100 ( $1\ \mu\text{M}$ ) para cuantificarlos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y conocer la concentración real. La resuspensión se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de la cuantificación se prepararon  $50\ \mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores a una concentración  $1\ \mu\text{M}$  en varios tubos con el objeto de evitar el congelamiento y descongelamiento excesivo, posterior a esto, se almacenaron junto con los tubos de la concentración  $100\ \mu\text{M}$  a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **Condiciones de PCR**

Se revisaron las concentraciones de cada uno de los componentes del PCR, así como los programas utilizados en las investigaciones a partir de las cuales se seleccionaron los oligos y se estandarizó tanto la concentración de los componentes, como los ciclos de tiempo y temperatura para el protocolo de PCR que se utilizó.

La estandarización consistió en probar distintas temperaturas de alineamiento y tiempos de desnaturalización, así como distintos números de ciclos y diferentes concentraciones de magnesio.

Durante la estandarización se incluyeron controles negativos (sin ADN) para identificar las bandas inespecíficas y comprobar que las amplificaciones se debían a características propias del ADN y de los componentes del PCR. También se incluyó un control positivo de un Kit de Invitrogen<sup>®</sup> para verificar que las concentraciones de los componentes del PCR y el programa seleccionado permitieran la amplificación de una banda de longitud conocida. Se realizaron repeticiones de los experimentos para asegurar que los resultados fueran confiables. Se seleccionaron las concentraciones y los protocolos que permitieron una adecuada amplificación de las bandas.

Después de la estandarización, las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo lo siguiente: 40 ng de ADN (1  $\mu\text{L}$ ), 400 pM de oligo arbitrario (1  $\mu\text{L}$ ), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (2.5  $\mu\text{L}$ ), 4 mM de  $\text{MgCl}_2$  (2  $\mu\text{L}$ ), 1.0 U de *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen) (1  $\mu\text{L}$ ), Amortiguador PCR 10X al 1 % (2.5  $\mu\text{L}$ ) y agua estéril inyectable (Pisa) cbp 25  $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{L}$ ). Utilizando el siguiente programa de PCR: a) desnaturalización, 5 min a 95° C, b) alineamiento, 2 min a 35° C, c) extensión, 1 min a 72° C, d) desnaturalización, 1 min a 95° C, posteriormente, 45 ciclos incluyendo los pasos b, c y d, al final de éstos se incluyó un paso de 2 min a 35° C y una extensión final de 5 min a 72° C, cuando el programa se realizó durante la noche, al final se agregó un paso para que las muestras se mantuvieran a 4° C hasta su retiro del termociclador.

Para los controles negativos, las reacciones de PCR se prepararon de la misma forma, solo se agregó 1  $\mu\text{L}$  más de agua estéril inyectable en lugar del ADN.

Para evitar errores debidos al pipeteo excesivo al preparar demasiadas reacciones individuales, se preparó una mezcla (mix) que contenía todos los componentes de la reacción excepto ADN e iniciadores, esta mezcla se depositó en tubos Eppendorf de 0.2 mL y posteriormente se agregó el iniciador y ADN correspondiente. Una vez que el tubo contenía todos los componentes, se pipeteó el contenido para mezclar y corroborar el volumen final. La preparación de las reacciones se realizó manteniendo los tubos en hielo.

## **Electroforesis y tinción**

Para observar las bandas amplificadas, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, preparados con solución TE8, misma que se utilizó para llenar la cámara de electroforesis. En los carriles extremos de los geles se incluyó un marcador de escalera (ladder) de 1Kb plus (Invitrogen) para medir la longitud de las bandas; este marcador de escalera presenta fragmentos desde los 100 hasta los 12,000 pb. Se realizó una mezcla de 1  $\mu$ L de ladder más 1  $\mu$ L de una solución de azul de bromofenol al 0.04% con glicerol al 20%, esto con el propósito de observar la distancia de desplazamiento de las bandas en el gel al momento de la electroforesis. Una vez que se recuperaron las reacciones de PCR, se les agregó 5  $\mu$ L de la solución de azul de bromofenol-glicerol, conteniendo los tubos un volumen final de 30  $\mu$ L, el cual fue mezclado y depositado con cuidado en el resto de los carriles del gel. Finalmente, los geles se corrieron a 120 Volts y 80 mA por 2.5 horas.

En el caso de los geles para la evaluación del ADN, a los tubos se les agregó también 5  $\mu$ L de la solución de azul de bromofenol-glicerol, se mezcló y los distintos volúmenes se depositaron en los carriles. Los geles se dejaron correr únicamente por 1 hora. De igual forma, la preparación se realizó manteniendo los tubos en hielo.

Después de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) y se destiñeron con agua destilada. Los tiempos se modificaron dependiendo de la intensidad con la que se teñían, ya que se reutilizó el bromuro de etidio. Los geles se visualizaron con luz ultravioleta con ayuda de un transiluminador y se fotografiaron para su documentación y posterior análisis. La longitud de las bandas se calculó con ayuda del papel semilogarítmico tomando como referencia los fragmentos del marcador de escalera.

Se seleccionaron los iniciadores más informativos, es decir, que permitieron la amplificación de un gran número de bandas con el mayor rango de longitud posible y sin la presencia de amplificaciones en los controles negativos.

Una vez seleccionados estos oligos, se probaron con el ADN de todas las ovejas del grupo estacional y continuo para identificar las bandas que permitieran diferenciar o caracterizar a cada grupo.

## **Métodos estadísticos**

Los patrones de bandeo RAPD fueron registrados por la presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada muestra en cada locus. Los registros se combinaron posteriormente para la construcción de una matriz de datos única. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa computacional gratuito “Popgene versión 1.31” (Yeh *et al.*, 1999), incluyendo el cálculo de la frecuencia de alelos de acuerdo con Nei (1987). Este programa permitió calcular el número y porcentaje de loci polimórficos y la diversidad genética de acuerdo a la ecuación de Nei (1973) y también, calcular la distancia genética y construir el dendrograma de asociación genética.

## **RESULTADOS**

En el cuadro 1 se encuentran los resultados obtenidos de los aislamientos de ADN realizados utilizando los tres protocolos, se decidió trabajar con el protocolo modificado de Bailes *et al.* (2007), ya que con éste se obtuvo el máximo rendimiento de ADN (6 µg / 100 µL de sangre) con el menor número de pasos y soluciones (ocho y dos, respectivamente). Es importante mencionar que con este método no se utilizan solventes orgánicos, lo que representa una ventaja adicional con respecto a los otros dos protocolos. Aún cuando la  $R_{260-280}$  de 0.95 obtenida con este protocolo fue la más baja de las tres, ésta se debe al uso de una proteinasa que aumenta la concentración de proteínas, ya que solo es inactivada con calor y permanece en la extracción final.

Después de realizar el aislamiento de ADN en las muestras sanguíneas de los treinta y cinco individuos se obtuvo en promedio (máximo-mínimo), un rendimiento de ADN de 44.41 ng/µL (95.5-20 ng/µL) y una  $R_{260-280}$  de 0.83 (1.15-0.51). En la figura 3 se muestran los geles de agarosa con el ADN de todas las ovejas.

De los veintinueve iniciadores probados, ocho fueron eliminados debido a que no lograron amplificar bandas en el ADN de las ovejas del estudio. Con los 21 iniciadores que se trabajó se obtuvieron en total 95 bandas, con un promedio de 4.5 bandas por iniciador, un mínimo y máximo de 2 y 7 bandas, respectivamente, presentándose bandas con una longitud desde los 200 pb hasta los 1,500 pb. El tamaño promedio cubierto por

cada iniciador fue de 670 pb, con un mínimo de 250 pb y un máximo de 1,100 pb. En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos con cada uno de los iniciadores. Diecisiete bandas (17.9%) presentaron un patrón monomórfico, mientras que las restantes setenta y ocho bandas (82.1%) manifestaron un patrón polimórfico. Tres iniciadores en tres individuos distintos no lograron amplificar bandas, aún cuando se realizaron repeticiones.

Con los datos obtenidos después de trabajar con los iniciadores en todas las ovejas, se construyó una matriz con 3,310 datos (Figura 4), la cual se utilizó para el análisis genético.

Los resultados obtenidos con el programa Popgene 1.31 se muestran en el cuadro 3. Se encontraron 95 loci para el grupo estacional y 94 loci para el grupo continuo, esto indica que solo una banda estuvo ausente en el grupo continuo. Esta fue una banda de 200 pb obtenida con el iniciador UBC 771. No obstante esta banda también estuvo ausente en 13 ovejas (65%) del grupo estacional (Figuras 5, 6 y 7). El número y porcentaje de loci polimórficos fue de 70 y 73.68, respectivamente en el grupo estacional, mientras que en el grupo continuo fue de 71 y 74.74, respectivamente. Se encontraron 15 bandas monomórficas solo para uno de los dos grupos, ocho en las continuas y siete en las estacionales, sin embargo, el porcentaje máximo de ausencia de esta banda en el grupo contrario fue de 19.8.

El número de alelos diferentes fue de 1.747 para el grupo estacional y de 1.726 para el continuo, mientras que el número de alelos efectivos fue de 1.546 y 1.518 para los grupos continuo y estacional, respectivamente. La heterocigosis esperada (o diversidad genética,  $H_e$ ) en general fue de 0.329, mientras que en el grupo continuo fue de 0.303 y en el estacional de 0.296.

La frecuencia alélica total fue de 0.717, la encontrada para el grupo estacional de 0.737 y de 0.7 para el continuo. La identidad genética de Nei obtenida entre las ovejas continuas y estacionales fue de 0.9410 (o una distancia genética de 0.0608). El dendrograma de asociación genética sitúa a ambos grupos en la misma rama.

Adicionalmente, se realizó una comparación entre las ovejas provenientes del CEPIPSA y del CEIEGT, encontrándose 94 loci para CEPIPSA y 95 loci para CEIEGT, la misma

banda que en el grupo estacional, esto indica que la banda de 200 pb del UBC 771 solo se presentó en siete ovejas estacionales del CEIEGT. La heterocigosis esperada, el número y porcentaje de loci polimórficos fue de 0.299, 72 y 75.79, respectivamente en las ovejas del CEPIPSA, mientras que en las ovejas del CEIEGT fue de 0.284, 67 y 70.53, respectivamente. La identidad genética de Nei entre las ovejas del CEPIPSA y CEIEGT fue de 0.923.

## **DISCUSIÓN**

En un trabajo realizado en gallinas criollas (Soto *et al.*, 2002) utilizando marcadores RAPD en gallinas con alto y bajo índice de postura, se encontró que un marcador de 1,100 pb estuvo presente solo en las gallinas con bajo índice de postura, por lo cual los autores concluyen que la presencia de este marcador RAPD podría permitir identificar a las gallinas con un bajo índice de postura, o bien su ausencia podría determinar que una gallina tuviera una buena producción de huevos. Este trabajo es muy similar al aquí propuesto, ya que se evaluó la actividad reproductiva de una especie estacional, sin embargo, en el presente trabajo no fue posible identificar de forma clara algún marcador que permitiera categorizar genéticamente a las ovejas continuas de las estacionales como ocurrió con las gallinas criollas, debido a que se encontró una banda de 200 pb ausente en todas las ovejas del grupo continuo, pero desafortunadamente esta banda también estuvo ausente en el 65% de las ovejas del grupo estacional. Esto demuestra que al utilizar un método como el RAPD, por sus características, la obtención de los resultados esperados es una condición aleatoria. No obstante, esta banda podría ser utilizada en un programa de selección para aumentar la frecuencia del genotipo continuo, ya que permite identificar a un 35% de las ovejas estacionales sin necesidad de realizar el seguimiento por tres años, por otra parte si en los empadres se utilizan machos que no presenten esta banda se aumentaría la selección de individuos continuos. Las 17 bandas monomórficas encontradas podrían ser consideradas como bandas que caractericen genéticamente a la raza Pelibuey, como lo encontrado en las razas de pelo de Brasil como la Santa Inés, Rabo largo, Somalí, Morada nova y Bergamasca (Rezende



*et al.*, 2005), y en algunas razas egipcias como la Rahmani, Ossimi, Barki, Sahidi y Sohagi (Eman *et al.*, 2008), entre otras. No obstante, es indispensable probar estas bandas con otras razas y especies, principalmente rumiantes, ya que también podrían ser bandas características de la especie ovina (Kantanen *et al.*, 1995; Appa Rao *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1998; Devrim *et al.*, 2007b).

Nei (1987) describe que la proporción de loci polimórficos no es una buena medición de la variación genética y que una medición más apropiada de esta característica es la heterocigosidad promedio o diversidad genética (H). Los valores de diversidad genética de este trabajo concuerdan con lo reportado en las distintas razas de pelo de Brasil, para individuos localizados en distintas regiones (Rezende *et al.*, 2005), principalmente con la raza de pelo Santa Inés.

Aún cuando la  $H_e$  y el porcentaje de loci polimórficos más bajos encontrados fueron en las ovejas del CEIEGT, los datos obtenidos en la heterocigosidad esperada y en el distanciamiento genético indican que las poblaciones de ovejas Pelibuey aquí estudiadas son homogéneas, que presentan un origen común y han permanecido sin grandes cambios. Este resultado era esperado, dado que desde la introducción de la raza Pelibuey al país no ha habido mezcla con otros sementales nuevos de la misma raza. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado en ovejas de la universidad de Zulu (Kunene *et al.*, 2009), en donde la más alta similaridad genética encontrada fue de 94.83%, parecido al 94.15% de este estudio.

El índice de información de Shannon que provee una relativa estimación de la variabilidad, fue consistente con los valores de heterocigosidad encontrados en estas ovejas Pelibuey y concuerda con lo reportado por Tariq *et al.* (2012) para razas de ovejas de Pakistán.

La alta asociación genética encontrada entre las ovejas de los dos rebaños permite establecer que de llegarse a identificar algún marcador que se encuentre únicamente en alguno de los dos grupos de ovejas, tendría altas probabilidades de controlar la actividad reproductiva estacional en estas ovejas, esto debido a la rigurosa categorización fenotípica que se ha realizado, ya que se ha observado que en poblaciones de ovejas en

Zulu (Kunene *et al.*, 2009), los datos fenotípicos y genéticos obtenidos a partir de análisis con RAPD pueden ser asociados con confiabilidad.

Los resultados genéticos obtenidos con el método RAPD demuestran que esta es una herramienta importante y útil en el análisis genético de la oveja Pelibuey principalmente en asociación y diversidad genética, como lo reportado en otras razas (Gong *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Rezende *et al.*, 2005; Devrim *et al.*, 2007a; Eman *et al.*, 2008; Kunene *et al.*, 2009), sin embargo, para esto es necesario realizar un estudio con un mayor número de individuos provenientes de las distintas regiones del país. Por otra parte, el método RAPD se ha usado muy poco en la identificación de individuos con características productivas de importancia económica, por esto es importante mencionar que los marcadores RAPD resultan ser un método útil, que con el auxilio de otras herramientas alternas pueden permitir obtener o generar elementos moleculares de gran valor para la identificación de características productivas (Soto *et al.*, 2002).

El número de bandas que se obtuvieron y el porcentaje de estas que fueron polimórficas, confirman que el método RAPD brinda una gran cantidad de información genética, misma que de forma confiable permite realizar un análisis genético de la variabilidad presente en los individuos perteneciente a una misma raza o bien, de aquellas que tienen un linaje en común, tal como lo encontrado por Elmaci *et al.* (2007), en donde de 82 loci obtenidos, el 100% fueron polimórficos y permitió el establecimiento de la diversidad genética en ovejas de Turquía. De igual forma, la elección de iniciadores RAPD previamente probados con buenos resultados facilita la obtención de un número adecuado de bandas por iniciador como en el caso del análisis genético realizado con marcadores RAPD en ovejas de Egipto (Eman *et al.*, 2008), en el cual con cinco iniciadores obtuvieron 8 bandas en promedio con un rango de 5 a 11 bandas, datos parecidos a los encontrados en este trabajo.

Algunos de los iniciadores utilizados producen patrones de bandeo altamente polimórficos, pero otros producen menos productos polimórficos, las variaciones en los patrones de bandeo encontradas en este trabajo son similares a lo reportado por Appa Rao *et al.* (1996), Kumar *et al.* (2004) y Tariq *et al.* (2012).

De los tres protocolos de extracción de ADN probados en este estudio, el que mejor resultados obtuvo fue un protocolo diseñado para el aislamiento de ADN a partir de sangre de aves, semen o plumas (Bailes *et al.*, 2007). Como los autores lo mencionan, el método es simple, barato y seguro ya que permite la obtención de una gran cantidad de ADN, desde 1.6 hasta 147  $\mu\text{g}$  dependiendo la cantidad de sangre que se utilice. Este protocolo se diseñó para trabajar con una cantidad mínima de sangre, como la cantidad que queda en un mondadientes al ser sumergido en la muestra y es posible realizar el proceso en placas de 96 pozos, con el fin de trabajar un gran número de muestras al mismo tiempo. Los resultados obtenidos en los aislamientos de ADN de este trabajo (12  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  de sangre ovina) son superiores a los reportados por los autores a partir de sangre de bovino (5  $\mu\text{g}/200\text{ mL}$  de sangre). No obstante, confirma que con ligeras modificaciones, este método puede utilizar sangre completa de mamíferos, es este caso ovinos, para el aislamiento de una gran cantidad de ADN útil para la genotipificación por PCR. Una de las principales ventajas de este protocolo es que no utiliza solventes orgánicos para el proceso de extracción, esto es de importancia debido a que en el método RAPD se ha sugerido que las sustancias contaminantes que precipitan junto al ADN en el etanol son una de las primeras causas de la falta de reproductibilidad en los resultados, debido a que estos contaminantes pueden afectar la inserción efectiva del iniciador (Micheli *et al.*, 1994).

## **CONCLUSIONES**

Con los iniciadores RAPD utilizados en el presente estudio no se encontró algún marcador que permitiera diferenciar genéticamente a las ovejas Pelibuey con actividad reproductiva estacional de las continuas. Sin embargo, el método es útil para realizar estudios de asociación genética en esta raza.

Se han establecido las condiciones del método RAPD para su uso en la oveja Pelibuey.

## LITERATURA CITADA

- Aldrich, J. and Cullis, C. (1993). RAPD analysis in flax: Optimization of yield and reproducibility using klen *Taq* 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11 (2), 128-141.
- Ali, B.A.; Ahmed, M.M; Bahie El-Deen, M. and Shalan, H.M. (2002). Genetic variability in the 17<sup>th</sup> generation of Japanese quail selected for high eggs and meat production. *Egyptian Poultry Science Journal*, 22, 59-71.
- Almeida, O.F.X. and Lincoln, G.A. (1984). Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. *Biology of Reproduction*, 30, 143-58.
- Alves, B.C.A.; Unanian, M.M.; Silva, E.; Oliveira, M. and Moreira-Filho, C.A. (2005). Use of RAPD markers for identifying Nelore bulls with early reproductive maturation onset. *Animal Reproduction Science*, 85, 183–191.
- Appa Rao, K.; Bhat, K. and Totey, S. (1996). Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 13, 135-138.
- Arredondo, R. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: Un impacto reciente en la biología molecular. *Boletín de Educación Bioquímica*, 12, 3-14.
- Arroyo, L.J. (2006). Actividad ovulatoria anual en ovejas Pelibuey y Suffolk en el altiplano mexicano (Tesis de Doctorado). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arroyo, L.J.; Gallegos-Sánchez, J.; Villa, G.A. y Valencia, M.J. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. *Interciencia*, 31, 8-15.
- Bailes, S.M.; Devers, J.J.; Kirby, J.D. and Rhoads, D.D. (2007). An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Science*, 86, 102–106.
- Barrett P, *et al.*, (1997). Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mella melatonin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1356, 299–307.
- Bittman, E.L.; Karsch, F.I. and Hopkins, J.W. (1983). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 113, 329-36.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B. and Gresshoff, P. (1991a). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primer. *Biotechnology*, 9, 553-557.

- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B. and Gresshoff, P. (1991b). DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 294-307.
- Chu, M.X.; Cheng, D.X.; Liu, W.Z.; Fang, L. and Ye, S.C. (2006). Association between melatonin receptor 1A gene and expression of reproductive seasonality in sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19, 1079-1084.
- Cruz, L.C.; Fernández-Baca, S.; Álvarez, L.J. y Pérez, R.H. (1994). Variaciones estacionales en la presentación de la ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria de ovejas Tabasco en el trópico húmedo. *Veterinaria México*, 25, 23-27.
- Cushwa, W. and Medrano, J. (1996). Applications of the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Animal Biotechnology*, 7, 11-31.
- Cushwa, W.; Dodds, K.; Crawford, A. and Medrano, J. (1996). Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. *Mammalian Genome*, 7, 580-585.
- Devrim, A.; Kaya, N.; Guven, A. and Kocamis, H. (2007a). A study of genomic polymorphism and diversity in sheep breeds in northeastern Anatolia. *Small Ruminant Research*, 73, 291-295.
- Devrim, A.; Kaya, N.; Kocer, B. and Yildiz, M. (2007b). Determination of species specific genetic markers in farm animals by using Random Amplified Polymorphic DNA fingerprints. *Indian Veterinary Journal*, 84, 903-907.
- Dodgson, J.B.; Cheng, H. and Okimoto, R. (1997). DNA marker technology: A revolution in animal genetics. *Poultry Science*, 76, 1108-1114.
- Dyrmundsson, O.R. and Adalsteinsson, S. (1980). Coat-color gene suppresses sexual activity in Icelandic sheep. *Journal of Heredity*, 71, 363-364.
- Elmaci, C.; Oner, Y.; Ozis, S. and Tuncel, E. (2007). RAPD Analysis of DNA polymorphism in Turkish sheep breeds. *Biochemical Genetics*, 45, 491-496.
- Eman, R.; Othman, E.; Soheir, M. and Mohamed, A. (2008). Genetic variation between some Egyptian sheep breeds using RAPD-PCR. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2 (2), 46-52.
- Enrech, N.X.D. (2000). Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana*, 51, 197-206.
- Erlich, H. and Arnheim, N. (1992). Genetic analysis using the Polymerase Chain Reaction. *Annual Review of Genetics*, 26, 479-506
- Gong, Y.; Li, X.; Liu, Z. and Li, J. (2002). Studies of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of main indigenous sheep breeds in China. *Yi Chuan*, 24 (4), 423-426.

- González, R.A.; Murphy, B.D. and Foot, W.C. (1992). Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research*, 8, 225-232.
- Hafez, E.S. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *Journal of Agricultural Science*, 42,189-265.
- Hanocq, E.; Bodyn, L.; Thimonier, J.; Teyssier, J.; Malpoux, B. and Chemineau, P. (1999). Genetic parameters of spontaneous spring ovulatory activity in Mérinos d'Arles sheep. *Genetics Selection Evolution*, 31, 77-90.
- Hanrahan, J.P. (1987). Genetic variation in seasonal reproduction in sheep, in: 38<sup>th</sup> European Association of Animal Production Annu. Meeting, Lisbon, Portugal, 28 September-1 October, 14 p.
- Hanrahan, J.P. and Quirke, J.F. (1986). Breeding season and multiple births in small ruminants. Proceedings of 3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production pp. 11–30.
- Heredia, A.M.; Velásquez, M.A.; Quintal, F.J.; Mex, R.J. y Aragón, G.A. (1991). Efecto de dos fuentes de alimentación sobre la estacionalidad reproductiva de la oveja Pelibuey. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Ciudad Victoria (Tamaulipas) México, 96.
- Hernández X, *et al.*, (2005). Relation between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Ile-de-France ewes. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 151-162.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and Cornell University [homepage in the internet]. Cornell, USA [Update 2007 July 20], cited 2011 May 26. Available from [http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular\\_Markers\\_Volume\\_2\\_es/PDF/II.Gen%C3%A9tica%20de%20poblaciones.pdf](http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular_Markers_Volume_2_es/PDF/II.Gen%C3%A9tica%20de%20poblaciones.pdf)
- Joshi C, *et al.*, (1998). RAPD analysis PCR using arbitrary primers in different animal species. *Indian Veterinary Journal*, 75, 1029-1031.
- Kantannen, J.; Vilkki, J.; Elo, K. and Maki-Tanila, A. (1995). Random Amplified Polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. *Animal Genetics*, 26, 315-320.
- Karsch, F.J.; Bittman, E.L.; Foster, D.L.; Goodman, R.L; Legan, S.J. and Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40, 185-231.
- Karsh, F.J.; Robinson, J.E.; Woodfill, C.J. and Brown, M.B. (1989). Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biology of Reproduction*, 41(6), 1034-46.

Khalil, M.H.; Motawei, M.I.; Al-Saef, A.M.; Al-Sobayil, K.A. and El-Zarei, M.F. (2008). RAPD markers linked to litter, lactation and growth traits in rabbits, in: 9th World rabbit congress, June 10-13, Verona, Italia, 143-147.

Kumar, K.; Kumar, P.; Kumar, S.; Bhattacharya, T.; Bhushan, B. and Ahlawat, S. (2004). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting of Indian sheep breeds. *Indian Journal of Animal Sciences*, 74 (8), 860-863.

Kunene, N.; Bezuidenhout, C. and Nsahlai, I. (2009). Genetic and phenotypic diversity in Zulu sheep populations: Implications for exploitation and conservation. *Small Ruminant Research*, 84, 100-107.

Legan, S.I. and Karsch. F.J. (1983). Importance of retinal photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in the ewe. *Biology of Reproduction*, 29, 316-25.

Lincoln, G.A.; Libre, B.A. and Merriam, G.R. (1989). Long-term reproductive cycles in rams after pinealectomy or superior cervical ganglionectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, 687-704.

Malpaux, B.; Vigué, C.; Skinner, D.C.; Thiéry, J.C.; Pelletier, J. and Chemineau, P. (1996) Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42, 109-117.

Marle-Köster, E. and Nel, L. (2003). Genetic markers and their application in livestock breeding in South Africa: A review. *South African Journal of Animal Science*, 33, 1-10.

Martínez, R.R.D.; Zarco, Q.L.; Cruz, L.C. y Rubio, G.I. (1995). La estacionalidad de la actividad ovárica en la oveja Pelibuey es independiente de variaciones en el peso o condición corporal de los animales. Memorias del VII Congreso Nacional de Producción Ovina; Chapingo (Edo. de Méx.) México DF: Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinocultura, AC, 131-134.

Mateescu, R.G; Lunsford, A.K. and Thonney, M.L. (2009). Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *Journal of Animal Science*, 87, 2485-2488.

Messer L.A, *et al.*, (1997). Mapping of the melatonin receptor 1a (MTRN1A) gene in pigs, sheep and cattle. *Mammalian Genome*, 8, 368–370.

Meunier, J.R. and Grimont, P. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 144, 373-379.

Micheli, M.R.; Bova, R.; Pascale, E. and D'Ambrosio, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*, 22, 1921-1922.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 3321-3323.

- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Notter, D.R. (1986). Manipulation of the breeding season by genetic means, in: Burfening P.J., Gabina D. (Eds.), *US-Spain Seminar on Sheep Breeding*, Zaragoza, Spain, 10-15 November, 22.
- Notter, D.R.; Al-Shorepy, S.A.; Vincent, J.N.; and McQuown, E.C. (1998). Selection to improve fertility in fall lambing, *Proceedings of 6th World congress on genetics applied to livestock production*, 27, 43-46.
- Notter, D.R.; Cockett, N.E. and Hadfield. T.S. (2003). Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *Journal of Animal Science*, 81, 912-917.
- Oligo Analyzer 1.1.2© from Teemu Kuulasma (2002).
- Pelletier, J.; Bodyn, L.; Hanocq, E.; Malpoux, B.; Teyssier, J. and Chemineau, P. (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel 1a receptor in the ewe. *Biology of Reproduction*, 62, 1096-1101.
- Rezende S, *et al.*, (2005). Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (9), 887-893.
- Ricordeau, G. (1982). Selection for reduced seasonality and post-partum anestrus, in: *Proceedings of 2nd World congress on genetics applied to livestock production*, Madrid, Spain, 338-347.
- Ríos, E.; Mejía-Ruiz, H. y Álvarez-Castañeda, S. (2009). Marcadores moleculares: una Revolución en la Zoología. *Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 60 (3), 5-13.
- Robinson, J.E. and Karsch, F.L. (1988). Timing the breeding season of the ewe: what is the role of day length?. *Reproduction Nutrition Development*, 28 (2B), 365 -74.
- Smith, J.F.; Johnson, D.L. and Reid, T.C. (1992). Genetic parameters and performance of flocks selected for advanced lambing date. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. pp. 50–2.
- Soto, H.I.; Zavala, P.G.; Cano, C.H. y López, M.J. (2002). Análisis de dos poblaciones de gallinas criollas (*Gallus domesticus*) utilizando RAPD's como marcadores moleculares. *Técnica Pecuaria México*, 40 (3), 275-283.
- Tahmoorespur, M.; Naissiry, M. and Mohammady, A. (2003). The use of 17 RAPD primers in some of Iranian sheep breeds. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 144.
- Tariq M, *et al.*, (2012). Characterization of four indigenous sheep breeds of Balochistan, Pakistan by random amplified polymorphic DNAs. *African Journal of Biotechnology*, 11(10), 2581-2586.



Tchamitchian, L. (1988). Choix du moment et du rythme de reproduction, Possibilités de la génétique, in: Proceedings of 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding, Paris, 19-23 June, Inra Publ., Paris, 529-546.

Trujillo, Q.J. (2005). Caracterización de los eventos reproductivos en ovejas Pelibuey seleccionadas para ciclar de manera continua. Tesis de Maestría. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.

Valencia, M.J. y Arroyo, L.J. (2005). ¿Existe actividad reproductiva anual continua en la oveja pelibuey?. Memorias del Curso Internacional Fisiología de la Reproducción en Rumiantes; Montecillos, Texcoco (Edo. de Mex) México: Colegio de postgraduados, 106-116.

Valencia, M.J.; Berruecos, V.J.M.; Zarco, Q.L.; Pérez, R.H. y Roldán, R.A. (2010). Métodos de selección de ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua. XXXIV Congreso Nacional de Buiatría. Monterrey, N.L. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. 220.

Valencia, M.J.; Porras, A.A.; Mejía, V.O.; Berruecos, J.M. y Zarco, Q.L. (2002). Oestrus activity of Pelibuey ewes (dams and daughters) selected for continuous breeding. In: XXII World Buiatrics Congress, Hannover, Germany. 18-23 august, p. 196.

Valencia, M.J.; Porras, A.A.; Trujillo, Q.J.; Berruecos, J.M. y Zarco, Q.L. (2003). Actividad ovárica de ovejas Pelibuey seleccionadas o no para ciclar en forma continua en ausencia del macho. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatría; Villahermosa (Tabasco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2003:265.

Valencia, Z.M.; Heredia, A.M. y González, P. E. (1981). Estacionalidad reproductiva en hembras Pelibuey. Memorias de la VIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal; Sto. Domingo (República Dominicana):137.

Waugh, R. and Powel, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech*, 10, 186-191.

Weaver, D.R.; Liu, C. and Reppert, S.M. (1996). Nature's knock-out: The Mel 1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Molecular Endocrinology*, 10, 1478-1487.

Wei, R.; Dentine, M.R. and Bitgood, J.J. (1997). Random amplified polymorphic DNA markers in crosses between inbred lines of Rhode Island red and White Leghorn chickens. *Animal Genetics*, 28, 291-294.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7218.

Williams, J.; Kubelik, A.; Livak, K.; Rafalsky, J. and Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

Wright, S. (1980). Genic and organismic selection. *Evolution*, 34, 825-843.

Yeh, F.; Boyle, T.; Rongcai, Y.; Ye, Z. and Xian, J. (1999). POPGENE, Version 1.31. A Microsoft Window Based Free Ware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton. Canada.

## CUADROS

**Cuadro 1. Comparación entre los protocolos de aislamiento de ADN**

Protocolo	Pasos	Soluciones usadas	Rendimiento de ADN ( $\mu\text{g}$ ) por 100 $\mu\text{L}$ de sangre	$R_{260-280}$
CTAB-Fenol	21	7	1.6	1.8
Bailes <i>et al.</i>	8	2	6	0.95
Kit Chargeswitch©	16	6	1.12	1.2

**Cuadro 2. Resultados obtenidos con los iniciadores RAPD utilizados**

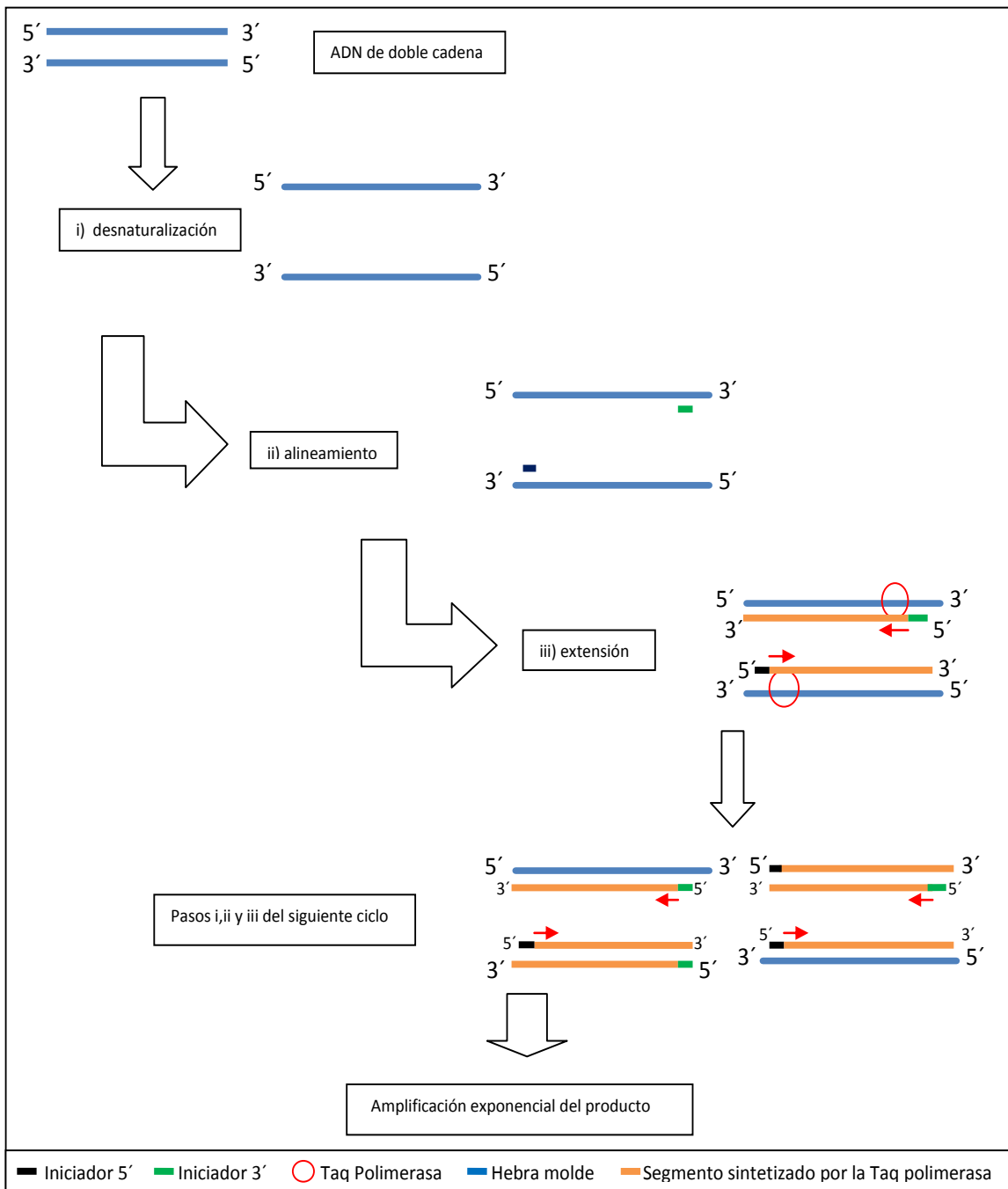
Nombre	Núm de bandas	Longitud mín (pb)	Longitud máx (pb)	Rango (pb)
10-A	5	296	1,018	722
11-B	3	260	600	340
20-B	6	250	1,350	1,100
1-K	5	400	880	480
3-N	4	350	1,070	720
5-N	3	380	700	320
11-N	2	770	1,325	555
15-N	7	230	880	650
19-N	5	460	1,350	890
20-N	4	300	1,300	1,000
10-S	2	550	800	250
18-S	5	260	1,200	940
11-AB	5	360	950	590
UBC 751	6	300	1,100	800
UBC 771	7	200	1,050	850
UBC 773	5	230	740	510
UBC 775	4	235	700	465
UBC 787	4	430	1,500	1,070
Moh 4	4	480	1,000	520
Moh 13	5	320	1,075	755
Moh 21	4	530	1,075	545
Promedio	4.5	361	1,032	670
Mínimo	2	200	600	250
Máximo	7	770	1,300	1,100

**Cuadro 3. Resultados de la frecuencia alélica y polimórfica en general, en las ovejas de los grupos continua, estacional, CEPIPSA y CEIEGT**

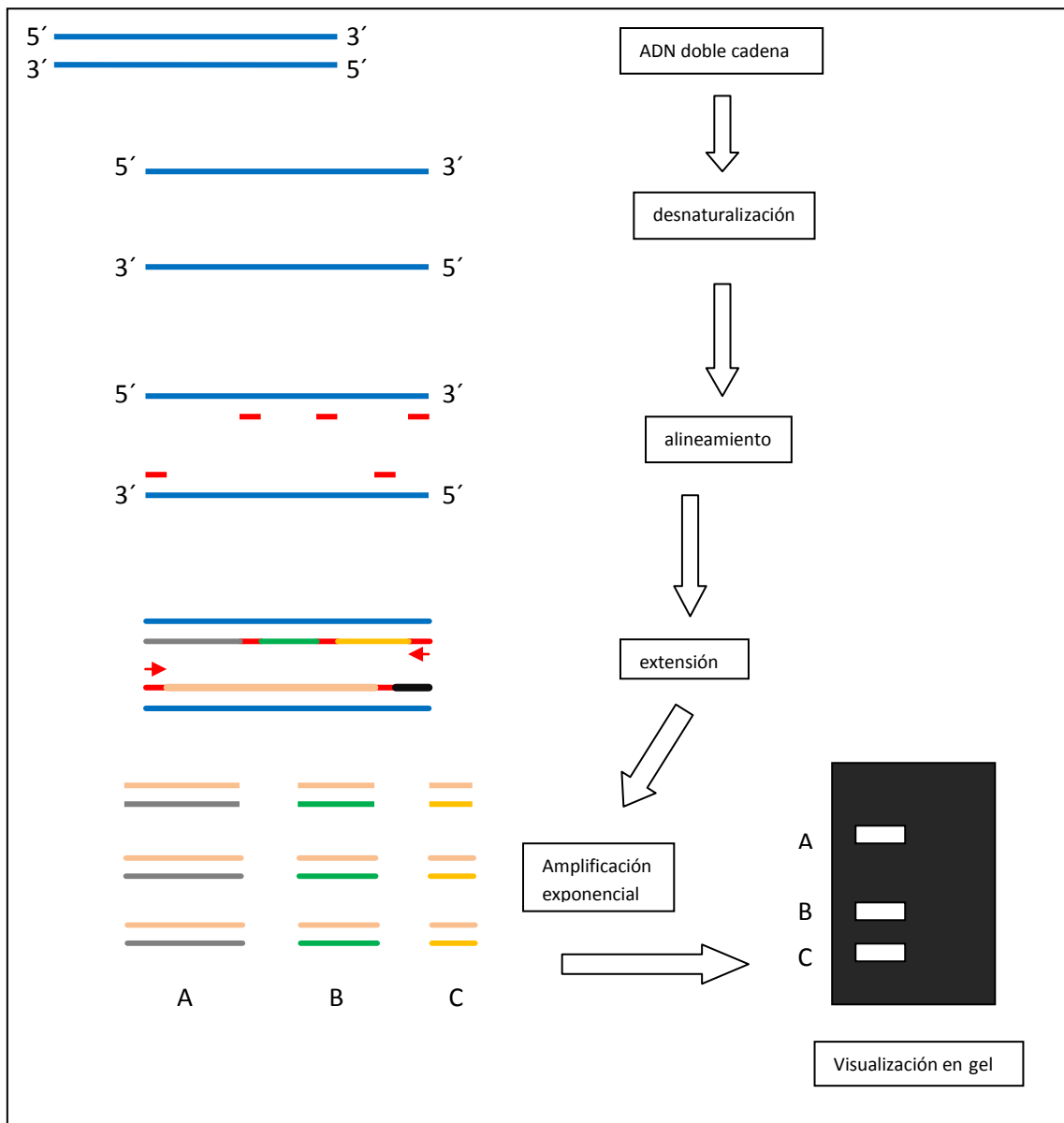
<b>Categoría</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>He</b>	<b>NL</b>	<b>NLP</b>	<b>%LP</b>	<b>FA</b>	<b>p</b>	<b>q</b>
<b>Continua</b>	15										
Promedio		1.726	1.546	0.439	0.303	94	70	73.68	0.700	0.548	0.452
ee		0.048	0.041	0.029	0.021				0.027	0.032	0.032
<b>Estacional</b>	20										
Promedio		1.747	1.518	0.434	0.296	95	71	74.74	0.731	0.583	0.417
ee		0.045	0.038	0.028	0.020				0.027	0.031	0.031
<b>CEPIPSA</b>	15										
Promedio		1.747	1.531	0.437	0.299	94	72	75.79	0.676	0.527	0.473
ee		0.047	0.039	0.028	0.020				0.029	0.032	0.032
<b>CEIEGT</b>	20										
Promedio		1.705	1.501	0.414	0.284	95	67	70.53	0.748	0.606	0.394
ee		0.047	0.039	0.029	0.021				0.026	0.032	0.032
<b>Total</b>	35										
Promedio		1.821	1.580	0.481	0.329	95	78	82.11	0.717	0.553	0.447
ee		0.040	0.036	0.025	0.018				0.025	0.029	0.029

Na: Número de alelos diferentes  
 Ne: Número de alelos efectivos  
 I: Índice de información de Shannon  
 He: Heterocigosis esperada  
 NL: Número de loci  
 NLP: Número de loci polimórficos  
 %LP: Porcentaje de loci polimórficos  
 FA: Frecuencia alélica

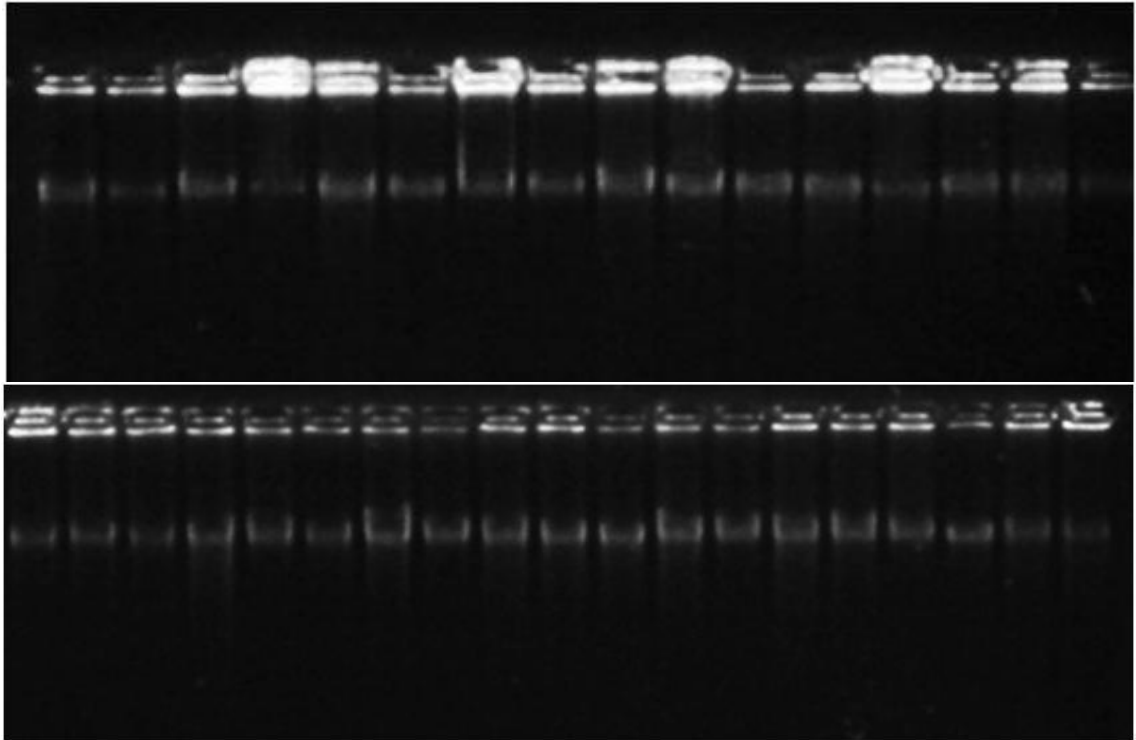
## FIGURAS



*Figura 1. Representación de cada una de las etapas del PCR, para la amplificación de un segmento específico de ADN mediante el uso de iniciadores flanqueadores de la región 5' y 3'.*



*Figura 2. Representación de las variaciones del PCR en el método de RAPD. En el RAPD se utiliza un solo iniciador de corta longitud y secuencia arbitraria que debe alinear con su secuencia complementaria en ambas cadenas de ADN en una distancia no mayor a 2,500 pb para que un fragmento sea amplificado. Los productos pueden visualizarse en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para el análisis de los polimorfismos obtenidos. Para el ejemplo de la figura, debido a los distintos sitios de alineamiento del iniciador en ambas cadenas, se obtienen tres fragmentos de doble cadena de diferente longitud.*



*Figura 3. Geles de agarosa con la banda de ADN de las extracciones realizadas a cada una de las muestras de sangre de las treinta y cinco ovejas.*

/\* Diploid RAPD OVINO PELIBUEY ESTACIONALIDAD Data Set \*/

Number of populations = 2

Number of loci = 95

Locus name :

10A-1 10A-2 10A-3 10A-4 10A-5

11B-1 11B-2 11B-3

20B-1 20B-2 20B-3 20B-4 20B-5 20B-6

1K-1 1K-2 1K-3 1K-4 1K-5

3N-1 3N-2 3N-3 3N-4

5N-1 5N-2 5N-3

11N-1 11N-2

15N-1 15N-2 15N-3 15N-4 15N-5 15N-6 15N-7

19N-1 19N-2 19N-3 19N-4 19N-5

20N-1 20N-2 20N-3 20N-4

10S-1 10S-2

18S-1 18S-2 18S-3 18S-4 18S-5

11AB-1 11AB-2 11AB-3 11AB-4 11AB-5

UBC751-1 UBC751-2 UBC751-3 UBC751-4 UBC751-5 UBC751-6

UBC771-1 UBC771-2 UBC771-3 UBC771-4 UBC771-5 UBC771-6 UBC771-7

UBC773-1 UBC773-2 UBC773-3 UBC773-4 UBC773-5

UBC775-1 UBC775-2 UBC775-3 UBC775-4

UBC787-1 UBC787-2 UBC787-3 UBC787-4

Moh4-1 Moh4-2 Moh4-3 Moh4-4

Moh13-1 Moh13-2 Moh13-3 Moh13-4 Moh13-5

Moh21-1 Moh21-2 Moh21-3 Moh21-4

name = CONTINUA

fis = 0.0

```
11110 010 011111 10101 0111 010 01 1101000 00011 1001 01 00101 00010 011000 0001110 00011 1111 0011 0011 11111 1111
00110 010 01010 0111 010 01 1100000 11111 1001 01 11111 00010 001100 1111000 10011 1110 0010 0011 11100 1110
00110 010 111100 1111 011 01 1101110 10110 1001 11 00111 01111 011000 1011010 10011 1110 0010 0010 11111 1111
11110 110 011100 00110 1111 111 01 1111101 10110 1001 11 11111 11111 111111 1111110 11111 1111 1111 1011 11100 1110
11111 010 011100 00110 1111 011 01 1111110 10111 1101 01 00011 01111 001111 1011100 11111 1111 0011 0001 11101 1110
00010 010 000100 00010 1111 011 01 1110110 10010 1111 01 01011 01101 001111 1111110 11111 1111 0011 0111 11100 1110
11111 011 011110 00110 1111 011 01 1111111 00011 1101 01 00011 01111 001111 0011000 11111 1111 0011 0011 11110 1111
00010 010 110110 11001 1111 011 11 1111111 10111 1111 11 11111 11111 111111 1001100 11011 1111 0011 1101 11111 1111
11111 010 111110 10110 1111 111 11 1111111 11111 1001 11 00101 11111 111110 1011010 01001 1111 1011 1101 11111 1111
11110 010 011100 00011 1111 011 01 1101110 10111 1001 11 00001 01110 001110 1111110 10011 1111 0011 0011 11100 1111
11111 010 011101 11101 1111 011 11 1111111 11111 1111 11 00111 11111 011100 1111100 10111 1111 1111 1101 11110 0111
11111 010 011101 10110 1111 011 11 1111000 11111 1101 11 01111 11111 111111 1111110 10111 1111 1111 1110 11111 0011
11111 010 111110 10110 1111 011 01 1110001 11111 1111 11 11011 00111 111111 1011110 11111 1111 0011 1110 11110 1010
11110 110 010100 00001 1111 111 01 1111110 11111 1011 11 01011 01110 001111 1111110 11111 1110 0011 1110 11110 0011
00011 110 010100 10011 1111 011 01 1111110 11110 1001 11 11011 01111 001110 1011110 11111 1110 0010 1111 11000 1111
```

name = ESTACIONAL

fis = 0.0

```
00011 010 011110 00110 1111 011 01 1101001 10011 1001 10 00011 01110 001110 1011000 11011 1110 0010 01101 0011
11111 110 011100 10110 1111 011 01 1100011 10011 1001 11 00011 01111 001111 1011000 01011 1110 0010 0001 11111 0111
11111 010 010100 10110 1111 011 01 1110001 11110 1111 01 11111 01111 011111 1011100 11111 1110 1111 0001 11111 0011
11111 010 000100 10110 1111 011 01 1111111 11110 1001 11 11111 11110 111111 1111010 11111 1111 0001 11110 1111
11111 010 010101 11100 1111 011 01 1111111 11110 1111 11 00011 11110 111111 1111111 11111 1111 1011 0100 11111 0011
10011 110 010100 10010 1111 011 01 1111111 10111 1111 11 10111 11110 111111 1011110 11111 1111 0011 0101 11111 0011
11111 110 000100 00110 1111 011 11 0111111 11110 1111 11 00111 11101 111111 1111110 11111 1111 1111 1101 11111 1111
11111 010 011100 11111 1111 011 11 1111011 11111 1101 11 00011 11110 111111 1111110 11111 0111 1111 0010 11110 1111
11111 110 010100 11001 0111 011 01 1110011 11110 1101 11 00011 01111 111111 1011110 11111 1110 0010 1100 11110 0011
00010 111 110100 10101 0111 010 01 1000001 00111 1001 11 00011 00111 001100 1011010 11111 0110 0010 1100 11111 0010
00010 111 111110 10111 0111 010 01 1000001 10110 1101 11 00011 11101 011110 1111011 00011 1110 0010 0001 11111 0010
11111 010 110100 11011 1111 011 01 1111001 11111 1101 11 11011 01111 111111 1111111 11111 1110 1111 1100 10110 1011
11111 110 110100 11001 1111 011 11 1111101 11111 1001 11 11011 01101 111111 1011110 11111 1111 1011 1001 10100 1011
11111 110 110100 11111 1111 011 11 1111001 11110 1101 11 11011 01111 111111 1011000 11111 1111 1111 0101 10100 0010
11111 010 010100 11001 1111 011 01 1111001 11110 1001 11 01111 01111 111111 1011000 11111 1111 0011 0101 11110 0010
11110 110 010111 11111 1111 011 01 1111001 11110 1111 11 11111 01111 111111 1101011 11111 1111 0011 1110 11110 0011
11111 110 011101 11101 1111 011 01 1110000 11110 1001 11 11111 10101 111110 1011010 10111 1110 1111 0001 11110 0111
10111 110 010100 11101 1111 111 01 1111001 10110 1111 11 01111 11101 111111 1111111 11111 1110 0111 0110 11110 1111
11110 011 110100 10011 1111 111 11 1111001 10110 1111 11 01111 11101 111111 1111111 11111 1110 1011 1110 11110 0011
00010 010 110100 11101 1111 111 11 1111101 11110 1111 11 10111 01111 111111 1011111 11111 1111 1011 1110 11110 0010
```

Figura 4. Matriz de datos generada a partir de los 21 iniciadores en las 35 ovejas Pelibuey.



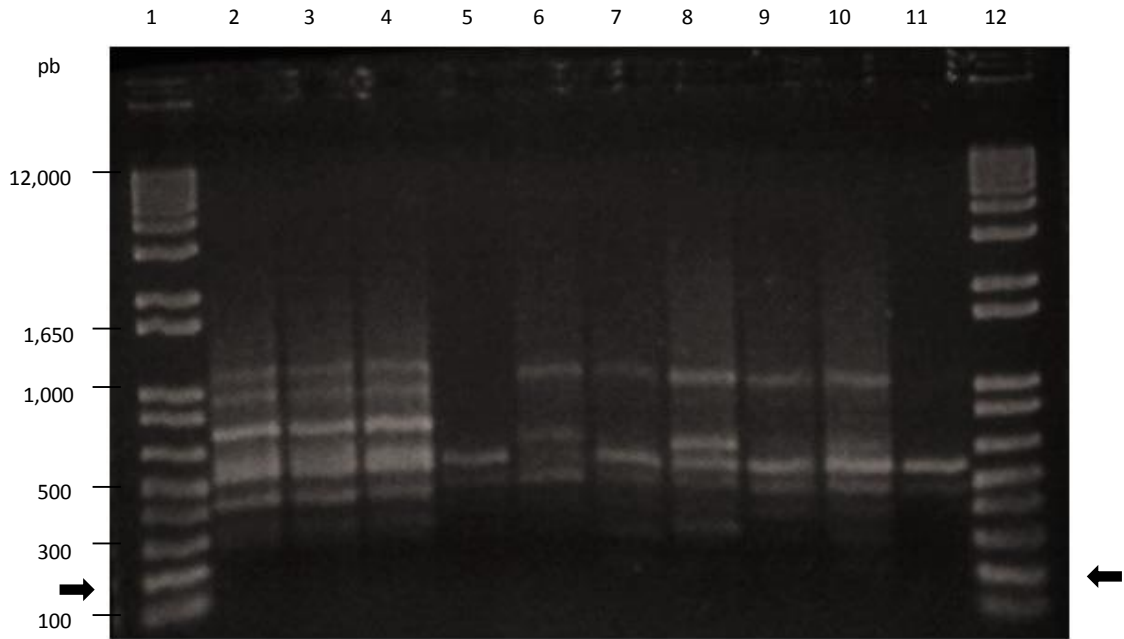


Figura 5. Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo continuo. Carriles 1 y 12: marcador de escalera; carriles 5-11: evaluaciones individuales de las ovejas del grupo continuo con el iniciador UBC 771 (→ ← 200 pb); Carriles 2-4: evaluaciones individuales de las ovejas del grupo estacional con el iniciador UBC 751.

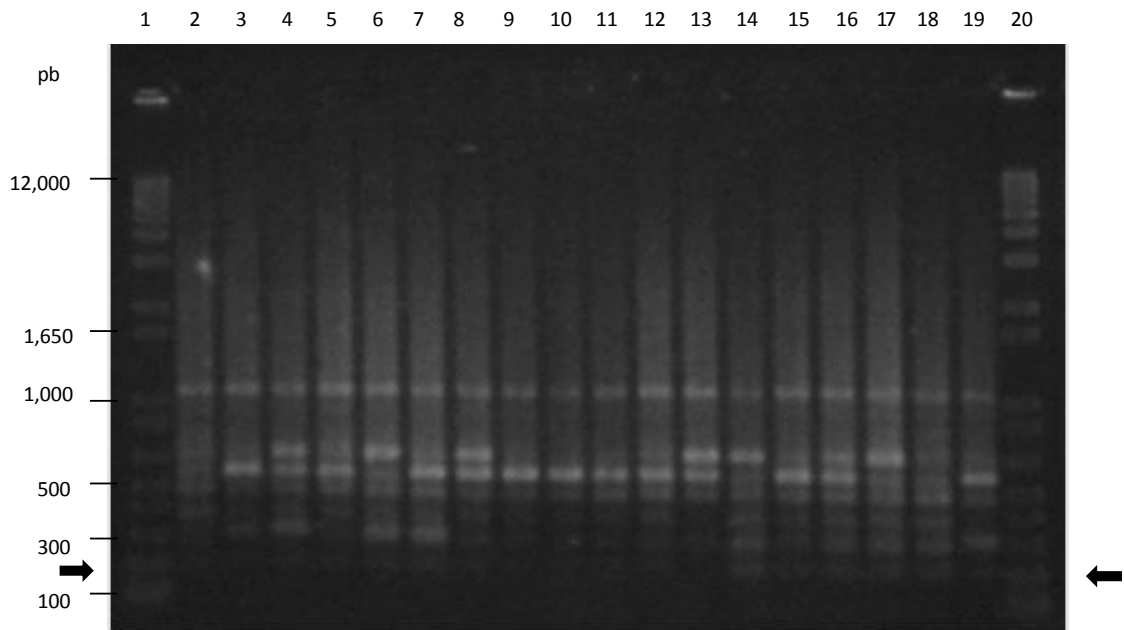
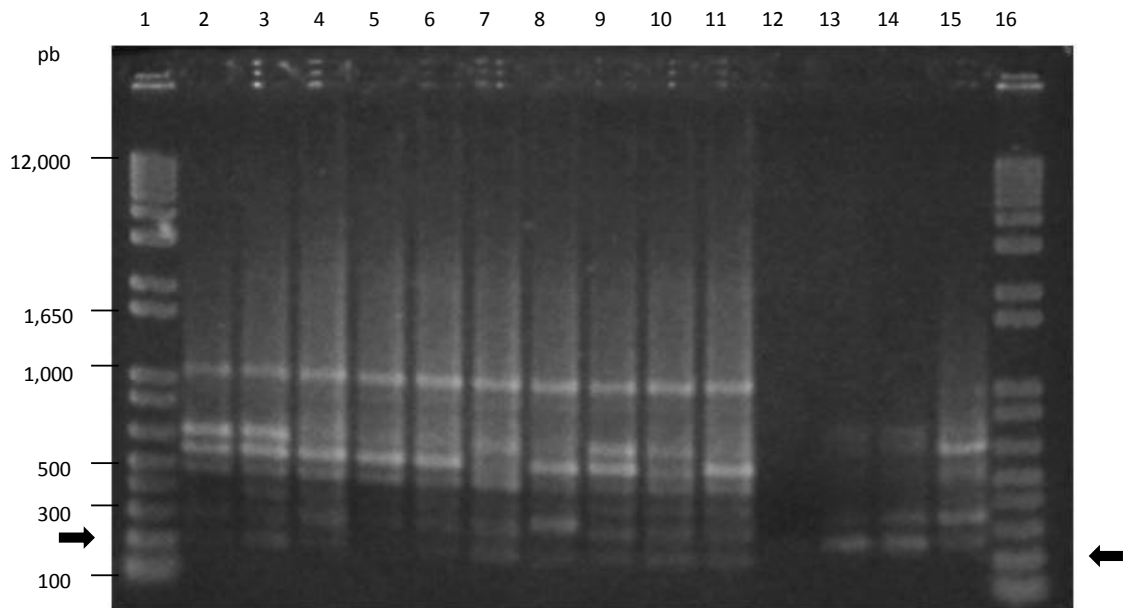


Figura 6. Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo continuo y estacional. Carriles 1 y 20: marcador de escalera; carriles 2-9: evaluaciones individuales del resto de las ovejas del grupo continuo con el iniciador UBC 771; Carriles 10-19: evaluaciones individuales de las ovejas del grupo estacional con el iniciador UBC 771 (→ ← 200 pb).



*Figura 7. Perfiles electroforéticos generados con el iniciador UBC 771 en ovejas Pelibuey del grupo estacional. Carriles 1 y 16: marcador de escalera; carriles 2-11: evaluaciones individuales del resto de las ovejas del grupo estacional con el iniciador UBC 771 (→ ← 200 pb); Carriles 12-15: evaluaciones individuales de las ovejas del grupo continuo con el iniciador UBC 773.*

## ANEXO

### **Protocolo de extracción de ADN total con CTAB-Fenol a partir de sangre**

- 1.- Colocar en un tubo 250  $\mu$ L de sangre descongelada + 250  $\mu$ L de agua destilada. Mezclar por inversión manual.
- 2.- Incubar 1 mL de CTAB a 60° C.
- 3.- Agregar 500  $\mu$ L de CTAB que está a 60° C y mezclar por inversión manual.
- 4.- Incubar a 60° C por 30 min, mezclando por inversión manual cada 5 min.
- 5.- Agregar 500  $\mu$ L de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y mezclar vigorosamente de forma manual durante 15 min (verificar que se forme una emulsión). Es importante tapar bien el tubo y sujetarlo con fuerza por la tapa al momento de mezclar, ya que puede explotar.
- 6.- Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min.
- 7.- Recuperar con cuidado la fase acuosa, con la ayuda de una punta de 1,000  $\mu$ L, (cortarle la punta para que el ADN no se rompa) y vaciarla en un tubo nuevo.
- 8.- Agregarle un volumen de Fenol igual al de la fase acuosa recuperada, mezclar vigorosamente de forma manual durante 15 min. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min.
- 9.- Recuperar con cuidado la fase acuosa, con la ayuda de una punta cortada de 1,000  $\mu$ L, y vaciarla en un tubo nuevo.
- 10.- Agregarle un volumen de Fenol-cloroformo alcohol isoamílico (1:1) igual al de la fase acuosa recuperada, mezclar vigorosamente de forma manual durante 15 min. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min.
- 11.- Recuperar con cuidado la fase acuosa, con la ayuda de una punta cortada de 1,000  $\mu$ L, y vaciarla en un tubo nuevo.
- 12.- Agregarle un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico igual al de la fase acuosa recuperada, mezclar vigorosamente de forma manual durante 15 min. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min.
- 13.- Recuperar con cuidado la fase acuosa, con la ayuda de una punta cortada de 1,000  $\mu$ L, y vaciarla en un tubo nuevo.

- 14.- Agregar 360  $\mu$ L de Isopropanol frio, mezclar suavemente por inversión manual, en este paso se observan las hebras de ADN. Centrifugar a 5,000 rpm por 15 min.
- 15.- Identificar el botón en el fondo del tubo y eliminar el sobrenadante. No perder de vista el botón, ya que puede ser eliminado. Lavar el botón con 1 mL de amortiguador de lavado (etanol 76 %-acetato de amonio 10 mM). Suavemente golpear la punta del tubo para desprender el botón
- 16.- Agitar por 20 min en el agitador rotatorio para tubos, para lavar el botón. Revisar que el botón no se pegue en el fondo del tubo.
- 17.- Centrifugar a 5,000 rpm por 15 min.
- 18.- Identificar el botón en el fondo del tubo y eliminar el sobrenadante. Lavar el botón con 1 mL de etanol al 76 % y agitar por 20 min en el agitador rotatorio para tubos, para lavar el botón.
- 19.- Centrifugar a 5,000 rpm por 10 min.
- 20.- Identificar el botón en el fondo del tubo y eliminar completamente el sobrenadante (utilizar una punta de 10  $\mu$ L para eliminar el remanente).
- 21.- Resuspender el botón en 5  $\mu$ L de amortiguador TE8. Observar cómo se disuelve el botón al agregar el amortiguador.
- Cuantificar en el espectrofotómetro a 260 y 280 nanómetros y correr en un gel de agarosa al 0.8 % para observar la calidad del ADN.

Soluciones utilizadas:

<b>Amortiguador TE8</b>		<b>Solución de CTAB</b>	
Tris	10 mM	CTAB	2 %
EDTA	1 mM	NaCl	1.4 M
Ajustar el pH a 8.0		$\beta$ -mercaptoetanol	0.2 %
		EDTA	20 mM
		Tris	100 mM
		Ajustar el pH a 8.0	

**Amortiguador de lavado**

Etanol                    76 %  
Acetato de amonio    10 mM

**Cloroformo-alcohol isoamílico**

Cloroformo            24 mL  
Alcohol isoamílico    1 mL

**Isopropanol frio****Etanol 76 %****Fenol**

**Aislamiento de ADN a partir de un protocolo barato y simple  
(Bailes *et al.*, 2007)**

- 1.- Colocar 800  $\mu$ L de STM frio en un tubo y colocarlo en hielo.
- 2.- Agregar 100 ó 200  $\mu$ L de sangre descongelada al tubo, mezclar por inversión manual (8 veces) y centrifugar a 1,000 xg por 5 min.
- 3.- Identificar los botones en el fondo del tubo y eliminar el sobrenadante. Ayudarse de una toalla absorbente, colocando el tubo boca abajo y golpeando suavemente para quitar el remanente. Es importante no perder de vista el botón, ya que puede ser eliminado.
- 4.- Resuspender el botón en 800  $\mu$ L de STM frio, mezclar por inversión manual (8 veces) y suavemente dar unos golpes en la punta del tubo para despegar el botón.
- 5.- Centrifugar a 1,000 xg por 5 min y repetir el paso 3.
- 6.- Resuspender los botones en 200  $\mu$ L de TEN+Pronase y mezclar por inversión manual (8 veces). Es importante observar cómo se disuelve el botón al agregar la solución.
- 7.- Incubar a 37° C por 1.5 horas, mezclando por inversión manual (8-14 veces) cada 10 min. Observar cómo poco a poco se van disolviendo los botones.
- 8.- Incubar a 65° C por 20 min para inactivar la Proteasa.

Cuantificar en el espectrofotómetro a 260 y 280 nanómetros y correr en un gel de agarosa al 0.8 % para observar la calidad del ADN extraído.

STM		TEN+Pronase	
Sacarosa	64 mM	Tris Cl, pH8	10 mM
Tris Cl, pH 7.5	20mM	EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	NaCl	10 mM
Triton X-100	0.5 %	Pronase©	100 µg/mL

**Características de los iniciadores utilizados, obtenidas por el programa Oligo Analyzer.**

Nombre	Secuencia (pb)		T° m (°C)	% G-C	Estructuras secundarias
10-B	GTGATCGCAG	(10)	32	60	Ninguna
11-B	GTAGACCCGT	(10)	32	60	Ninguna
19-B	ACCCCCGAAG	(10)	34	70	Ninguna
20-B	GGACCCTTAC	(10)	32	60	Ninguna
1-K	CATTCGAGCC	(10)	32	60	Ninguna
2-K	GTCTCCGCAA	(10)	32	60	Ninguna
3-N	GGTACTCCCC	(10)	34	70	Ninguna
5-N	ACTGAACGCC	(10)	32	60	Ninguna
11-N	TCGCCGCAA	(10)	32	60	Ninguna
15-N	CAGCGACTGT	(10)	32	60	Ninguna
19-N	GTCCGTA CTG	(10)	32	60	Ninguna
20-N	GGTGCTCCGT	(10)	34	70	Ninguna
02-S	CCTCTGACTG	(10)	32	60	Ninguna

Nombre	Secuencia (pb)		T° m (°C)	% G-C	Estructuras secundarias
04-S	CACCCCCTTG	(10)	34	70	Ninguna
05-S	TTTGGGGCCT	(10)	32	60	Ninguna
10-S	ACCGTTCCAG	(10)	32	60	Ninguna
18-S	CTGGCGAACT	(10)	32	60	Ninguna
04-AB	GGCACGCGTT	(10)	34	70	Ninguna
11-AB	GTGCGCAATG	(10)	32	60	Ninguna
UBC 751	CCCACCACAC	(10)	34	70	Ninguna
UBC 771	CCCTCCTCCC	(10)	36	80	Ninguna
UBC 773	GGGTTGTTGG	(10)	32	60	Ninguna
UBC 775	GGTTTGGTGG	(10)	32	60	Ninguna
UBC 787	CCCTTCTTCC	(10)	32	60	Ninguna
II	GGGACGTCTC	(10)	34	70	Ninguna
III	TTAGCGCCCC	(10)	34	70	Ninguna
Moh 4	GCATGCGATC	(10)	32	60	Ninguna
Moh 13	GCTGCTCGAGT	(11)	36	63.6	Ninguna
Moh 21	AACCGCGGTCT	(11)	36	63.6	Ninguna