

ESTUDIO ECOTIPICO DE LA OVEJA DE RAZA CHURRA MEDIANTE POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS

Por M.^a D. Torres,
F. San Primitivo y
J. A. Carriedo

INTRODUCCION

Desde hace algún tiempo, se vienen empleando los polimorfismos bioquímicos para resolver problemas taxonómicos, en distintas especies animales.

En Tierra de Campos, se han encontrado dos tipos de ovejas de raza Churra que presentan diferencias entre sí, tanto desde el punto de vista fenotípico, como productivo.

Pensando que estas diferencias pueden ser debidas a la existencia de ecotipos diferentes o a la acción de la selección, con distinto signo en ambos grupos de animales, hemos planteado la siguiente experiencia con el objeto de intentar hallar diferencias entre estos grupos de rebaños respecto a los polimorfismos transferrina y hemoglobina, así como para poner a punto una serie de técnicas tanto laboratoriales como estadísticas.

MATERIAL Y METODOS

Los animales experimentales pertenecían a seis rebaños diferentes, de distinta procedencia, que se distribuyeron en dos grupos.

El grupo 1 estaba constituido por tres rebaños (R_1 , R_2 y R_3), procedentes de la zona de Valderas (León), que presentaban las siguientes características generales:

- a) Ninguno inscrito en el libro genealógico de la raza.
- b) Sistema de explotación de tipo extensivo.
- c) Sin controles de rendimientos.
- d) Sometidos a cruzamientos con otras razas, y
- e) Número de animales próximos a 200.

El rebaño R_1 , es el más parecido al estandar racial oficial, con gran homogeneidad fenotípica en todos sus animales. No ha sido sometido a cruces inter-raciales de ningún tipo, al menos en los últimos años. Las ovejas de este rebaño son relativamente grandes, con un peso medio próximo a los 65 Kg.

El rebaño R_2 , está formado por animales más alejados del estandar racial oficial. Hace algunos años, se introdujo un pequeño número de ovejas cruzadas con raza manchega, que aún perdura, aunque tiende a desaparecer. La homogeneidad es menor que en el R_1 , así como las ovejas algo más pequeñas, con un peso medio de 60 Kg aproximadamente.

El rebaño R_3 , constituido por las ovejas más alejadas del estándar racial oficial, comparando los tres rebaños en conjunto. En él, se aprecia una pequeña influencia de Churro portugués, y en menor grado, de Sardo, ambos tendientes a desaparecer mediante cruces de absorción, con sementales de raza Churra. El peso medio es semejante al de los animales del R_2 .

El grupo 2, formado por los rebaños R_4 , R_5 y R_6 , mostraba las siguientes características generales:

- a) Todos los animales inscritos en el libro genealógico de la raza.
- b) Rebaños sometidos a controles periódicos de producción.
- c) No sometidos a cruzamientos con otras razas.
- d) En ellos se ha llevado a cabo un rústico plan de mejora, y
- e) Rebaños de explotación industrial, con unas mil cabezas cada uno.

El rebaño R_4 , pertenece a la Diputación Provincial de Palencia. Se explota en régimen de estabulación permanente. Está formado por ovejas grandes, con peso medio próximo a los 70 Kg muy homogéneas en cuanto a su fenotipo.

El rebaño R_5 , formado por ovejas más pequeñas que las anteriores. Se explota en régimen de semiestabulación. Su producción lechera es alta, aunque su estándar racial se aparta ligeramente del que presenta el R_4 .

El rebaño R_6 , lo integran ovejas muy semejantes a las anteriores. Se explota de idéntica forma, en una finca común, aunque permanecen continuamente separados.

En cuanto a los métodos generales, sólo citaremos la recogida de las muestras de sangre, que se ha realizado mediante punción en vena yugular, utilizando trócares marca Venex. El anticoagulante empleado, fue la heparina angiotrófica. Todas las tomas de muestras se realizaron por la mañana, con los animales en ayunas.

Posteriormente, las células sanguíneas fueron sometidas al proceso de lavado descrito por SAN PRIMITIVO⁵ y, a continuación se provocaba la hemólisis.

Por lo que se refiere a los métodos estadísticos, creemos necesario justificar la utilización de la situación binomial y multinomial a nuestros datos.

Al efectuar contrastes sobre la diferencia entre los parámetros de dos

distribuciones binomiales, los dos supuestos imprescindibles para aplicar el estadígrafo de contraste $Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{P_1(1 - P_1)}{N_1} + \frac{P_2(1 - P_2)}{N_2}}}$

1.^a Que exista una aproximación normal típica.

2.^a Que el muestreo sea independiente⁴.

Trataremos de explicar que ambos supuestos se cumplen en nuestro caso.

Si N es grande y ni p ni q están muy próximos a cero, la distribución binomial puede aproximarse estrechamente a la distribución normal. En la práctica, la aproximación es muy buena si $N \cdot p$ y $N \cdot q$ son superiores a 5 (3).

En nuestro caso, teniendo en cuenta las frecuencias génicas más pequeñas y el número de elementos —que será el doble del número de animales—, se cumple la condición indicada anteriormente y por lo tanto podemos aceptar que nuestras poblaciones se aproximan estrechamente a una distribución normal.

La determinación cualitativa que hemos realizado de las hemoglobinas y las transferrinas (gobernadas por alelos codominantes) nos permite obtener directamente el genotipo de cada uno de los individuos analizados. A partir de los genotipos, podemos obtener las frecuencias genotípicas y, a partir de éstas, las frecuencias génicas. Una vez obtenidas estas últimas, tenemos una situación binomial típica.

En estos casos, para que el muestreo sea independiente, únicamente es necesario que la población se encuentre en equilibrio Hardy-Weinberg. Si se cumple este equilibrio, la probabilidad de encontrar uno de los dos alelos en un determinado *locus*, es la frecuencia génica de ese alelo, probabilidad que es independiente del alelo que ocupe el *locus* homólogo.

Cumplidos los dos supuestos, podrá aplicarse correctamente el estadígrafo de contraste anteriormente mencionado.

La situación multinomial se presenta cuando tenemos más de dos alternativas respecto a un carácter. Este es el caso de las transferrinas, en las que hemos identificado cinco tipos o alelos diferentes.

La inclusión de una serie de variables que no constituyan una situación multinomial, requiere la utilización del análisis multivariante.

Como hemos agrupado los rebaños en dos grupos, debemos aplicar la función discriminante de FISHER para dos grupos².

Los cálculos se han realizado siguiendo a DAVIES¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las frecuencias génicas calculadas para la hemoglobina, hemos hallado las frecuencias genotípicas esperadas, con objeto de realizar la prueba del «*ji cuadrado*» de equilibrio, ya que para posteriores análisis estadísticos es

importante conocer si las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

En la Tabla II presentamos las frecuencias genotípicas, tanto esperadas como observadas, así como los valores del «*ji cuadrado*». Estos valores son pequeños en todos los rebaños, por lo que podemos considerar, con las restricciones pertinentes, que los seis rebaños se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg para este polimorfismo.

Por lo que se refiere a las transferrinas, en la Tabla III presentamos los genotipos identificados mediante pruebas electroforéticas, para cada rebaño y grupo. En la Tabla IV se señalan las frecuencias génicas de cada tipo de transferrina para cada uno de los rebaños estudiados. En ella, al aparecer 15 genotipos diferentes, la difusión de las frecuencias es muy alta y existen pocos animales por cada genotipo. Al calcular el número de animales esperados para cada genotipo, observamos más de un 20 % cuya cifra no llega a 5, por lo que no es aconsejable realizar con garantías el «*ji cuadrado*» de equilibrio. No obstante, lo hemos calculado, resultando valores no significativos a un nivel del 5 %, por lo que, con muchas más restricciones que en el caso anterior, podemos admitir que los rebaños se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg para este polimorfismo.

De la observación de las Tablas I y IV, obtendremos alguna idea de las diferencias que pueden existir entre los dos grupos de rebaños estudiados. Así, en la Tabla I se observa que la frecuencia génica para la Hb es sensiblemente más alta en los rebaños del grupo 1 que en los del grupo 2. De la misma forma, según los datos de la Tabla IV, la frecuencia génica para la transferrina A es más alta en los rebaños del grupo 1 que en los del grupo 2. La tendencia opuesta, aunque menos acusada, se observa en cuanto a las frecuencias génicas para la Tf^B.

La Tf^C presenta más variabilidad en sus frecuencias génicas, aunque es más alta en el grupo 1 que en el 2. Lo mismo ocurre para las Tf^D y Tf^E, notándose una ausencia total de esta última en el R₂.

La pauta que hemos seguido respecto al tratamiento estadístico de los datos, es la siguiente:

- a) Realizar tablas de contingencia para transferrinas y hemoglobinas, y así observar donde existen diferencias significativas entre ambos grupos de rebaños.
- b) Realizar las mismas tablas de contingencia para las transferrinas A y C, ya que la observación de la Tabla IV nos hace pensar en una diferente influencia de cada tipo.
- c) Una vez identificados los tipos que diferencian significativamente ambos grupos de rebaños, realizar el cálculo de la T² de Hotelling, obtener la D² de Mahalanobis (distancia genética entre dos grupos) y el estadígrafo F que nos permita observar si la diferencia entre ambos grupos de rebaños es significativa a un nivel del 5 %.

Con este fin, hemos realizado las correspondientes tablas de contingencia que comentamos a continuación.

Tabla V. Presentamos en esta tabla los valores calculados de «*ji cuadrado*» para la Hb, así como el grado de significación mediante asteriscos. Un asterisco corresponde a una P menor del 5 %; dos asteriscos a una P menor del 1 %, y tres asteriscos a una P menor del 0,1 %.

Es interesante observar, que teniendo en cuenta estos datos, no existen diferencias significativas entre los rebaños del mismo grupo, mientras que al comparar que pertenecen a grupos distintos sí existen diferencias significativas en todos los casos, salvo en la comparación entre los rebaños R₂ y R₆. De todas formas, la tendencia general es a diferenciar, casi a la perfección, los dos grupos de rebaños, por lo que creemos que debemos incluir la Hb como marcador de diferencias entre ambos grupos.

Tabla VI. En ella, aparecen los valores de «*ji cuadrado*» y los niveles de significación para la Tf^A. En estos cálculos, hemos pasado de un sistema de alelos múltiples a un sistema de dos alelos, uno de los cuales será, la Tf^A y el otro, el conjunto de los cuatro alelos restantes (Tf^B, Tf^C, Tf^D y Tf^E).

En esta tabla se observa la ausencia de diferencias significativas entre los rebaños que constituyen un mismo grupo, sin embargo, existen dichas diferencias al comparar los rebaños de ambos grupos entre sí, excepción hecha de la comparación entre el R₁ y los tres rebaños del grupo 2. Esta discordancia aparente con lo que cabría esperar, está hasta cierto punto explicada, si tenemos en cuenta la descripción de los rebaños.

En consecuencia, creemos que la Tf^A puede servir como marcador para diferenciar los dos posibles ecotipos de oveja Churra que mantenemos en estudio.

Tabla VII. En esta tabla, se señalan los valores y significación del «*ji cuadrado*» de contingencia para la Tf^C. Es interesante la analogía entre esta tabla y la perteneciente a la Tf^A. Se observa, que no existen diferencias significativas entre los rebaños del grupo 2. Sin embargo, sí existen dichas diferencias entre el R₁ y los otros rebaños del grupo 1, mientras que no existen entre el R₁ y los rebaños del grupo 2.

Como conclusión, creemos interesante incluir la Tf^C como marcador a efectos de análisis estadísticos posteriores.

Tanto la tabla de contingencia que incluye a todas las transferrinas, como las correspondientes a las Tf^B, Tf^D y Tf^E, no han mostrado tendencia a diferenciar los dos grupos de rebaños entre sí, por lo cual no las incluimos en el estudio posterior. Sin embargo, hemos de tener en cuenta esta circunstancia que puede indicar variación solamente en algunos tipos de transferrina y no en otros.

Como consecuencia de la aplicación de las tablas de contingencia a los dos polimorfismos estudiados, hemoglobinas y transferrinas, podemos señalar

a la primera y a las transferrinas A y C como parámetros de posible utilidad para la separación de estos dos grupos de rebaños y, en definitiva, para identificar los dos posibles ecotipos.

Con este propósito hemos utilizado el análisis multivariante como método estadístico.

En principio nos interesa saber si existen diferencias significativas entre ambos grupos, para lo cual hemos hallado el valor del estadígrafo T^2 de Hotelling y mediante la prueba F determinado su significación:

$$T^2 \text{ de Hotelling} = 57,62$$

$$F \text{ de Senedecor} = 38,41$$

Grados de libertad: numerador = 6; denominador = 9.

$$0,05 > P > 0,001$$

Al obtener diferencias significativas en el anterior análisis, podemos deducir que ambos grupos pueden diferenciarse perfectamente mediante las frecuencias génicas de la hemoglobina y de las transferrinas A y C.

Esto podría indicar que ambos grupos de rebaños pertenecen a ecotipos diferentes dentro de la raza Churra.

El paso siguiente sería la aplicación de la función discriminante para dos grupos o función discriminante de FISHER, con lo que se obtendrían los coeficientes discriminantes, los puntos discriminantes de cada elemento (rebaño) y la distancia generalizada o distancia genética entre los dos grupos de rebaños (ecotipos) o D^2 de Mahalanobis.

Los puntos discriminantes son los siguientes: $R_1 = 97,98$; $R_2 = 100,86$; $R_3 = 104,94$; $R_4 = 36,95$; $R_5 = 36,85$; $R_6 = 57,08$.

La distancia generalizada se ha calculado por diferencias entre las medias de ambos grupos:

Como quiera que la función discriminante de FISHER para dos grupos consta de un solo eje discriminante, los puntos discriminantes y la distancia generalizada son susceptibles de representación sobre una línea recta.

En la figura número 1, representamos sobre una recta los puntos discriminantes y las distancias medias para cada grupo. La distancia entre ambas medias es igual a la distancia generalizada.

De esta figura podemos obtener la idea de la variación que existe dentro de los rebaños del mismo grupo. En nuestro caso, los rebaños del grupo 1 parecen presentar menor variación interna que los del grupo 2, en el cual, el R_6 se aleja de los otros dos.

Por otra parte, se puede tener una apreciación de la situación de todos los rebaños, de la separación entre los dos grupos, así como de los rebaños más próximos o más alejados entre sí. Así, vemos cómo el R_1 es el rebaño más próximo a los del grupo 2, y el R_6 es el que más se separa de los de su grupo y el más parecido a los del grupo 1.

FIGURA n°1

Representación de los grupos discriminantes de cada rebaño y la distancia generalizada.



RESULTADO DEL ANALISIS DISCRIMINANTE PARA DOS GRUPOS CON LAS VARIABLES:

$$Hb^A, Tf^A \text{ y } Tf^C \quad (T^2 \text{ de Hotelling} = 57,62) \quad (F = 38,41^*)$$

RESUMEN

Se han obtenido muestras de sangre de seis rebaños de raza Churra; tres procedentes de los alrededores de Palencia y otros tres de la zona de Valderas (León), con objeto de determinar las frecuencias génicas para los *loci* hemoglobinas y transferrinas, previa puesta a punto de las técnicas correspondientes.

Con estas frecuencias génicas como base, se ha realizado un tratamiento estadístico destinado a obtener las diferencias existentes entre ambos grupos de rebaños y su grado de significación. Hemos calculado la T^2 de Hotelling y la distancia generalizada entre ambos grupos, así como los puntos discriminantes.

Se han obtenido diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la Hb^A , Tf^A y Tf^C , obteniéndose una T^2 de Hotelling de 57,62 que resulta significativa a un nivel del 0,05.

Como conclusión, creemos que ambos grupos constituyen ecotipos diferentes dentro de la raza Churra.

SUMMARY

A study of the haemoglobins and transferrins of 6 sheep flocks of the Churra breed was carried out. Three flocks were grazing near Palencia and the remaining animals in the Valderas area (León).

Statistical analysis was made in order to know the possible existence of differences between the two groups of animals and the significance of these differences.

There is a significant difference between these two groups of animals in

Hb^A, Tf^A and Tf^C. The Hotelling's T² was 57.62, which is significant at a 0.05 level.

As a result, this investigation shows that these animals coming from different parts of Northern Spain (Palencia and Valderas, León), are in fact different ecotypes of the Churra breed.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DAVIES, R. G. (1971).-*Computer programming in quantitative Biology*. Academic Press, London, pp. 284-291.
- 2) FISHER, R. A. (1935).-The use of multiple measurements in taxonomic problems. En: ATCHLEY, W. R. & BRYANT, E. H. (Edit.). *Multivariate statistical methods*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. 1975, pp. 114-123.
- 3) MURRAY, R. S. (1970).-*Estadística*. McGraw-Hill Book Co., México, pp. 124.
- 4) REMINGTON, R. D. y SCHORK, M. A. (1974). *Estadística Biométrica y Sanitaria*. Ed. Presentice-Hall International, pp. 197.
- 5) SAN PRIMITIVO, F. (1975).-Obtención de sueros reactivos en la determinación de grupos sanguíneos y su aplicación con los polimorfismos bioquímicos al estudio inmunogenético de la oveja Churra. *An. Fac. Vet. León*, **22** (2): 525-565.

TABLA I
Genotipos observados, frecuencias genotípicas y frecuencias génicas para la hemoglobina en cada rebaño y grupo

	AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B
R ₁	2	11	31	0,05	0,25	0,70	0,151	0,848
R ₂	-	10	52	0,0	0,27	0,73	0,133	0,866
R ₃	2	21	48	0,03	0,30	0,68	0,176	0,823
G ₁	4	51	131	0,02	0,27	0,70	0,158	0,841
R ₄	-	6	63	0,0	0,09	0,91	0,043	0,957
R ₅	-	5	68	-	0,07	0,93	0,034	0,965
R ₆	-	19	104	-	0,15	0,85	0,077	0,922
G ₂	-	30	235	-	0,11	0,89	0,057	0,943

TABLA II
Frecuencias genotípicas observadas y esperadas, y valores del «ji cuadrado» de equilibrio para la hemoglobina en cada rebaño y grupo

	AA	AB	BB	AA	AB	BB	X ²
R ₁	2	11	31	1	11,27	31,64	1,02
R ₂	-	19	52	1,26	16,36	53,25	1,72
R ₃	2	21	48	2,2	20,57	48,09	0,03
G ₁	4	51	131	4,64	49,43	131,55	0,14
R ₄	-	6	63	0,13	5,68	63,19	0,15
R ₅	-	5	68	0,08	3,38	67,98	0,86
R ₆	-	19	104	0,73	17,46	104,56	0,87
G ₂	-	30	235	0,86	28,49	235,65	0,94
TOTAL	4	81	366	4,33	79,64	366,12	0,05

TABLA III
Genotipos observados para la transferrina en cada rebaño y grupo

	R ₁	R ₂	R ₃	G ₁	R ₄	R ₅	R ₆	G ₂
AA	1	3	4	8	0	0	2	2
AB	4	13	10	27	6	8	11	25
AC	1	7	5	13	1	0	2	3
AD	4	7	5	16	6	0	4	10
AE	1	0	1	2	0	7	11	18
BB	4	4	8	16	11	16	23	50
BC	0	13	10	23	8	5	13	26
BD	8	9	9	26	16	9	12	37
BE	2	0	1	3	6	16	23	45
CC	0	2	2	4	1	0	3	4
CD	2	11	8	21	6	0	2	8
CE	0	0	2	2	0	8	2	10
DD	3	2	3	8	3	0	6	9
DE	2	0	1	3	7	2	7	16
EE	0	0	1	1	0	5	2	7

TABLA IV
Frecuencias génicas para la transferrina en cada rebaño y grupo

	R ₁	R ₂	R ₃	G ₁	R ₄	R ₅	R ₆	G ₂
Tf	0,18750	0,23239	0,20714	0,21387	0,09155	0,09868	0,13008	0,11111
Tf	0,34375	0,30282	0,32857	0,32081	0,40845	0,46053	0,42683	0,43148
Tf	0,04688	0,24648	0,20714	0,19364	0,11972	0,08553	0,10163	0,10185
Tf	0,34375	0,21831	0,20714	0,23699	0,28873	0,07237	0,15041	0,16481
Tf	0,07813	0,0	0,05	0,03468	0,09155	0,28289	0,19106	0,19074

TABLA V
Valores y significación del «ji cuadrado» de contingencia para la Hemoglobina

R ₂	0,58				
R ₃	0,01	0,97			
R ₄	10,77**	7,41**	13,07***		
R ₅	13,03***	9,34**	15,52***	0,13	
R ₆	6,17*	3,27	8,88**	1,83	
				2,95	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅

* 0,05 > P > 0,01
** 0,01 > P > 0,001
*** 0,005 > P >

TABLA VI
Valores y significación del «ji cuadrado» de contingencia para la Tf^A

R ₂	0,52				
R ₃	0,11	0,26			
R ₄	3,82	10,38**	7,42**		
R ₅	3,25	9,61**	6,7**	0,04	
R ₆	1,38	6,77**	3,98**	1,30	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅

TABLA VII
Valores y significación del «ji cuadrado» de contingencia para la Tf^C

R ₂	11,68***				
R ₃	8,52**	0,62			
R ₄	2,67	7,63**	3,95*		
R ₅	0,72	15,33***	9,93**	1,37	
R ₆	1,86	14,46***	8,26**	0,3	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅