

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN AUTÓCTONA: LA GALLINA DE CHULLILLA

Grimal¹, A., Viudes de Castro¹, M.P., Vicente², J.S., Gómez¹, E.A.

¹Centro de Tecnología Animal (CITA), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
Polígono La Esperanza, 100. 12400 Segorbe. Castellón.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Universidad Politécnica de Valencia.
Cno. Vera s/n. 46071 Valencia.
e-mail: agrimal@ivia.es

INTRODUCCIÓN

En la Comunidad Valenciana se está llevando a cabo un programa de caracterización y conservación de una población de gallinas originaria de la localidad valenciana de Chullilla en la comarca de Los Serranos, encontrándose parte de la población en las instalaciones del CITA-IVIA en Segorbe (Grimal y Gómez, 2006). Una de las tareas planteadas fue su caracterización genética mediante marcadores microsatélites con el fin de poder comparar la población con otras poblaciones europeas estudiadas en el proyecto AVIANDIV (Hillel *et al.*, 2003) estableciendo las distancias genéticas, así como servir de base para poder realizar pruebas de paternidad. En este trabajo se presentan los resultados preliminares del genotipado para la caracterización genética de la población partiendo de los 30 microsatélites recomendados por la FAO (2004), calculando algunos parámetros de variabilidad y posibilidad de realización de filiaciones. Esta tarea se llevó a cabo en colaboración con el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó el grupo de animales existente en las instalaciones del Centro de Tecnología Animal de Segorbe, que constituye el 75% de la población real existente. Se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena ulnar con tubos *Vacutainer*TM estériles con EDTA_{K3} como anticoagulante. Para la extracción de ADN, se siguió un protocolo clásico a partir de 40 µl de sangre entera, brevemente: dos pasos de hemólisis, incubación toda la noche con proteinasa K y NaCl, precipitación con Isopropanol, resuspensión en Propanol, eliminación del Propanol y resuspensión en TE, obteniéndose 500 µl de disolución con una concentración media de 199,1 µg/ml. Se disponía de la batería de 30 microsatélites recomendados por la FAO (2004) y se estructuraron en 7 multiplex [Multiplex 1 (ADL0268, ADL0278, MCW0216, MCW0248 y LEI0094), Multiplex 2 (MCW0295, MCW0081, MCW0069, MCW0034 y MCW0222), Multiplex 3 (MCW0111, MCW0037, MCW0016, MCW0234 y LEI0166), Multiplex 4 (ADL0112, MCW0014 y MCW0183), Multiplex 5 (MCW0123, MCW0165, MCW0020 y MCW0104), Multiplex 6 (MCW0078, MCW0067, MCW0330 y MCW0098), Multiplex 7 (MCW0206 y MCW0103)], además de dos microsatélites sin información (MCW0284 y LEI0192).

La amplificación de los marcadores se realizó mediante PCR, utilizando 50 ng de ADN genómico en la mezcla de reacción. Siguiendo las recomendaciones de la FAO (2004), se emplearon dos productos comerciales de Quiagen[®] que contenían tanto la Taq polimerasa como los dNTPs y el MgCl₂, (la Master Mix para todas las multiplex, excepto la 7, en la que se empleó la Hot Star Master Mix). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: un primer paso de 2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, a excepción de la multiplex 4 donde se realizaba a 58°C, y 1 minuto a 72°C) seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un secuenciador *CEQ*TM 8000 *Beckman Coluter* por electroforesis capilar con marcaje fluorescente. Se utilizó el programa *CERVUS 3.0* para el análisis de los resultados (Kalinowski *et al.*, 2006).

Para poder comparar resultados de secuenciación, disponemos de muestras de ADN de individuos usados como testigos en el proyecto AVIANDIV (cedidas por M. Tixier-Boichard), así como muestras de ADN de Castellana Negras (donadas por el INIA).

El objetivo principal del presente estudio es la caracterización genética preliminar para poder realizar comparaciones en un análisis filogenético entre nuestra población y las poblaciones estudiadas en el proyecto AVIANDIV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 30 microsatélites propuestos, se presentan los resultados de 17 (13 de los cuales aparecen incluidos en el proyecto AVIANDIV (Hillel *et al.*, 2003)). En la **Tabla 1** se resumen los resultados obtenidos con el programa CERVUS 3.0, ordenando los microsatélites según su contenido informativo (PIC). El número medio de alelos por locus fue 2,94, lo que la situaría por debajo de la media (3,52) de las 52 poblaciones estudiadas en el proyecto AVIANDIV, en el que dicha cantidad oscilaba entre 1,3 para la línea consanguínea-C y 5,2 para el *Gallus gallus spadiceus*, habiendo obtenido las dos poblaciones españolas estudiadas valores de 3,9 alelos por locus en la Villafranquina Roja y 3,3 en la Castellana Negra.

La heterocigosidad esperada (H_e) dio un valor medio de 0,43, ligeramente inferior a la media obtenida en el proyecto AVIANDIV (0,47), así como al de la Villafranquina Roja (0,48) o la Castellana Negra (0,44); si bien, un 25% de las poblaciones estudiadas dieron valores inferiores. El valor de H_e se mostró muy variable entre loci abarcando desde 0,74 hasta 0 para un microsatélite con sólo 1 alelo (MCW0014). Un hecho semejante ocurre en las dos poblaciones españolas con los microsatélites MCW0248 y MCW0098, siendo este último el microsatélite menos polimórfico en el proyecto AVIANDIV, aunque presentaba polimorfismos en el 69% de las poblaciones. En este análisis, el marcador más informativo fue el MCW0034, al igual que en el citado proyecto en que presentó polimorfismos en el 98% de las poblaciones incluidas. El contenido informativo del polimorfismo (PIC), una medida de la información que proporciona un locus relacionada con H_e , dio un valor medio de 0,38, variando desde 0,69 a 0, valores ligeramente inferiores a los obtenidos por Wimmers *et al.* (2000) con poblaciones asiáticas, africanas y sudamericanas.

La probabilidad de exclusión PE_1 , o probabilidad de excluir de la paternidad a un individuo no emparentado, dio un valor conjunto de 0,903 para todo el panel de microsatélites estudiado. La probabilidad de excluir a los dos parentales no emparentados PE_{pp} dio un valor mucho más excluyente (0,9997). Valores de heterocigosidad esperada menores de 0,5 no son, en general, muy útiles en análisis de paternidad a gran escala, por lo que, si bien toda información disponible puede ser útil, sólo 7 de los 17 microsatélites mostraron un valor mayor. Por ello, el panel microsatélites estudiado se muestra eficaz para el estudio de parentesco en esta población, ya que en la actualidad disponemos de polladas de medios hermanos, con dos grupos de madres con un macho cada uno, por lo que se trataría de testar 2 machos y dos grupos de madres.

Es necesario continuar analizando la información del resto de microsatélites para establecer un panel de microsatélites más preciso. Por ello, se continua trabajando con microsatélites que no han amplificado correctamente, modificando las condiciones de la PCR, para poder obtener la mayor cantidad de información posible. Todo ello nos permitirá que, a la hora de introducir como reproductores a individuos nacidos en nuestro centro, podamos asegurar su filiación, calcular el coeficiente de parentesco molecular entre individuos, así como establecer relaciones filogenéticas con otras poblaciones como las estudiadas en el proyecto AVIANDIV.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación de la Beca para Proyectos de Investigación de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat

Valenciana obtenida por A. Grimal y a la financiación por parte del INIA con el proyecto de investigación RZ2004-00040 del Subprograma de Conservación de Recursos Genéticos y fondos FEDER

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAO. 2004. Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans.
- Grimal, A., Gómez, E.A. 2006. Descripción y caracterización de una población de la Comunidad Valenciana: Gallina de Chulilla. V Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales.
- Hillel, J., Groenen, M.A.M., Tixier-Boichar, M., Korol, A.B., David, L., Kirzhner, V.M., Burke, T., Barre-Dirie, A., Crooijmans, P.M.A., Elo, K., Feldman, W., Freidlin, P.J., Mäki-Tanila, A., Oortwijn, M., Thomson, P., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet. Sel. Evol.* 35 (2003) 533-557
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2006. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, *in press*.
- Wimmers, K., Ponsuksili, S., Hardge, T., Valle-Zarate, A., Mathur, P.K., Horst, P. 2000. Genetic distinctness of African, Asian and South America local chickens. *Animal Genetics*. 31, 159-165.

Tabla 1. Número de alelos (k), número de individuos muestreados (N), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), contenido informativo de polimorfismo (PIC), probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado cuando se desconoce el otro parental (PE₁) o de un par de padres no emparentados (PE_{pp})

Locus	k	N	Ho	He	PIC	PE ₁	PE _{pp}	Alelos
MCW0034	4	64	0,797	0,742	0,687	0,313	0,661	222, 226, 233, 235
LEI0094	4	68	0,838	0,729	0,673	0,299	0,644	261, 263, 265, 279
MCW0016	4	65	0,554	0,690	0,620	0,249	0,569	140, 142, 146, 148
MCW0037	4	65	0,646	0,656	0,583	0,224	0,536	153, 155, 156, 157
MCW0111	3	65	0,738	0,660	0,580	0,214	0,509	98, 100, 102
MCW0067	3	67	0,731	0,599	0,528	0,177	0,474	171, 173, 177
MCW0330	4	67	0,672	0,561	0,509	0,165	0,493	257, 269, 276, 288
MCW0098	2	67	0,642	0,467	0,356	0,108	0,270	255, 257
MCW0165	3	67	0,388	0,366	0,322	0,066	0,290	112, 114, 116
MCW0078	3	67	0,403	0,344	0,300	0,058	0,265	135, 139, 143
MCW0216	2	66	0,121	0,354	0,290	0,062	0,230	143, 145
MCW0123	3	67	0,313	0,319	0,287	0,050	0,265	88, 90, 92
MCW0183	2	70	0,257	0,035	0,257	0,046	0,209	294, 296
MCW0295	4	65	0,215	0,249	0,231	0,031	0,221	87, 90, 95, 99
MCW0069	2	66	0,106	0,128	0,119	0,008	0,108	156, 162
MCW0248	2	67	0,015	0,072	0,069	0,003	0,066	216, 218
MCW0014	1	70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	180
Resumen	2,94	86,55%		0,426	0,377	0,9029	0,9997	

AUTORES:

Amparo Grimal Molina
María Pilar Viudes de Castro
José Salvador Vicente Antón
Ernesto Ángel Gómez Blasco