

Caracterización genética de razas ovinas con el empleo de polimorfismos de proteínas¹

M. A. C. Lara^{2,3}, E. A. Cunha³, C. J. Veríssimo³, L. E. Santos³ y M. S. Bueno³

Instituto de Zootecnia, Agencia Paulista de Tecnología de Agronegocios, Secretaría de Agricultura y Abastecimiento del Estado de São Paulo, Brasil

Genetic characterization of sheep breeds based on protein polymorphisms

ABSTRACT: A total of 381 Suffolk, Ile de France, Poll Dorset, Santa Inés and crossbred sheep was used to investigate variability, genetic relationship, and the efficiency of protein polymorphisms in racial characterization and parentage tests. The genetic characterization was done through electrophoresis and by isoelectric focusing. Of the *loci* investigated 64.7% presented variability of variability. Two new alleles of Hemoglobin, *Hb^{A1}* and *Hb^{B1}*, were detected in Santa Inés, Suffolk and crossbred animals. The allele M of glucose phosphate isomerase is, probably, a genetic marker for the Suffolk breed. The values of Nei's Diversity for the leucine amino peptidase, nucleoside phosphorilase, hemoglobin and malic enzyme *loci* were higher than the others, indicating higher specificity in sheep breed characterization. Fisher's test revealed that allelic frequencies were different among breeds ($P < 0.01$), with the exceptions of the alleles phosphogluconate dehydrogenase and Catalase *loci* ($P > 0.05$). This genic differentiation was confirmed by multivariate analysis, the dendrogram of which, constructed from the genetic distances, showed two main clusters: one clusters the wool and the other the hairy breeds. In the first main cluster: one of the wool breeds and the other of hairy breeds. Poll Dorset and Ile de France, and the other represented by the Suffolk demonstrating the genetic relationships among breeds. The efficiency of these markers to exclude one of two possible sires was 76.7, 68.0, 61.3 and 84.8% for the Poll Dorset, Ile de France, Suffolk and Santa Inés breeds, respectively. The inclusion of other markers will increase the efficiency to 100% and allow greater precision in investigation of paternity.

Key words: Sheep, Genetic distances, Heterozygosity, Index of diversity, Genetic markers, Paternity tests.

© 2004 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2004. Vol. 12 (Supl. 1): 35-41

RESUMEN: Un total de 381 ovinos de las razas Suffolk, Ile de France, Poll Dorset, Santa Inés y cruzados fueron usados para evaluar la variabilidad, las relaciones genéticas, y la eficiencia de los polimorfismos proteicos en la caracterización racial y en el control de filiación. La caracterización genética fue realizada por electroforesis y focalización isoelectrica. El 64,7% de los *loci* investigados presentaron variabilidad. Dos nuevos alelos de hemoglobina, *Hb^{A1}* y *Hb^{B1}*, fueron detectados en ovinos Santa Inés, Suffolk y mestizos. El alelo M de la glucosafosfato isomerasa probablemente sea un marcador para la raza Suffolk. El índices de diversidad de Nei para los *loci* leucina aminopeptidasa, nucleosídeo fosforilasa, hemoglobina y enzima málica fueron mayores a los demás, revelando mayor especificidad en la caracterización ovina. La prueba exacta de Fisher reveló frecuencias génicas distintas entre razas ($P < 0,01$), con la excepción de los *loci* fosfogliconato deshidrogenasa y Catalasa ($P > 0,05$). Esa diferenciación génica fue confirmada por el análisis multivariado, cuyo dendrograma, construido a partir de las distancias genéticas, presentó dos conglomerados ("clusters") principales: uno que agrupa las poblaciones ovinas de lana y el otro las de pelo. En el primero se observan dos subgrupos: uno representado por las razas especializadas Poll Dorset e Ile de France y el otro por la raza Suffolk, revelando las relaciones genéticas entre razas. La eficiencia de estos marcadores en excluir uno de dos posibles padres fue 76,7; 68,0; 61,3 y 84,8% para las razas Poll Dorset, Ile de France, Suffolk y Santa Inés, respectivamente. La inclusión de otros marcadores podrá aumentar la eficiencia de la exclusión hasta un 100%, permitiendo mayor precisión en la investigación de paternidad.

Palabras clave: Ovinos, Distancia genética, Heterocigosidad, Índices de diversidad, Marcador genético, Prueba de paternidad.

Introducción

En los últimos años la ovinocultura brasileña ha crecido en número de animales y propiedades involucradas en

la actividad, principalmente en la región sudeste donde la demanda por la carne ovina viene en ascenso (Bueno *et al.*, 2002). El control fidedigno de la identificación de los animales es fundamental para los programas de mejora ani-

¹Proyecto IZ - NRP 583, desarrollado con apoyo financiero de la FAPESP (Processo N. 1999/07773-6).

²Correo E. malara@iz.sp.gov.br

mal, y dispositivos electrónicos, pendientes, tatuajes, entre otros, han sido usados en atención de lograr registros de producción y genealógicos confiables. Estos dispositivos *per se* no garantizan una identificación fidedigna del animal por cuanto puede haber, p. ej., registros de declaración de nacimiento erróneos. Además, la descripción de características fenotípicas no siempre es suficiente para evaluar la pureza racial. Actualmente, las técnicas moleculares asociadas a las ya mencionadas harían más confiable el proceso de identificación y certificación de origen del producto animal.

Los polimorfismos de proteínas constituyen sistemas prometedores para la caracterización genética; por cuanto revelan sustituciones de aminoácidos o delección, correspondientes a las modificaciones ocurridas en la secuencia codificadora del ADN (Lara, 1998) que alteran la estructura o carga de la molécula. Los análisis de marcadores genéticos, tales como grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos, permiten la caracterización de la variabilidad intra e inter poblaciones, siendo herramientas útiles en los estudios de caracterización y de relaciones genéticas entre razas (Lippi y Mortari, 2003). En general, variantes de proteínas presentan herencia monogénica de acción codominante que permiten la identificación del animal, aunque revelen sólo parte de la variabilidad cuando es comparada con los marcadores de ADN, principalmente del tipo microsatélite (Luís *et al.*, 2002). Un gran número de proteínas polimórficas ha sido descrito en ovinos, aunque en Brasil su uso en pruebas de control de parentesco ha sido muy restringido (Henkes *et al.*, 1994). El uso de esta técnica garantiza la paternidad de la descendencia de reproductores genéticamente superiores, agregando valor al producto.

Los objetivos del presente estudio fueron conocer la variabilidad y las relaciones genéticas entre nueve poblaciones ovinas, así como verificar la eficiencia de los polimorfismos de proteínas en la caracterización racial y en el control de paternidad.

Materiales y Métodos

Muestra

Fueron investigadas muestras sanguíneas de 354 ovinos de las razas Suffolk (Su), Ile de France (ILF), Poll Dorset (PD), Santa Inês (SI-NO) y cruzados (Crz), pertenecientes al rebaño del Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo, Brasil y 27 muestras de ovinos de la raza Santa Inês, oriundos de dos rebaños, localizados en las ciudades de Poconé (SI-PM) y Cuiabá (SI-S), ambas situadas en el Estado de Mato Grosso. Los animales de la raza Suffolk fueron clasificados en tres grupos genéticos: Suffolk PO (Su-PO), aquellos que descendían de puros por origen; Suffolk PCOD (Su-PCOD), todos los animales resultantes de cruces absorbentes, cuya composición genotípica era superior a 31/32 Suffolk; y mestizo Suffolk (Su-M), aquellos cuya composición genotípica variaba entre 15/16 a 31/32 Suffolk. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a través de la punción en la vena yugular y recolectadas en

tubos *vacutainer* con EDTA al 10 %, como anticoagulante. El plasma, que se utilizó para analizar los *loci* de amilasa-I (Am-I), transferrina (Tf), albumina (Alb) y leucina aminopeptidasa (Lap), fue separado por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos y almacenado a -20°C hasta el momento de los análisis de electroforesis.

Los eritrocitos fueron lavados en solución de NaCl 0,85%, diluidos en volumen idéntico de tampón fosfato, pH 7,4, conteniendo 40 % de glicerol, siendo también almacenado a -20°C. Esta fracción sanguínea fue utilizada para el análisis de electroforesis de varias proteínas: para la anhidrasa carbónica (CA) y catalasa (Cat), los hemolisados fueron obtenidos diluyendo los eritrocitos en agua destilada en la proporción de 1:3 y 1:30, respectivamente; para los análisis de la peptidasa-B (Pep-B), fosfogliconato desihidrogenasa (PGD), superóxido dismutasa (SOD), glicosefosfato isomerasa (PGI), diaforasa I y II (Dia-I, Dia-II), enzima málica (EM), malato desihidrogenasa (MDH), nucleosídeo fosforilasa (NP) y proteína-X (XP), los hemolisados fueron obtenidos añadiendo 10 :1 de mercaptoetanol 2 % por cada 100 :1 de eritrocitos.

Análisis de Electroforesis

Los análisis de electroforesis para la mayoría de las proteínas fueron realizados en geles de almidón de maíz 14% (Val *et al.*, 1981), excepto para Am-I, Tf, Alb, Lap, MDH y Prot-X, en que se utilizó gel de almidón de patata y para PGI, gel de poliácridamida 5,5% (Beatty *et al.* 1983). Las variantes Am-I, Tf, Alb, Ca, Pep-B, PGD y SOD fueron investigadas empleando las metodologías descritas en Lara *et al.* (1997).

La separación de las variantes de Cat fue realizada en gel de almidón en placa refrigerada, empleándose un voltaje constante de 12 Vcm⁻¹ y solución tampón conteniendo D-L-histidina 0,01M, pH 6,5, citrato de sodio 0,41M y ácido cítrico 0,41M, pH 8,0. La actividad enzimática fue revelada incubando el gel en una solución con 2% de ferrocianato de potasio y 2% de clorato férrico, después de su incubación en solución de peróxido de hidrógeno, en la concentración del 0,1%, según recomendaciones de Harris y Hopkinson (1976).

Para los análisis de electroforesis de DIA-I e DIA-II fueron empleados el tampón Tris/citrato, pH 7,2 (0,017 M en Tris y 2,3 mM en ácido cítrico) para la preparación del gel, y el tampón Tris/citrato, pH 8,6 (0,42 M en Tris y 0,063 M en ácido cítrico) en la cubeta.

Para el análisis de EM fue empleado el sistema continuo de tampón Tris/ácido bórico/ EDTA, pH 8,6 (0,9 M en Tris, 0,5 M en ácido bórico y 0,02 M en EDTA), diluido en la proporción de 1:10 y 1:7, para el gel y cubeta de electroforesis, respectivamente.

Para el análisis de las variantes MDH fue empleado el sistema de tampón discontinuo: en el gel el tampón His/HCl, pH 6,0 (0,02 M en histidina/HCl y 0,01 M en NaOH), y en la cubeta el tampón citrato pH 6,0 (0,4 M en ácido cítrico y 1,130 M en NaOH). Las actividades de las enzimas DIA-I, DIA-I y MDH fueron reveladas según Harris y Hopkinson (1976).

Para el análisis de las variantes NP fue empleado el

tampón fosfato 0,1 M, pH 6,9 en el gel, y en la cubeta el fosfato al 0,05 M. En la revelación de las actividades de NP, sobre el gel fue aplicada una mezcla de reacción con 15 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, 12,069 mg de inosina, 1 mg de PMS, 12,5 mg de MTT, 1 unidad de xantina oxidasa y 10 ml de solución de agar 2%, siendo incubado por cerca de 15 minutos a 37°C, hasta visualización de las zonas de actividades.

Para los análisis de electroforesis de Prot-X fue empleado el sistema de tampón discontinuo de Kristjansson (1963), cuyas variantes fueron distinguidas mediante tinción con almidón negro en la concentración de 0,25% en solución de etanol: agua destilada: ácido acético, en la proporción de 5:5:1, después de frecuentes baños.

Actividad Enzimática

La actividad enzimática de la PGI fue revelada según la técnica de Beatty *et al.* (1983) modificada. Sobre la superficie del gel fue aplicada una mezcla de reacción con 20 ml de tampón Tris HCl 0,03 M, pH 8,0, 10 mg de fructosa-6-fosfato, 4 mg de NADP, 11 mg de MTT, 1,2 mg de PMS, 50 ml de glicosa 6-fosfato deshidrogenasa ($1,4 \text{ U ml}^{-1}$) y 10 ml de una solución de agar 2% en agua destilada, siendo incubado por cerca de 10 minutos a 37°C, hasta visualización de zonas de actividad.

Polimorfismo en Hemoglobina

El polimorfismo de la hemoglobina fue determinado a través de la técnica de focalización isoelectrónica. Se empleó el sistema *Multiphor* de la *Amersham Biosciences* con gradiente de pH 6,7 - 7,7. El gel fue preparado entre placas de vidrio con dimensiones de 124 x 260 x 1 mm, conteniendo una película de soporte (*GelBond*), a la cual el gel de poli(acrilamida) se adhirió firmemente. La solución de polimerización contenía las siguientes soluciones: 2,34 ml de acrilamida 28%, 1,004 ml de metilenebisacrilamida 2%, 650 ml de anfolito pH 6,7 - 7,7, 650 ml de solución de persulfato de sodio (75 mg ml^{-1}), 22 ml TEMED, 2,4 g de sacarosa y 8,3 ml de agua destilada. Las muestras de hemoglobina, tratadas con tetracloruro de carbono y cianato de potasio, según técnica de Basset *et al.* (1978) fueron absorbidas en papel de filtro (4 x 4 mm) y aplicadas en el gel, después de 20 minutos de prefocalización. Estos papeles fueron mantenidos por 10 minutos para permitir el pasaje de la muestra en el gel.

Las soluciones ácido glutámico y hidróxido de sodio, ambas en la concentración de 0,1 M fueron utilizadas como electrolitos en la IEF, empleando límites máximos de 2000 V, 20 mA y 10 W, durante tres horas. Las variantes de hemoglobina fueron fijadas en solución de ácido tricloroacético 34,5%, contiendo 3,5 g de ácido sulfosalicílico, por 15 minutos y, en seguida, lavado en solución de alcohol, ácido acético y agua, en la proporción de 25:8:67, respectivamente.

Variabilidad Genética.

Las frecuencias alélicas, índices de heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), número de alelos (n) y probabilidades de exclusión (PE) de falso parentesco fueron estimados empleando el programa CERVUS 1.0 (Marshall *et al.*, 1998), según Jamieson (1994).

La diferenciación génica y genotípica fue investigada empleándose el programa GENEPOP versión 1.2 (Raymond y Rousset, 1995). El dendrograma fue construido a partir de la matriz de distancia genética padronizada de Nei (1978) empleándose el método *neighbor joining* (Saitou y Nei, 1987), contenido en el DISPAN (Kumar *et al.*, 1993).

Resultados y Discusión

El presente estudio describe dos variantes nuevas de la hemoglobina, denominadas Hb^{A1} y Hb^{B1}. Los análisis de segregación de los alelos sugieren la presencia de cuatro alelos codominantes (Hb^A, Hb^B, Hb^{A1} e Hb^{B1}), cuyo perfil electroforético es presentado en la Figura 1. El alelo Hb^{A1} fue exclusivo de los rebaños Santa Inés y Suffolk mestizo y, el alelo Hb^{B1} de los rebaños Suffolk PO, mestizo, y Santa Inés.

El Cuadro 1 presenta los estimados de frecuencia alélica para los once *loci* polimórficos. Los *loci* Am-I, Alb, CA, Pep-B, SOD y DIA-II no presentaron variabilidad. En la literatura los *loci* Alb, CA, SOD y DIA-II han sido considerados monomórficos para la mayoría de las razas ovinas (Henkes *et al.*, 1994), no así los *loci* Alb y CA. Morera *et al.* (1983) reportan variantes en estos *loci* en ovinos de las razas Merino y Churro.

La prueba exacta de Fisher revela diferencias en frecuencia alélica estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre los grupos raciales evaluados, excepto para los *loci* PGD y Cat ($P > 0,05$). La variabilidad de la PGI, observada sólo en las tres poblaciones Suffolk, es indicativo de la importancia de este *locus* en las evaluaciones de pureza racial, una vez que el alelo *PGI^M* fue exclusivo de los ovinos Suffolk, pudiendo ser considerado como un marcador genético de esta raza. Este alelo ha sido reportado por Beatty *et al.* (1983). Estos autores evaluaron 32 progenies resultantes de cruces entre 23 ovejas mestizas (Border Leicester x Cheviot) del tipo T para PGI y tres carneros Suffolk del tipo M y detectaron la presencia de los alelos *PGI^T* y *PGI^M* con frecuencias de 0,72 y 0,28 respectivamente, siendo ese sistema considerado dominante. El polimorfismo observado en el presente estudio puede ser explicado por la existencia de dos alelos autosómicos codominantes, *PGI^T* y *PGI^M*, aunque las evidencias no son aún concluyentes.

La diferencia génica observada entre los grupos raciales fue confirmada por el análisis multivariado, cuyo dendrograma construido a partir de las distancias genéticas de Nei, con base en los once *loci* polimórficos, estructuró muy bien las nueve poblaciones. El dendrograma mostrado en la Figura 2 presenta dos conglomerados ("clusters") principales: uno agrupa las poblaciones de ovinos de lana y el otro a las tres poblaciones de pelo de la raza Santa Inés. En el primero, se pueden aún observar dos grupos: uno representado por las razas especializadas Poll Dorset e Ile de France y el otro por la raza Suffolk. En este último, los animales PO, PCOD y mestizos comparten un mismo ancestro; conforme lo esperado, aunque los animales PCOD presentaron mayor similitud con los animales mestizos.

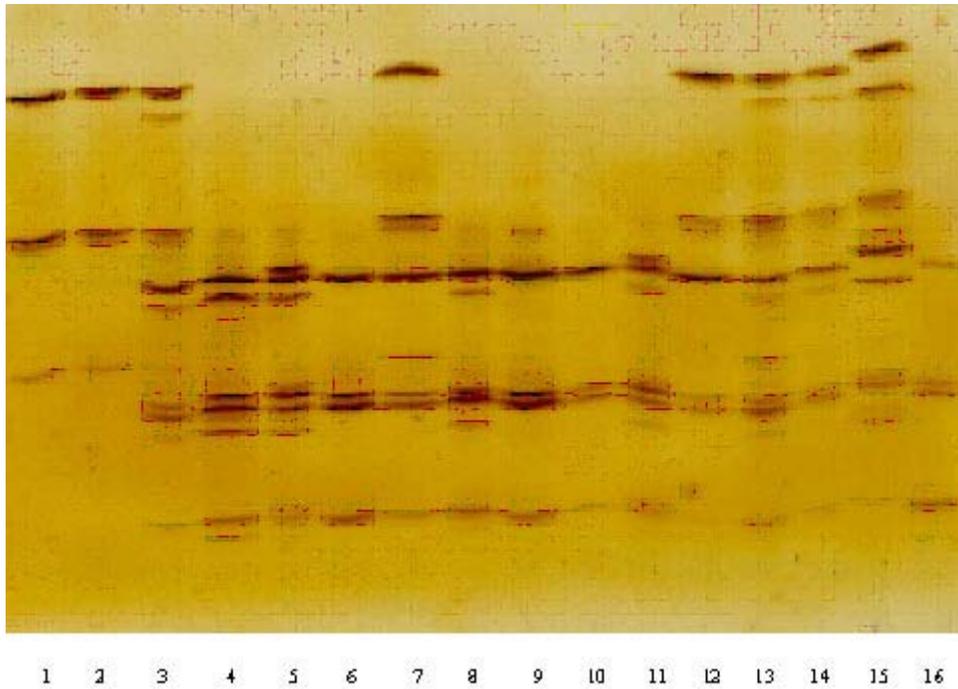


Figura 1. Perfil electroforético de la Hemoglobina investigada por la técnica de focalización isoelectrica. Muestras 1 y 2, fenotipo Hb-A; muestras 3, 7, 12, 13 y 14, fenotipo Hb-AB, muestras 4, 6, 8, 9, 10 y 16, fenotipo Hb-B; muestras 5 y 11, fenotipo Hb-BB1; muestra 15, fenotipo Hb-A1B1.

Cuadro 1. Frecuencia alélica por población

locus	Alelos	Suffolk						Santa Inés		
		PO	PCOD	M	Cruzado	Ile de France	Dorset	NO	PM	S
Tf	Tf A	0,37	0,39	0,33	0,17	0,33	0,30	0,19	0,33	0,38
	Tf B	0,44	0,32	0,38	0,83	0,37	0,33	0,34	0,27	0,46
	Tf C	0,11	0,17	0,20	0,00	0,30	0,38	0,43	0,40	0,17
	Tf D	0,09	0,13	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
Lap	Lap A	0,41	0,36	0,22	1,00	1,00	0,78	0,36	0,74	0,42
	Lap B	0,59	0,64	0,78	0,00	0,00	0,22	0,64	0,26	0,58
Hb	Hb A	0,00	0,01	0,04	0,33	0,12	0,00	0,37	0,27	0,21
	Hb A1	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,05	0,10	0,21
	Hb B	0,98	0,99	0,89	0,67	0,88	1,00	0,51	0,33	0,46
	Hb B1	0,02	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,07	0,30	0,13
Cat	Cat F	0,85	0,96	0,95	1,00	0,87	0,95	0,90	0,83	0,88
	Cat S	0,15	0,05	0,05	0,00	0,13	0,05	0,10	0,17	0,13
PGD	PGD1	1,00	0,99	0,97	1,00	0,98	0,95	0,98	1,00	1,00
	PGDB2	0,00	0,01	0,03	0,00	0,02	0,05	0,03	0,00	0,00
PGI	PGI T	0,96	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	PGI M	0,04	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DIA1	DIA-IF	0,65	0,67	0,74	0,67	0,91	0,78	0,67	0,67	0,38
	DIA-1S	0,35	0,33	0,26	0,33	0,09	0,23	0,33	0,33	0,63
EM	EMF	0,96	0,92	0,92	0,83	0,97	0,98	0,62	0,90	0,77
	EMS	0,04	0,08	0,08	0,17	0,03	0,03	0,38	0,10	0,23
MDH	MDH 1	0,98	0,98	1,00	1,00	0,98	0,98	0,91	0,90	0,92
	MDH 2	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,03	0,09	0,10	0,08
NP	NP H	0,25	0,20	0,26	0,42	0,60	0,78	0,77	0,57	0,92
	NP L	0,75	0,80	0,74	0,58	0,40	0,22	0,23	0,43	0,08
XP	XP 1	0,76	0,96	0,90	1,00	0,61	0,88	0,87	0,80	0,96
	XP 2	0,24	0,05	0,10	0,00	0,39	0,13	0,13	0,20	0,04

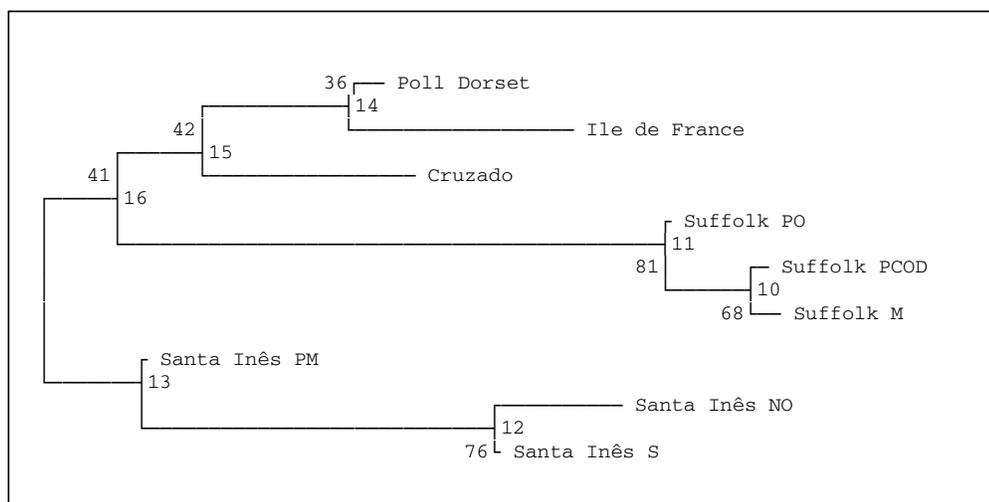


Figura 2. Dendrograma indicativo de las relaciones genéticas entre las poblaciones evaluadas

Los cruces, a pesar de compartir el mismo cluster, revelaron diferencias mayores en su composición genética en comparación con las demás razas.

La proximidad genética entre los animales de las razas de lana Ile de France y Poll Dorset se debe, probablemente, a su origen común de la raza Merina. Los animales de la raza Suffolk, de origen británico (Bueno *et al.*, 2002), no presentan genes de la raza Merina en su formación. Los animales cruzados eran mestizos Poll Dorset x Santa Inês, lo que se puede confirmar por su proximidad con la raza paterna.

En el cluster Santa Inês, las tres poblaciones SI-PM, SI-NO, y SI-S compartieron un mismo ancestro y muestran una gran similitud genética, en correspondencia con su origen. Los ovinos Santa Inês descienden de cruces entre carneros de la raza Bergamácia y ovejas deslanadas naturalizadas Brasileñas, de origen Africano, cuya creación es característica de la región nordeste Brasileña (Figueiredo *et al.*, 1979). Sin embargo, hay diferencias en la composición génica de las tres poblaciones. La población SI-NO está más próxima de la SI-S ($D = 0,0049$) que de la SI-PM ($D = 0,01203$), siendo la distancia genética entre SI-PM y SI-S igual a 0,0155, justificando el agrupamiento entre ellas. Este resultado podría contribuir a aumentar la variabilidad de los rebaños, si la elección de reproductores para cruces fuera realizada con base a las estimaciones de distancias genéticas, pues expresan diferencias entre poblaciones o individuos (Cepica *et al.*, 1995).

El análisis de diversidad de Nei (1973) permitió estimar para cada *locus* la proporción de la diversidad genética correspondiente a las diferencias entre poblaciones, cuyos valores se expresan por GST. Los valores encontrados revelan especificidad para algunos *loci* y su uso potencial en estudios de caracterización genética, principalmente los *loci* Lap, NP, HB, EM, cuyos valores fueron 38,37; 21,15; 19,70 y 13,34 %, respectivamente. Los valores de los demás *loci* oscilaron entre 11,8 y 1,4%, en el siguiente orden: Xp > Tf > DIA-I > Cat > MDH > PGI > PGD.

Los índices de diversidad estimados para cada población se presentan en el Cuadro 2. Las razas especializadas

Suffolk, Ile de France y Poll Dorset presentan valores relativamente menores en comparación con la raza naturalizada Santa Inês. Esta variación puede ser consecuencia de los diferentes objetivos y presión de selección aplicada a cada raza.

Los valores medios de heterocigosidad variaron entre $0,145 \pm 0,065$ en la raza Poll Dorset y $0,240 \pm 0,072$ en la raza Santa Inês. Los valores de heterocigosidad observados están en correspondencia con los esperados. Algunos trabajos demuestran que la heterocigosidad puede estar asociada a la mayor velocidad de crecimiento de los animales. Backer y Manwell (1977), trabajando con razas ovinas cruzadas, detectaron una velocidad de crecimiento 10,4% mayor en los heterocigotos que en los homocigotos para los *loci* de la isocitrato deshidrogenasa y enzimas málicas.

Se sabe que la supervivencia de las poblaciones a las variaciones del medio ambiente está íntimamente relacionada a la variabilidad de los individuos. La disminución en diversidad hace que los individuos pierdan su capacidad evolutiva, haciéndoles susceptibles a las influencias negativas del ambiente (Bannikova y Zubareva, 1995). En general, rebaños comerciales creados en condiciones industriales son más susceptibles a las enfermedades parasitarias e infecciosas que las razas nativas. En este sentido, los índices de diversidad estimados en el presente estudio están en correspondencia con lo esperado (Cuadro 2). Las poblaciones de la raza Santa Inês presentaron mayor variabilidad comparadas con las razas especializadas, aunque haya individuos homocigotos, cuyo índice de fijación fue positivo e igual a 0,055. Este estudio forma parte de un proyecto más amplio, en que se pretende buscar una relación entre marcadores genéticos y resistencia a las verminosas.

Con relación a la eficiencia de los sistemas de proteínas en la investigación de paternidad, se puede verificar que el *locus* de la transferrina fue el de mayor importancia en todas las razas investigadas, unido al *locus* de la Hemoglobina en la raza Santa Inês (Cuadro 3). Conforme a lo esperado, esos *loci* presentaron el mayor número de alelos. Según

Cuadro 2. Índices de diversidad por población

Población	Alelos / <i>locus</i>	<i>loci</i> poli-mórficos, %	Equilibrio HW	Contage directo	Índice de fijación F
Suffolk PO	1,9 ± 0,3	36,4	0,184 ± 0,069	0,194 ± 0,073	- 0,054
Suffolk PCOD	2,0 ± 0,2	38,5	0,151 ± 0,068	0,155 ± 0,075	- 0,026
Suffolk M	2,1 ± 0,3	61,5	0,164 ± 0,065	0,174 ± 0,072	- 0,061
Ile de France	1,8 ± 0,2	45,5	0,172 ± 0,066	0,182 ± 0,073	- 0,058
Poll Dorset	1,7 ± 0,2	45,5	0,142 ± 0,064	0,145 ± 0,065	- 0,021
Santa Inês	2,1 ± 0,3	69,2	0,254 ± 0,075	0,240 ± 0,072	0,055

Gündel y Reetz (1981) y Jamieson (1994) la probabilidad de detección de falso parentesco depende del número de sistemas investigados, del número de alelos por sistema, y de las frecuencias alélicas de la raza o población, a la cual el animal pertenece. Un número considerable de polimorfismos ha sido detectado, sin embargo, la posibilidad de prever el valor más amplio de su utilización en el control de paternidad está limitada por la poca información con que se cuenta sobre frecuencias alélicas para las diversas razas ovinas creadas en Brasil.

En el presente estudio, la probabilidad de exclusión estimada para las razas Suffolk, Ile de France, Poll Dorset y Santa Inês, con base en los once *loci*, fue de 76,9; 68,0; 61,3 y 84,8%, respectivamente (Cuadro 3). Esos valores están

próximos a los estimados por Manwell y Backer (1977) y Henkes *et al.* (1994), cuando estudiaban los animales de las razas Merino Australiano, Poll Dorset, y Romey Marsh x Merino Boorola, cuyas probabilidades de exclusión fueron cerca de 0,69; 0,56; 0,67; 77,28 y 77,72%, respectivamente. La eficiencia de las pruebas de paternidad depende de la variabilidad encontrada para los diferentes *loci* en las diferentes razas (Grundel y Reetz, 1981; Jamieson, 1994; Double *et al.*, 1997), lo cual dificulta el establecimiento de un número mínimo de marcadores genéticos a utilizar. La inclusión de otros marcadores podrá aumentar la eficiencia de la exclusión a un 100%, permitiendo mayor precisión en la investigación de paternidad para la especie ovina.

Cuadro 3. Número de alelos (NA) y probabilidad media de exclusión (PE) de paternidad por población, estimada con base en once *loci* de proteínas

<i>locus</i>	Suffolk		Ile de France		Poll Dorset		Santa Inês	
	NA	PE	NA	PE	NA	PE	NA	PE
Tf	4	0,432	3	0,369	3	0,368	4	386
Lap*	2	0,181	1	0,000	2	0,045	2	179
Hb	2	0,015	2	0,092	1	0,000	4	362
Cat	2	0,070	2	0,099	2	0,045	2	89
PGD	2	0,007	2	0,022	2	0,045	2	0,02
PGI	2	0,040	1	0,000	1	0,000	1	0
DIA-I	2	0,173	2	0,077	2	0,144	2	0,172
EM	2	0,059	2	0,027	2	0,024	2	0,173
MDH	2	0,070	2	0,022	2	0,024	2	0,08
NP*	2	0,182	2	0,118	2	0,045	2	0,08
XP	2	0,090	2	0,181	2	0,097	2	0,1
Todos		0,769		0,680		0,613		0,848

Conclusiones

La variabilidad genética observada en las poblaciones de razas ovinas especializadas fue inferior en relación con las poblaciones de razas naturalizadas. Los *loci* Lap, NP, Hb y EM fueron los que proporcionaron mayor información, cuyos alelos se presentaron en frecuencias específicas, permitiendo caracterizar las nueve poblaciones, y estimar las relaciones genéticas entre ellas. El alelo M de la glucosa fosfato isomerasa probablemente sea un marcador

para la raza Suffolk. Con relación a la eficiencia para la exclusión de paternidad de los once *loci* polimórficos, se puede concluir que independientemente de la raza, el *locus* de la transferrina fue el sistema proteico con mayor probabilidad individual de exclusión. La inclusión de otros marcadores permitiría aumentar la eficiencia de exclusión eventualmente a un 100%. En Brasil, las pruebas de paternidad en ovinos, hasta el momento, no han sido realizadas, pero su implantación aseguraría mayor precisión en los registros y controles genealógicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del técnico Aides José Ribeiro, cuyas actividades de laboratorio permitieron la conclusión del presente estudio y la Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP, por el auxilio financiero.

Literatura Citada

- Baker, C. M. A., and C. Manwell. 1977. Heterozygosity of the sheep. Polymorphism of Malic Enzyme, Isocitrate Dehydrogenase (NADP+), Catalase and Esterase. *Aust. J. Biol. Sci.* 30: 127.
- Bannikova, L. V., and A. Zubareva. 1995. Genetic structure of some native and commercial breeds of cattle (*Bos taurus*) from Eurasia. *Russian J. Genet.* 31: 697.
- Basset, P., Y. Beyzard, M. C. Garel, and J. Rosa. 1978. Isoelectric focusing of human hemoglobin: its application to screening, to the characterization of 70 variants and to the study of modified fraction of normal hemoglobins. *Blood* 51: 971.
- Betty, E. M., D. L. Doxey, and J. FitzSimmons. 1983. Glucosephosphate isomerase in sheep. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 14: 213.
- Bueno M. S., E. A. Cunha, C. J. Veríssimo, L. E. Santos, M. A. C. Lara, S. M. Oliveira, E. Spósito-Filha y M. M. Rebouças. 2002. Infección por nematodos en razas de ovejas cárnicas intensivamente en la región del sudeste del Brasil. *Arch. Zootec.* 51: 271.
- Cepica, S., J. Wolf, J. Hojny, I. Vacková, and J. Schröfel Jr. 1995. Relations between genetic distance of parental pig breeds and heterozygosity of their F1 crosses measured by genetic markers. *Anim. Genet.* 26: 135.
- Double, M. C., A. Cockburn, S. Barry, and P. E. Smouse. 1997. Exclusion probabilities for single-locus paternity analysis when related males competes for mating. *Mol. Ecol.* 6: 1155.
- Figueiredo, E. A. P., E.R. Oliveira e C. Bellaver. 1980. Performance dos ovinos deslanados no Brasil. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos Tropicais. Circular Técnica 01. 32 p.
- Gundel, H., and I. Reetz. 1981. Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphism in dogs *Anim. Blood Groups & Biochem. Genet.* 12: 123-132.
- Harris, H. and A. Hopkinson. 1976. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics.* North-Holland, Amsterdam.
- Henkes, L. E. 1992. Investigaçao da variabilidade genética em um rebanho ovino Romney Marsh Booroola. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 127 pp.
- Henkes, L. E., T. A. Weimer, and J. C. F. Moraes. 1994. Biochemical markers in sheep and their potential use for paternity tests. *Ciência Rural* 24: 579.
- Jamieson A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics* 25 (supplement 1): 37
- Kristjansson, F. K. 1963. Genetic control of two pre-albumins in pigs. *Genet.* 48: 1059.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 1993. (DISPAN) Molecular Evolutionary Analysis - MEGA. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University Park.
- Lara, M. A. C., G. P. Guaragna, R. H. Heichert, L. R. M. Silva e E. P. B. Contel. 1997. Investigaçao da Variabilidade Genética do rebanho Mantiqueira através de Polimorfismos Protéicos. I Caracterizaçao Genética e Estudos Comparativos. B. *Indústr. Anim.* 54: 1 -
- Lara, M. A. C. 1998. Variabilidade Genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. 215 pp.
- Lippi, A., and N. Mortari. 2003. Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga marchador and Mangalarga (*Equus caballus*). *Genet. Mol. Biol.* 26: 403.
- Luís, C., E. G. Cothram, and M. M. Oom. 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genet. Mol. Biol.* 25: 131
- Manwell, C., and C. M. A. Baker. 1977. Genetic distance between the Australian Merino and the Poll Dorset sheep. *Genet. Res. Camb.* 29: 239.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639
- Morera, L., D. Llanes, M. Barbancho, and A. Rodero. 1983. Genetic polymorphism in Spanish Merino sheep. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 14: 77.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet.* 89: 583
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3321
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumeinism. *J. Hered.* 86: 248.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Ecol.* 4: 406
- Val, A. L., A. R. Schwantes, M. L. B. Schwantes e P.H. Luca. 1981. Amido hidrolizado em milho como suporte eletroforético. *Ciênc. Cult.* 33: 992.