

Revisión:

Uso del método RAPD en la detección de polimorfismos genéticos en ovinos

Review:

Use of RAPD method for detecting genetic polymorphisms in sheeps

A. Roldán Roldán¹, J.M. Berruecos Villalobos²,
R. Arredondo-Peter³ y J. Valencia Méndez¹

¹Departamentos de Reproducción, ²Genética y Estadística. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U. Del. Coyoacán, Distrito Federal, C.P. 04510. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del estado de Morelos, México.

Resumen

El uso de marcadores moleculares ha adquirido especial relevancia debido a la necesidad de conocer los genes involucrados en la regulación de las características zootécnicas de interés y el grado de asociación genética entre las especies animales productivas. El método de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), se basa en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de iniciadores con secuencia arbitraria de nucleótidos para la amplificación de regiones genómicas que pueden servir como marcadores genéticos. El RAPD no necesita de grandes cantidades de ADN, ni de un previo conocimiento genético de las especies a estudiar y permite el análisis de una gran cantidad de individuos ya que es simple, rápido y de bajo costo, motivos por los cuales, en el ovino 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 y para estudiar las relaciones genéticas entre distintas razas ovinas de diferentes regiones geográficas. Su aplicación ha dado buenos resultados por lo que la técnica de RAPD representa una buena opción en la búsqueda de algún marcador molecular que permita identificar en las ovejas marcadores moleculares de ca-

racterísticas con importancia económica como la resistencia a parásitos, la precocidad sexual o la baja estacionalidad reproductiva. El objetivo de la presente revisión es describir las características y usos del método RAPD en la especie ovina.

Palabras clave: RAPD, ovinos, polimorfismos, marcadores genéticos.

Abstract

The use of genetic markers is relevance in the animal production and in establishing genetic relationships among livestock species because these provide information about genes involved in economically important traits. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) method utilizes the polymerase chain reaction (PCR) and oligonucleotide primers of arbitrary sequence to amplify genomic regions that might be useful as genetic markers. The RAPD method requires a low quantity of template DNA and no knowledge of the genome sequence is needed. Also this method is simple, fast and of low cost, and thus permits to analyze a high number of individuals. In sheep, RAPD method has been used to identify this specie, estimate genetic relatedness among ovine and other species and analyze genetic relationships between breeds of different geographic locations. The RAPD method is a promising option for searching molecular markers of economic important traits in sheep production, such as resistance to parasites, sexual precocity and non-seasonal reproduction. The aim of this review is to describe the characteristics and uses of RAPD markers in sheep.

Key words: RAPD, sheep, polymorphisms, genetic markers.

Introducción

El estudio de la variabilidad y la relación genética en especies de producción animal ha tenido un gran impacto, debido a su aplicación en programas reproductivos y de selección genética. En un principio la selección e identificación de animales se basaba en la observación de características fenotípicas de importancia productiva, sin tener conocimiento de las bases genéticas que la controlaban, de esta forma se llevó a cabo el mejoramiento de características genéticas de importancia económica en diferentes especies productivas (Marle-Köster y Nel, 2003). Por otro

Introduction

The study of the variability and the genetic relation in species of animal production has had a great impact, due to its application in reproductive programs and genetic selection. At the beginning, the selection and identification of animals is based on the observation of phenotypical traits with productive importance, without knowing the genetic foundations, thus, the improvement of genetic characteristics with economic importance were carried out in different productive species (Marle-Köster and Nel, 2003). On the other hand, one of the main objectives in the

lado, uno de los objetivos principales en los programas de conservación de razas endémicas, es el estudio de la diferenciación de poblaciones dentro de las especies (Kantannen *et al.*, 2005). Debido a esto, ha surgido la necesidad de entender cómo se relacionan genéticamente las razas de una determinada región y de conocer cuáles fueron los ancestros de estas, ya que algunos sistemas reproductivos han llevado a la cruce de razas endémicas con razas comerciales con el fin de mejorar los sistemas productivos, hecho que ha llevado a la extinción o encaste de algunas razas, perdiéndose material genético adaptado a las condiciones locales (Kunene *et al.*, 2009). Otra área importante de estudio, es la caracterización a nivel genético de los individuos con mayores cualidades productivas, con el fin de identificar los genes involucrados en la regulación de estas características. Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, mediante el uso de marcadores moleculares, se ha dado un empuje importante en la identificación genética entre las distintas especies, las distintas razas y entre los individuos pertenecientes a una misma raza con características productivas o adaptativas superiores. El método de ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD) ha sido una de las técnicas moleculares utilizadas para estos fines en las especies zootécnicas, debido tanto a sus características como a los resultados obtenidos, motivos por lo que se realiza una breve descripción de este método en ovinos.

preservation programs of endemic breeds is the study in the differentiation of populations inside the species (Kantannen *et al.*, 2005). Because of the latter, there is the need of understanding how breeds relate genetically in a determine region, and to know which were their ancestors, since some reproductive systems have carried out endemic breeding crosses with commercial breeds, with the aim of improving the productive systems, fact that has caused the extinction of some breeds, losing the genetic material adapted to the local conditions (Kunene *et al.*, 2009). Another important area under research is the genetic characterization of the individuals with higher productive qualities, with the aim of identifying the genes involved in the regulation of these traits.

With the development of the molecular biology techniques through the molecular markers, there is an important boost in the genetic identification among the different species, different breeds and among the individuals belonging to the same breed with productive characteristics or adapted. The Random Amplified Polymorphic DNA method (RAPD) has been one of the molecular techniques used for these purposes in the zootechnics species, for both the characteristics and the results obtained; for this reason, a brief description of this method in sheep is done.

Molecular markers

Loci (position of the genes throughout a chromosome; plural of

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 (Rioset *al.*, 2009).

Las primeras técnicas que se utilizaron para el análisis genético de las especies zootécnicas mediante marcadores moleculares fueron los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) visualizados por hibridación y los microsatélites (Cushwa y 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. 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), para poder detectarlas con un anticuerpo específico, formando conjugados que emiten fluorescencia y permiten identificar bandas específicas (Rioset *al.*, 2009). Aunque viable, esta técnica es laboriosa, incómoda, cara e incompa-

the Greek locus, place) might be analyzed with molecular techniques and constitute marks, reference dots inside the genome, known as molecular markers. These markers are typical of the DNA that might differentiate two or more individuals and are inherited from one generation to another. Therefore, a molecular marker is a polymorphic DNA marker (with variants) that allows distinguishing the different taxonomic groups, populations, families or individuals (Rios *et al.*, 2009).

The first techniques used for the genetic analysis of the zootechnics species with molecular markers were the polymorphisms in the longitude of the restriction fragments (RFLP), visualized by hybridation and microsatellites (Cushwa and Medrano, 1996). The RFLP technique is based in the obtaining of DNA fragments with different longitude, through the digestion in specific sequences with restriction enzymes; these fragments divide themselves through the electrophoresis. Subsequently, these are transferred to nylon membranes, to be hybridized with a marked probe (sequence DNA fragment used to identify identical sequences), to detect it with an specific antibody, forming conjugates that release fluorescence and allow identifying specific bands (Rios *et al.*, 2009). Even though this technique is viable, it is arduous, uncomfortable, expensive and incompatible to the analytical process required for some applications.

The discovery of the polymerase chain reaction (PCR) —one of the most revolutionary techniques of the molecular biology in the last decades— has allowed

tible con el gran proceso analítico requerido para algunas aplicaciones. El descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-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 micro satélites, una de las sucesoras en el establecimiento de la relación genética entre especies productivas. Los micro satélites 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 micro satélites es que no marcan uniformemente el genoma, los fragmentos son difíciles de clonar y 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 (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, esto se alcanza generalmente a los 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 re-

the development of easier and more effective techniques (Arredondo, 1993). Among these are the microsatellite polymorphisms, one of the successors in the establishment of the genetic relation among productive species. Microsatellites are sequences with 2 to 6 pairs of repeated bases in tandem, which amplify by PCR and present a high polymorphism degree; however, these require of white sequence information in the DNA to design the amplification initiators, since some sequences are more polymorphic in some species than in another, fact that limit their uses. Another difficulty of microsatellites is that these do not mark uniformly the genome; the fragments are difficult to clone and work as dominant markers if used as probes, which reduces the potential information for the geno-typification (Dodgson *et al.*, 1997).

The PCR method is based in three phases (figure 1): i) one that pervert the double genomic DNA chain to form two simple threads to which the initiators can join, this is generally reach at 95°C; ii) another that aligns each of the initiators (generally with a longitude of 18-25 nucleotides and with a sequence based on the sequence information of the mold DNA) to the corresponding mold chain to support the specific region to be amplified, its temperature varies according to the characteristics of the initiator (longitude, GC percentage, T_m) but in general terms must be 5°C under its T_m; iii) and the last extension of 72°C, excellent temperature to obtain an optimum job of the Taq polymerase DNA for the copy synthesis of the mold

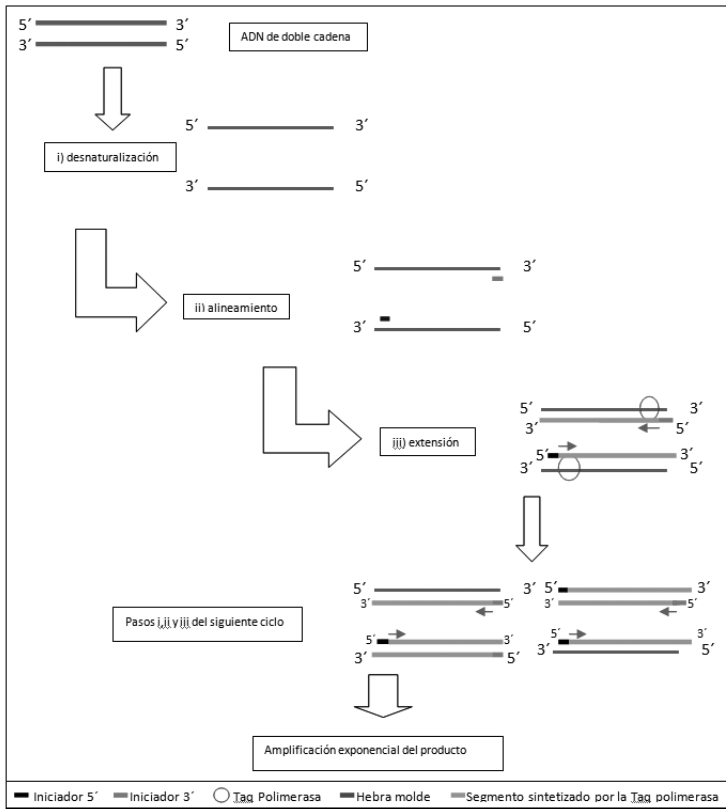


Figura 1. Representación de cada una de las etapas del PCR, para la amplificación de un segmento específico de ADN mediante el uso de iniciadores flanqueadores de la región 5' y 3'.

Figure 1. Representation of each of the PCR phases for the amplification of a specific DNA segment with the use of flanking initiators of the region 5' and 3'.

gión específica que va a ser amplificada, la temperatura de esta varía dependiendo de las características del iniciador (longitud, porcentaje de GC, T_m) pero en términos generales debe ser 5°C por debajo de su T_m ; 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 cade-

chain joined by the initiator. These three phases form a cycle that repeats sequentially 30 to 45 times, to obtain a big number of double chain copies of the DNA fragments. The synthesized product in a cycle allows as mold for the following (Erlich and Arnheim, 1992. Marle-Köster and Nel, 2003).

These fragments are generally visualized through electrophoresis in

na 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 (Erlich y Arnheim, 1992. Marle-Köster y Nel, 2003).

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

RAPD

El método de ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente 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 esta técnica es simple, rápida 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 1991 Caetano-Anollés *et al.* (1991a) publicaron un método similar, motivo por el cual se les atribuye también el desarrollo de esta técnica. Welsh y McClelland (1990) llamaron al método "arbitrarily primer PCR" (AP-PCR) y señalan que

agarose or acrylamide gels, dyed with ethidium or silver bromide.

RAPD

The random amplified polymorphic DNA method proposes the use of randomized initiators to obtain molecular markers in any type of genomes with the PCR technique. It has been widely used for the genetic identification of different species, since this is a simple, fast technique that allows the analysis of a big number of genetic markers, using small quantities of DNA without needing to clone, or sequence or any other way to characterize the genome.

RAPD was created in 1990 by two research teams, one of Welsh and McClelland (1990), and the other of Williams *et al.* (1990); these two teams published simultaneously and in the same journal, their research paper. However, in 1991 Caetano-Anollés *et al.* (1991a) published a similar method, for this reason, is also attributed the development of this technique. Welsh and McClelland (1990) called this method "arbitrarily primer PCR" (AP-PCR), and mentioned that the method is fast and easy, and any type of DNA can be worked easily without any previous knowledge of the molecular biology of microorganisms that will be investigated and can be used to obtain polymorphisms (expressed as bands separated by electrophoresis) that might be use as markers to the genetic map in a wide variety of organisms, using different randomized sequence initiators.

The initiators, of a longitude with approximately 20 pairs of base, might be chosen by standard teams already know; nevertheless, can be used for

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 y 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 se utilicen para otros propósitos, con el objetivo de permitir que los resultados sean comparables entre laboratorios. Los datos obtenidos por este método permiten diferenciar individuos relacionados estrechamente, 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), lo destacan 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, sólo 9 ó 10 nucleótidos de longitud, con una composición entre 50 y

other purposes with the aim of allowing that the results turn out comparable among laboratories. The data obtained by this method allows differentiating closely related individuals, belonging to the same species, for this reason, this method might be useful to work with a big number of individuals inside a population, and can be implemented in reproductive programs, genetic maps, population genetics and epidemiology. Williams *et al.* (1990), named this method as Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), describe this process as simple, based on the amplification of randomized genomic segments of DNA with randomized initiator sequence of nucleotides that produce polymorphic bands that work as genetic markers, which were called RAPD markers. The authors proposed the use of initiators, considering the following restrictions, only 9 to 19 nucleotides of longitude, with a composition from 50 to 80% of Guanine-Cytosine and without palindromic sequences.

Each initiator amplifies by PCR different DNA segments (detected by electrophoresis in agarose gels and tinted with ethidium bromide staining), in many of which appear polymorphisms among the analyzed species. An important fact is that almost all RAPD markers have a dominant trait, since it is not possible to distinguish if a DNA segment has been amplified from a heterozygous locus (1 copy) or homozygous (2 copies).

Meanwhile, the codominant RAPD markers are rarely detected as DNA segments of different size amplified after the same locus. The authors also mention that RAPD

80% de Gunina-Citosina 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 la técnica de RAPD se utilizan cantidades mínimas de ADN a las que se une un solo iniciador de corta longi-

markers might be appropriate for elaborating genetic maps, reproductive applications in plants and animals and to obtain genetic prints, with a particular use in genetic studies of populations.

The third group, integrated by Caetano-Anollés *et al.*, (1991a), called the genetic detection method of microorganisms as DNA Amplification Fingerprinting (DAF) and proposed the use of only one randomized sequence indicator with five longitude bases, which produces a banding that must be visualized through electrophoresis in polyacrylamide gels tinted in silver. This method was efficient to detect variations among humans and soy crop.

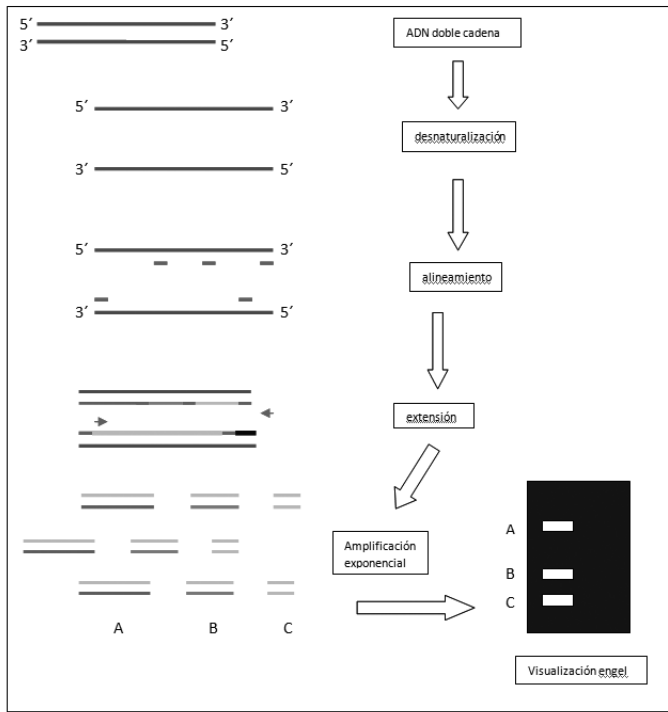
Different to the conventional PCR, in the RAPD technique minimal quantities of DNA are used, with only one short-longitude initiator (5-21 pb) and arbitrary sequence. In the alignment phase, the initiator aligns to the complementary sequence present in the mold DNA, but it is necessary that another initiator with the same arbitrary sequence aligns to the opposed chain in an adequate orientation and distance (the maximum insertion distance among two initiators must be equal or lower to 2.500 pb) to have an amplified fragment (Cushwa and Medrano, 1996) (figure 2). Different authors mention that when using very low alignment temperatures, it is expected that the initiators align in a big quantity of places in the DNA chain, allowing to amplify a big number of fragments (1 to 10 or more) of different loci during the same reaction (Waugh and Powel, 1992. Welsh and McClelland, 1990).

tud (5-21pb) 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 y 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 (Waugh y Powel, 1992. Welsh y McClelland, 1990). 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). 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

The polymorphisms detected might be due to insertions, eliminations or a simple change in a couple of bases, which modify or eliminate the joining place or the initiator; or also to insertions in the genomic sequence that divide the initiator insertion areas at a distance that does not allow the amplification (Enrech, 2000).

Due to its dominant heritage, the RAPD markers are expressed as a presence or absence of an amplified product, translated in a lost of information if compared to codominant heritage markers (RFLP). However, RAPD markers provide a big database, thus, can become more informative on the structure of the populations and the genetic diversity (Enrech, 2000). The number, reproduction and intensity of bands might be affected by some parameters, such as the DNA concentration, alignment temperature, longitude and sequence of the initiator and the salt concentrations. Each identical longitude initiator with different sequence presents a different banding pattern in the same DNA (Welsh and McClelland, 1990). When alignment temperatures are used from those of low astringency (35-50°C) to high astringency (60°C), the banding pattern changes slightly when increasing the temperature, until reaching a point where the temperature is too high as to the initiators might have an effective alignment with the DNA strand, for this reason, it can be concluded that the AP-PCR technique can be used in a wide temperature range, to which can be obtained reproducible bands, and the alignment temperature might be adjusted to different genomes and initiators,



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.

In the RAPD only one initiator with short longitude and arbitrary sequence is used which must be aligned to its complementary sequence in both DNA chains in a distance no higher than 2.500 pb in order to have an amplified fragment. The products might visualize in agarose gels tinted with ethidium bromide for the analysis of the polymorphisms obtained. For the example of the figure, due to the different alignment areas of the initiator in both chains, three double-chain fragments of different longitude are obtained.

Figura 2. Representación de las variaciones del PCR en el método de RAPD.

Figure 2. Representation of the PCR variations in the RAPD method.

intensidad de las bandas puede verse afectado por algunos parámetros tales como la concentración de ADN, la temperatura de alineamiento, la longitud

considering the sequence and longitude (Welsh and McClelland, 1990).

The generated bands can be classified according to their tinting

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 y 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 la técnica 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 y 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 la 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 y 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

intensity (strong, medium, and weak) with ethidium bromide, which can be the result of the amplification specificity (Enrech, 2000). A wide variation in the band intensity has been observed, reproducible among experiments. This variation might be to multiple copies of the amplified region in the mold, or to the efficiency of the amplification of particular areas (Marle-Köster and Nel, 2003).

Since the publication of the RAPD method, one of the main concerns was the possibility of reproducing the results obtained. To guarantee the repeatability of the results, once started a research applying this method, optimum conditions must be established in the two main steps of the process: the extraction and the DNA amplification (Enrech, 2000). In the extraction, the use of well established protocols or commercial kits are important to avoid the use of contaminant substances that would precipitate along to the DNA or to avoid the excessive handle that causes the partial destruction of the DNA. On the other hand, it is important to establish the PCR conditions. Slightly changes in the times and temperatures might cause to drastic modifications, since it is a highly sensitive technique (Dodgson *et al.*, 1997). Likewise, attention must be paid in the optimum concentration of the elements of the PCR solution (polymerase, DNA, initiators, Magnesium), that might cause to the failure of the amplification, all these due to alterations that affect the effective initiator union, thus, the lack in the amplification. For instance, in a research it was found that the highest variation source in the RAPD reaction

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. 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, Magnesio), 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 y 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 ini-

was due to the variability in the commercial preparations of the polymerase DNA *Taq* (Meunier and Grimont, 1993). Once established the optimum amplification conditions, these must remain without variation throughout the experiment.

To confirm that the observed bands correspond to the genomic DNA amplification and not to devices of the initiator; the DNA must be omitted from control reactions on each initiator. The change of only one oligonucleotide in the initiator sequence determines if a specific DNA segment can be amplified, or that the banding pattern be different (Williams *et al.*, 1990). RAPD markers can be proved with RFLP markers already tested in the segregation of individuals, these RAPD markers can be more informative since these align in different regions that might agree to other RFLP markers, cover spaces left by RFLP markers and extend to telomeric regions (Williams *et al.*, 1990).

Some initiators might produce patterns that are not related among animals without genetic association and identical patterns in very close animals. It is believed that the join areas of the initiators are located at random throughout the white genome (genetic sequence of the studied individual) and might flank both the conserved regions as those highly variable (Caetano-Anollés *et al.*, 1991b).

The PCR technique became popular by its apparent simplicity and high reproduction probabilities; unfortunately, due to the need of knowing the DNA sequence, some of

ciador 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 sin asociación genética 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 (secuencia genética del individuo estudiado) 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 la técnica de RAPD, se abrió un nuevo campo para el uso del PCR.

Análisis de resultados

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 se-

its applications turned out limited, but after the use of arbitrary sequence initiators, such as the RAPD technique, it started using again for PCR.

Analysis of the results

The allele is an alternate way of gel. If the gel corresponds to a specific sequence of nucleotides throughout a DNA molecule, the alleles represent the different sequence of nucleotide possible for that specific locus.

The allelic frequency is the concept used to quantify the genetic variation, and is defined as a measure of the presence of an allele in a population; that is, the proportion of all the alleles of that gen in the population that correspond specifically to that type. With a dominant marker only two genotypical classes can be observed: AA+Aa and aa, that is, one of the homozygous confuses to the heterozygous. The gel with the band pattern of a dominant marker for a locus will show that each individual will show one band or any. The bands are registered with 1 if present, or 0 if absent. The calculus of the allelic frequency (p,q) is done like this:

Calculus of the expected frequency according to the Hardy-Weinberg equilibrium:

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

Where:

p^2+2pq = number of individuals present in the allele A (AA+Aa)

q^2 = aa number of individuals present in the allele a

Calculus of the frequency observed:

$$P1+P2=1$$

cuencias de nucleótidos que son posibles para ese locus específico.

La frecuencia alélica es el concepto utilizado para cuantificar la variación genética, 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.

Con un marcador dominante, pueden observarse sólo 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)

$q=$ (P2) y por consecuencia,

$$p+q=1 \text{ y}$$

$$p= (1-q)$$

Mediante el uso del método RAPD no es posible identificar a los indivi-

Where:

$P1= n1/N=$ (number of individuals present in the allele A_)/(total number of individuals)

$P2= n2/N=$ (number of individuals present in allele aa)/(total number of individuals)

$q=$ (P2) consequently,

$$p+q=1 \text{ and}$$

$$p= (1-q)$$

Using the RAPD method, it is not possible to identify the heterozygous individuals, but it is possible to estimate the expected number of heterozygous in a population for a determined locus, using the following formula:

$$2pqN$$

Where:

p, q= is the allelic frequency for a determined locus

N= Total number of individuals

Taken from IPGRI-Cornell University, 2007.

There are different computer programs that allow creating database with the information of the bands obtained from each initiator in all the individuals, to calculate the allelic frequencies for the different locus in the population and among the different sub-populations. Some of these as the POP GENE (1999) program even allow obtaining a dendrogram of the genetic relation among the individuals.

The results can be reported as the band percentage or polymorphic loci, or as the genetic diversity estimated in the population and among the sub-population. The banding patterns obtained can be classified as monomorphic products that allow characterizing the organisms at a specie level, or as polymorphic products

duos 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.

Tomado de IPGRI-Cornell University, 2007.

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 (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 1991b) mediante bandas positivas (presentes solo en esos individuos) y negativas (ausentes solo en esos individuos) (Eman *et al.*, 2008).

El método RAPD fue adoptado desde su publicación debido a su simplicidad y bajo costo, por no requerir marcadores radiactivos, utilizar cantidades mínimas de ADN, proveer una enorme fuente de

to determine the individual identity (Caetano-Anollés *et al.*, 1991a. Caetano-Anollés *et al.*, 1991b) through positive bands (only present in those individuals) and negative (only absent in those individuals) (Eman *et al.*, 2008).

The RAPD method was adopted from its publication due to its simplicity and low cost, by not requiring radioactive markers, using minimal DNA quantities, providing a big database, thus, by being highly informative on the population structure and genetic diversity.

Due to all these characteristics, the RAPD method has been used in a good way to perform the genetic identification of sheep, to differentiate them from other species and to find variations and radical distancing among different geographic areas.

Identification of RAPD markers specific of species

Among the uses of the RAPD technique highlights those of the genetic differentiation of ovine with the different species, mainly to the rest of ruminants (bovines and goat).

In this section, a couple of articles focused in the use of specific RAPD markers for the identification of different productive animal species, among those are the ovine.

Kantanen *et al.* (2005) worked with RAPD markers to detect variations among bovines and ovine, for this, 5 native breeds of Finland cows were used (108 individuals) and 15 Finn sheep with white and gray color. In the case of bovines, 57 oligonucleotides were tested, out of which 11 only amplified bands; meanwhile, in the ovines out of the 40

datos y por lo tanto, ser 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 de la técnica RAPD destacan los encaminados a la diferenciación genética de los ovinos con las distintas especies zootécnicas, principalmente con el resto de los rumiantes (bovinos y caprinos).

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

Kantanen *et al.* (2005) trabajaron con marcadores RAPD para detectar variaciones entre bovinos y ovinos, para esto utilizaron 5 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 sólo 11 amplificaron bandas, mientras que para los ovinos, de 40 oligonucleótidos probados, sólo 13 lograron amplificar. Encontraron que 2 de 10 fragmentos mostraron homología entre las dos especies y que 3 marcadores eran específicos para bovino y 7 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.

oligonucleotides tested 13 amplified. They found that 2 of 10 fragments showed homology among the two species, and 3 markers were specific for bovine and 7 for ovine. The authors also mention that there is a high genetic distancing degree among these two species and a high homogeneity degree in the ovine paddock, thing that do not happen in the bovines as indicated by the blood tests and proteins.

In a RAPD analysis, Joshi *et al.* (1998) used arbitrary initiators in different animal species, sheep, goat, bovine, buffalo and dog. They used 3 oligonucleotides (10 pb) with two PCR programs, one with low astringency and the other with high astringency, and observed that when increasing the alignment temperature during the initial phase of the cycle, the number of bands decreases, but these are more specific for the identification. The authors also found unique individuals profiles for each species, in terms of number and position of bands. This study shows that this technique is highly sensitive and that light changes allow eliminating unspecific bands, and only remain with those that provide accurate information of the variations in the sequences.

Appa Rao *et al.* (1996) detected the RAPD specific of the species in farm animals, working with 5 species: sheep, goat, Cebu bovine from India and buffalo. They used 14 initiators (Operon Technologies), which generated 542 RAPD markers, which proves that with few initiators; a lot of information can be obtained. The authors also calculated the similitude coefficient among the bands patterns

En un análisis de RAPD, Joshi *et al.* (1998) usaron iniciadores arbitrarios en diferentes especies animales, oveja, cabra, bovino, búfalo y perro. Utilizaron 3 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, se disminuye el número de bandas, pero estas 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 esta técnica es altamente sensible y que ligeros cambios permiten eliminar bandas inespecíficas y quedarse sólo con aquellas que dan información confiable de las variaciones en las secuencias.

AppaRao *et al.* (1996) hicieron la detección de marcadores RAPD específicos de especie en animales de granja, trabajaron con 5 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.

and the data obtained, proving a low homology coefficient (0.15-0.34) among the different species, due to the great diversity among each. They also found specific markers of each species that can be used for doing the taxonomic identification.

Devrim *et al.* (2007b) in a research done in widely related productive species determined the specific genetic markers of the species by RAPD, working with sheep, goat and bovine samples (20 animals/group). They tested 15 oligonucleotides and only 5 amplified, they analyzed the genetic distance and obtained 39 loci, out of which, 16 were specific of species. The authors also found a genetic identity among the goat and sheep of 0.498, but these two species were genetically distance from bovines 0.87 and 0.77, respectively. From this research is understood that not all the RAPD markers are informative for all the species, but the information provided allows having a clear genetic distinction even in species with a close kinship.

In all these researches, using the RAPD method it is possible to obtain markers that allow identifying and classifying genetically the ovine from other species, but at the same time, the RAPD is useful to establish the genetic homology degree among the individuals belonging to different species through the band number that share. Therefore, it is said that the RAPD method is very efficient for identifying the species, especially those related (Devrim *et al.*, 2007b).

Identification of ovine breeds using RAPD markers

In this section are listed different articles oriented to study the genetic

En un estudio realizado en especies productivas estrechamente relacionadas, Devrim *et al.* (2007b) hicieron la determinación de marcadores genéticos específicos de especie por RAPD, trabajaron con muestras de oveja, cabra y bovino (20 animales/grupo). Probaron 15 oligonucleótidos y sólo 5 amplificaron, analizaron la distancia genética 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 brinda permite hacer una clara distinción genética aún en 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 zootécnicas, 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 enlistan varios artículos orientados a estudiar las

relations among different ovine breeds from different geographic regions, using RAPD markers.

The first studies done to measure the genetic relation degree among breeds of a particular region using the RAPD method was carried out in Chinese and Indian ovine. Gong *et al.* (2002) in China, worked with 7 native breeds and 3 imported, out of 43 oligonucleotides tested only 35 were polymorph. They found that the percentage of polymorphic markers among breeds was of 66.2, with a genetic polymorphism index for each population of 0.91, which indicates a high genetic variation among breeds. In a research carried out in Indian ovine breeds, 4 endemic breeds were used: Marwari, Mandya, red Madras and Muzaffarnagarasi (20 animals per breed).

Six oligonucleotides (Operon Technologies) were tested and amplified bands. An oligonucleotide amplified for the four breeds, and it was found that at least one oligonucleotide was specific for each breed. The genetic distancing in these 4 breeds was very low (0.07-0.19), which indicates a close genetic relation (Kumar *et al.*, 2004). In the previous two researches, is observed that using the RAPD method, it is possible to know how close the individuals are from a region, since the Chinese ovine breeds presented a high genetic variation, those of India kept without important variations, maybe due to the fact that the paddock remained without the introduction of new individuals, but at the same time indicate a high kinship degree.

Rezende *et al.* (2005) studied the genetic variability in Brazilian ovine breeds. The worked with 5 breeds: Santa

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 7 razas nativas y 3 razas importadas, de 43 oligonucleótidos que probaron, sólo 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 4 razas endémicas: Marwari, Mandya, Madrasroja y Muzaffarnagarasi (20 animales por raza). Se probaron 6 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 4 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 presentaron una alta variación genética, las de la India se mantuvieron sin grandes variaciones, debido tal vez a que sus rebaños permanecieron sin la introducción de nuevos individuos, pero que al

Inés and to other that originated this breed, Rabo Largo, Somali, Morada Nova and Bergamasca (238 animals in total). These tested 140 initiators and only 19 amplified polymorphic bands, obtaining 44 loci. It was observed the importance in the selection of initiators tested with success, since the research of Indian ovine (Kumar *et al.*, 2004), 100% of the tested initiators amplified, meanwhile, in the current research only 13.5% of the tested initiators amplified polymorph bands. All the breeds presented specific genetic markers, and a total racial difference of 14.5% was found, this indicated a low genetic distancing degree among this group of Brazilian breeds. The authors reported that Santa Inés was related to Bergamasca in 97% and Rabo Largo with these in 81%.

In Turkish ovine breeds, Elmaci *et al.* (2007) performed a polymorphic DNA analysis with RAPD. They used three Turkish breeds: Kirvircik, Gökceada and Sakiz (108 individuals in total), and tested 15 initiators out of which selected 8 and obtained 82 loci. None bands were found present only in one breed and absent in the others; that is, with these initiators, none positive bands that would work as molecular bands were obtained for the genetic identification of some of the three breeds. The authors also reported a polymorphic loci percentage of 80.4 for Kirvircik, of 78 for Gökceada and 73.1 for Sakiz, and a total genetic diversity of 0.22. When constructing the dendrogram, they found two branches, one with the Kirvircik breed and the other with two breeds Gökceada and Sakiz.

mismo tiempo indica un alto grado de consanguinidad.

Rezende *et al.* (2005) estudiaron la variabilidad genética en razas ovinas brasileñas de pelo. Trabajaron con 5 razas de pelo: la Santa Inés y con las que dieron origen a esta raza, Rabo Largo, Somali, Morada Nova y Bergamasca (238 animales en total). Probaron 140 iniciadores y sólo 19 amplificaron bandas polimórficas, de las cuales obtuvieron 44 *loci*. Aquí se pudo observar la importancia en la selección de iniciadores probados con éxito, ya que en el estudio de ovinos de la India (Kumaret *et al.*, 2004), el 100% de los iniciadores probados amplificaron, mientras que en este estudio sólo 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%, esto indicó un bajo grado de distanciamiento genético entre este grupo de razas brasileñas. Los autores reportan que la Raza Santa Inés estaba 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. Utilizaron tres razas turcas: Kirvircik, Gökceada y Sakiz (108 individuos en total), probaron 15 iniciadores de los cuales, seleccionaron 8 y obtuvieron 82 *loci*. No se encontraron bandas que estuvieran presentes sólo 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

Devrim *et al.* (2007) carried out a research of genetic polymorphism and diversity of ovine breeds from the Northeast of Anatolia. They worked with 91 animals of 4 breeds: Morkaraman, Akkaramann, Tuj and Hemshin, tested 50 initiators and only 12 were polymorphic, amplifying 71 loci, out of which 66 (92.6%) were polymorphic. When performing the dendrogram, they found the division of breeds into two groups, one formed by Akkaramann and the other by Tuj and Hemshin, which has a relation to the geographic origin and distribution of breeds.

In a genetic variation research using RAPD among Egyptian ovine breeds (Eman *et al.*, 2008), 5 breeds were used: Ossimi, Rahmani, Barki, Saidi and Sohagi. 5 initiators were tested, to which 57 bands amplified, out of which 98.2% were polymorphic. It was found that 6 bands were specific from breed and a high (0.83-0.97) genetic similarity among the 5 breeds. When doing the dendrogram it was observed that the breeds divided into 2 groups: one formed by the breeds Ossimi and Rahmani and the other divided in two, Barki and Saidi and Sohagi. When analyzing the last studies, it is important to mention that the RAPD method allows knowing which breeds worked as the base for creating new breeds, and how these have distanced genetically in the time, it has been even tested that the genetic variations depend on the geographic distancing.

Some authors mention that it is possible to combine the genetic and phenol-typical information in a database for its analysis. Kunene *et*

razas. Reportaron 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 4 razas: Morkaraman, Akkaramann, Tuj y Hemshin, probaron 50 iniciadores y sólo 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 tenía relación con el origen geográfico y distribución de estas razas.

En un estudio de la variación genética mediante el uso de RAPD, entre algunas razas ovinas egipcias (Eman *et al.*, 2008), se utilizaron 5 razas: Ossimi, Rahmani, Barki, Saidi y Sohagi. Se probaron 5 iniciadores, con los cuales se amplificaron 57 bandas, de las que 98.2% fueron polimórficas. Se encontró que 6 bandas eran específicas de raza y una alta (0.83-0.97) similitud genética entre las 5 razas. Al realizar el dendrograma observaron que las razas se dividían en 2 grupos: uno formado por las razas Ossimi y Rahmani y el otro se dividía 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

al. (2009) made a research of the genetic and phenol-typical diversity in the population of Zulu sheep. They worked with three populations with a total of 52 Zulu sheep. Also, the authors tested 21 initiators (Operon Technologies) and only 6 produced bands. They obtained 2744 bands, out of which 40% were polymorphic, this data shows that the RAPD initiators are highly informative. The genetic analysis showed a high similarity (88-94%) among the population, values that relate to the phenol-typical data observed. The authors mention the importance of knowing this information and its implication for the exploitation and preservation programs.

Other applications

RAPD method has also been used to identify and map the polymorphic markers in the pedigree of sheep of the "AgResearch International Mapping Flock (IMF)" (Cushwa *et al.*, 1996), for this, sons and daughter of eight brothers registered in the pedigree of IMF were used, and 131 arbitrary sequence initiators of 10 nucleotides of longitude were used. Forty five out of the forty three markers obtained were mapped in the genetic association maps of IMF, among these, 44 RAPD markers were assigned to a specific chromosome, and at least one marker located in 17 out of the 26 autosomes and in both sexual chromosomes. The polymorphisms obtained were tested through the pedigree evaluation and the segregation analysis. The researchers reported that the results obtained show that the RAPD technique is a powerful technique for identifying the polymorphisms that

para la creación de nuevas razas y qué tanto se han distanciado genéticamente estas 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 sólo 6 produjeron bandas. Obtuvieron 2744 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

El método RAPD también ha sido utilizado para identificar y mapear marcadores polimórficos en el pedigrí de las ovejas del “Ag Research 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, se probaron 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 mar-

might be used as markers for the construction of a genetic association map in ovine.

Conclusion

RAPD is a simple and cheap method that allows carrying out the research of identification and genetic relation of the ovine specie, without any need of having previous genetic knowledge. One of the main advantages of this method is that the genetic characterization of the individuals can be done automated.

Using the RAPD method in ovine, it has been able to perform the genetic distinction in the rest of the species, even in though extremely related. This identification has allowed establishing a genetic classification of ovine, and at the same time, studying the genetic distancing degree on all the ruminants.

RAPD allows establishing the genetic association degree in breeds of some regions to know which have kept without any variations in spite of the herd movement in some places, this is important in the establishment of preservation programs, since these individuals adapt to the own environmental conditions of this media. The establishment of RAPD markers in the ovine genome, allows the identification of the loci, with characteristics of economic importance. These RAPD markers might be use to identify animals with quality of zootechnics as the resistant towards parasites, the sexual precocity, and the highest weight gain and the low or null season reproductive activity. An important fact to mention

cadore RAPD fueron asignados a un cromosoma en específico y al menos un marcador se localizó en 17 de los 26 autosomas y en ambos cromosomas sexuales. Los polimorfismos obtenidos fueron comprobados mediante evaluación de pedigrí y análisis de segregación. Los investigadores reportaron que los resultados obtenidos demuestran que la técnica 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.

Conclusión

El RAPD es un método simple y barato que permite realizar el estudio de la identificación y relación genética de la especie ovina sin necesidad de tener un conocimiento genético previo. Una de las principales ventajas de este método es que la caracterización genética de los individuos puede realizarse de una manera automatizada.

Mediante el uso del método RAPD en la especie ovina, se ha podido realizar la distinción genética de ésta del resto de las especies zootécnicas, incluso de aquellas que están estrechamente relacionadas. Esta identificación ha permitido establecer una clasificación genética de los ovinos y al mismo tiempo estudiar el grado de distanciamiento genético sobre todo en los rumiantes.

El RAPD permite establecer el grado de asociación genética en las razas de ciertas regiones, para conocer cuales se han mantenido sin variaciones a pesar del movimiento de rebaños en ciertos lugares, esto es im-

is that the technique provides a lot of genetic information, which must be completed to other techniques for the complete genetic study.

Recommendations

It is possible to reproduce accurate results if there is attention in the key extraction factors and amplification of the DNA. However, these results must be analyzed carefully to have precise interpretations.

Acknowledgement

The authors thank the DGAPA by the finance given to the Project IN-216209 through the Support Program to Projects of Research and Technological Innovation (PAPIIT), UNAM, Mexico.

End of english version

portante en el establecimiento de programas de conservación, ya que estos individuos presentan adaptaciones a las condiciones ambientales propias de ese medio.

El establecimiento de marcadores RAPD en el genoma ovino, permiten la identificación de *loci* con características de importancia económica. Estos marcadores RAPD se podrían usar para identificar animales con cualidades de interés zootécnico como la resistencia a parásitos, la precocidad sexual, la mayor ganancia de peso y la baja o nula actividad reproductiva estacional.

Un hecho importante de mencionar es que la técnica brinda una gran cantidad de información genética, la cual debe ser complementada con otras técnicas para el estudio genético completo.

Recomendaciones

Si se pone atención en los factores clave de extracción y amplificación del ADN, es posible la reproducción de resultados confiables. Sin embargo, estos resultados deben ser analizados de forma cuidadosa para no dar pie a falsas interpretaciones o bien, caer en tendencias parsimoniosas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a DGAPA por el financiamiento otorgado al proyecto IN-216209 a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM, México.

Literatura citada

AppaRao, K., K. Bhat, S. Totey. 1996. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genet Anal: Biomol Eng.* 13:135-138.

Arredondo, R. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: Un impacto reciente en la biología molecular. *BolEducBioq.* 12:3-14.

Bardakci, F. 2001 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol.* 25:185-196.

Caetano-Anollés, G., B. Bassam y P. Gresshoff. 1991a. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primer. *Biotech.* 9:553-557.

Caetano-Anollés, G., B. Bassam y P. Gresshoff. 1991b. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol Bio Rep.* 9:294-307.

Cushwa, W., K. Dodds, A. Crawford y Medrano J. 1996. Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. *Mamm Genome.* 7:580-585.

Cushwa, W. y J. Medrano. 1996. Applications of the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *AnimBiotechnol.* 7:11-31.

Devrim, A., N. Kaya, A. Guven y H. Kocamis. 2007a. A study of genomic polymorphism and diversity in sheep breeds in northeastern Anatolia. *Small Ruminant Res.* 73:291-295.

Devrim, A., N. Kaya, B. Kocer y M. Yildiz. 2007b. Determination of species specific genetic markers in farm animals by using Random Amplified Polymorphic DNA fingerprints. *Indian Vet J.* 84:903-907.

Dodgson, J.B., H. Cheng y R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: A revolution in animal genetics. *Poult Sci.* 76:1108-1114.

Elmaci, C., Y. Oner, S. Ozis y E. Tuncel. 2007. RAPD Analysis of DNA Polymorphism in Turkish Sheep Breeds. *Biochem Genet.* 45:491-496.

Eman, R., E. Othman, M. Soheir y A. Mohamed. 2008. Genetic Variation Between Some Egyptian Sheep Breeds Using RAPD-PCR. *Res J Cell Mol Biol.* 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 Cient Venez.* 51:197-206.

Erlich, H. y N. Arnheim. 1992. Genetic analysis using the Polymerase Chain Reaction. *Annu Rev Genet.* 26:479-506.

Gong, Y., X. Li, Z. Liu y J. Li. 2002. Studies of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of main indigenous sheep

breeds in China. *Yi Chuan*. 24:423-426.

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

Joshi, C., D. Rank, B. Brahmakshtr, A. Patel, P. Vataliya, P. Muraleedharan, V. Khoda yJ. Solanki. 1998. RAPD analysis PCR using arbitrary primers in different animal species. *IndianVet J.* 75:1029-1031.