

EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES EN LA DIFERENCIACIÓN
DE RAZAS CAPRINAS DEL ESTADO DE ZACATECAS, MÉXICO

[USE OF MOLECULAR MARKERS TO DIFFERENTIATE GOAT BREEDS
FROM ZACATECAS, MEXICO]

Luis Roberto Reveles Torres¹, Francisco Echavarría Chairez¹, Rómulo Bañuelos Valenzuela², Homero Salinas Gonzalez³, and Francisco Javier Cabral Arellano⁴.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Zacatecas, km 24.5 Carr. Zacatecas-Fresnillo, Calera de Víctor Rosales, CP, 29000, Zacatecas, México

²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UAZ. Calera de Víctor Rosales, CP 98500, Zacatecas, México.

³INIFAP-Centro regional Norte-Centro, Bulevar José Santos Valdéz 1200 pte. Colonia Centro, CP, 27440, Matamoros Coahuila, México.

⁴Unidad Académica de Biología Experimental. UAZ. Guadalupe, CP 98600, Zacatecas México.

RESUMEN

La cabra blanca Celtibérica es una raza cuya población se ha reducido drásticamente en el mundo y en México, con base en los rasgos fenotípicos reportados en la literatura, se identificó un hato de cabras Celtibéricas en Zacatecas, el cual mantiene rasgos homogéneos propios de la raza. Es importante la conservación de la cabra criolla Celtibérica, debido a la rusticidad y adaptación al medio árido. El objetivo del proyecto fue utilizar tecnologías para el uso de marcadores genéticos para el rescate y la identificación de la cabra criolla Celtibérica en hatos del Estado. Se realizaron cruces entre organismos de la raza Celtibérica (criolla) con razas Nubia, Alpina y Granadina, como medio de comparación; utilizándose machos celtibéricos con hembras de las otras razas, obteniendo 59 crías. Se utilizó el método "mini-prep" vía CTAB probado entre otros cuatro, para extracción de ADN en pelo, biopsia de músculo y tejido sanguíneo, encontrándose mayor calidad y cantidad en esta último. Se diseñaron 20 "primers", de diferentes secuencias nucleotídicas, rastreándolos en bancos de genes para *Capra hircus* con el objeto de generar mayor producción de bandeos polimórficos al realizar combinaciones entre estos con la técnica de RAPDs, para finalmente obtener patrones electroforéticos de las diferentes razas y tener un marcador molecular específico de la raza Celtibérica. Se encontró que la combinación de los primers sentido: 5' aagagtttga 3' y antisentido: 5' tagattgcat 3' determina la diferencia entre el grupo de cabras de raza Celtibérica, y animales de razas granadina, nubia y alpina. Así mismo, utilizando AFLPs se generaron otros patrones polimórficos diferentes, comparando los organismos de raza celtibérica con productos de cruces entre nubia

x celtibérica, alpina x celtibérica y granadina x celtibérica encontrándose agrupaciones que enmarcan las relaciones consanguíneas entre los individuos en estudio y concluyendo que existe una relación mas estrecha de la raza celtibérica con la raza alpina.

Palabras clave: Criolla, Celtiberica, rusticidad, primers, ADN, marcadores moleculares.

SUMMARY

The Celtiberic White goat is a breed whose population has been drastically reduced worldwide. In Mexico, based on the phenotypic characteristics reported in the literature, a flock of Celtiberic goats has been identified in Zacatecas state, which keeps homogeneous characteristics belonging to the breed. It is important the preservation of the Celtiberic goat due to its rusticity and adaptability to arid environments. The objective of the project was to use genetic markers technology for the rescue and identification of the Creole Celtiberic goat in flocks of Zacatecas state. The Celtiberic (Creole) breed was crossed with Nubian, Alpine and Granadine breeds as a way of comparison: using Celtiberic males mated with females of the other breeds, resulting in 59 offspring. The "mini-prep" method via CTAB was used among others for the extraction of DNA in hair, biopsy of muscle and blood. More quality and quantity was found in the biopsy. Through a tracking in gene banks for *Capra hircus*, twenty primers of different nucleotidic sequences were designed. The aim was to generate a major production of polyformic bandings by combinations between these primers with the RAPDs technique, for finally obtain electrophoretic patterns of the different breeds and to get a molecular marker

specific to the Celtiberic breed. It was found that the primers flow 5' aagadttga 3' and comtraflow 5' tagattgcat 3' determine the difference among the group of goats of Celtiberic breed and the goats of the Granadine, Nubian and Alpine breeds. Likewise, using AFLPs technique, comparing animals of the Celtiberic breed with crossbreeds of the Nubian x Celtiberic, alpine x Celtiberic and Granadine x Celtiberic, other different polyformic patterns were generated. It was

INTRODUCCIÓN

En México, se reconoce que desde las épocas coloniales, la ganadería caprina comenzó a explorarse en la región Noroeste del país, quizás por que la población colonizadora surgió de provincias consumidoras de carne de cabra o quizás por su adaptación a los tipos de vegetación predominantes (INEGI, 2002). Vera, (1993), reporta, que en México el ganado caprino fue introducido por los Españoles después de la conquista (1521), con la raza Celtibérica y Castellana de Extremadura caracterizadas estas por su gran adaptabilidad al medio. Así a través de la cruce de distintos tipos y razas Españolas fue como se dio origen a la cabra de origen criollo, por adaptarse a climas áridos y semiáridos del norte de México, como Coahuila, Nuevo León y Zacatecas. Estados donde la vegetación xerofítica es la predominante y el sistema de manejo de las cabras es intensivo, con pastoreo diurno y refugio nocturno.

Los programas genéticos para el mejoramiento del ganado caprino en México, han consistido básicamente en la introducción continua de sementales de raza pura, como Nubia, Alpino, y Granadina, para ser usados sobre las poblaciones de cabras locales "denominadas criollas" con la premisa básica que las razas introducidas "mejoraran" dichas poblaciones. Este uso indiscriminado de reproductores, principalmente sementales, sin una evaluación genética previa en las diferentes regiones del país, ignorando los diferentes sistemas de manejo, la calidad productiva de los genotipos existentes, las diferentes condiciones climatológicas, o las características de adaptación de las poblaciones locales, ocasiona "erosión" genética y pérdida de adaptación a las condiciones ambientales prevalecientes, principalmente de aquellas relacionadas con restricciones severas de alimento, además de que ignora el esfuerzo del productor, realizado a través de décadas de selección empírica, para adaptar y conservar sus genotipos criollos a las condiciones ambientales de su región.

En Zacatecas es común encontrar a una cabra cárnica de color blanco de tipo Celtibérica, la cual se asume que llegó al Estado en el siglo XVI. Debido a la cualidades de rusticidad y adaptación al medio árido

found groupings that enclose the consanguine associations among the individuals under study. It was concluded that a more close relationship among the Celtiberic and the Alpine breeds exist.

Key words: Creole, Celtiberic, rusticity, primers, DNA, molecular markers

de la región que se le atribuyen a dicha raza, es importante la identificación asistida por marcadores moleculares, que garanticen su verdadera identidad genómica ya que con ello, se podrán implementar nuevos proyectos de mejoramiento genético.

El desarrollo en los métodos para la extracción, purificación y análisis de compuestos biológicos, como proteínas o ácidos nucleicos, permite que en la actualidad se simplifique el trabajo analítico, con el uso de equipo adecuado. Así la caracterización tradicional de razas o genotipos, a partir de sus descriptores fenotípicos, se puede complementar con una descripción molecular que permita diferenciar entre aquellos materiales idénticos en su fenotipo. La posibilidad de usar estos marcadores para una cierta característica, requiere de investigación básica con el objeto de determinar la diferenciación molecular entre razas de cabras.

ANTECEDENTES

Hablar de la caprinocultura, nos remite automáticamente a condiciones de vida poco favorables. La relacionamos invariablemente con condiciones de explotación transhumante, con largas jornadas en los campos más secos y con condiciones de pobreza solo encontradas en las zonas áridas de México. En los foros de investigación o desarrollo donde se aborda este tema, se comenta frecuentemente que la explotación caprina es la ganadería de los pobres aunque también se le justifica como la fuente de proteína animal más importante de los habitantes del medio rural en el semidesierto. Se hace referencia a la enorme capacidad de resistencia y producción de la especie, independientemente de que las condiciones de explotación no sean las más favorables.

La cabra es un animal muy rustico que se adapta fácilmente a situaciones pobres del medio ambiente y debido a la relativa facilidad de su explotación y los beneficios que proporcionan, merece ser atendida con la importancia que requiere y no como se le ha dado en la actualidad, con muy poca importancia desde el punto de vista de la investigación científica-tecnológica. La cabra es uno de los animales mas eficientes ecológicamente ya que es capaz de producir en las condiciones mas pobres de vegetación, es un

animal rustico capaz de alimentarse con vegetación espinosa y difícil de pastorear en regiones con grandes limitantes naturales como: clima extremo, con precipitaciones erráticas y mal distribuidas, topografía abrupta y difícil, tierras con drenaje deficiente de baja productividad y por lo tanto no aptas para el cultivo (Quittet, 1990).

La rusticidad se refiere a la capacidad que tiene un animal para soportar condiciones desfavorables, la cabra rara vez requieren de un veterinario, no necesita de cuidado, no da problemas, se adapta y sobrevive en regiones con condiciones severas y muy adversas. Las cabras son animales rústicos capaz de alimentarse casi únicamente con desperdicios y forrajes, su dieta es variada y el peligro de deficiencia alimenticia es menor (Koeslag, 1982).

Características de la raza celtibérica

La raza Caprina Celtibérica es originaria de *Capra Prisca* de Adametz comprende animales de perfil recto y proporciones medias, con capa uniforme de color blanco mate, pelaje corto y fuerte en los machos, la pelambre mas larga en el tercio anterior dura y erguida en la línea dorso lumbar, piel gruesa, cuernos largos y finos, frente plana y estrecha, ojos oblicuos y escondidos, orejas grandes anchas y semicaídas, peso en las hembras de 21-26 Kg y en los machos 28-32 Kg, pezuñas duras y recogidas, tren posterior mas desarrollado que el anterior.

Características de la raza granadina

La murciana granadina es una raza nativa originaria del sureste de España (Murcia, Almería, Granada y Alicante). A pesar de tener el mismo origen, iguales aptitudes y conformación, hasta hace algunos años se les consideraba 2 razas separadas. Gracias a su rusticidad, altos rendimientos y buena producción lechera, diversos países de Latinoamérica, como Brasil, México, Argentina y Venezuela, han introducido esta raza algunos años. Se adapta muy bien a diferentes medios, aunque se desarrollo mejor en climas secos y cálidos y en sistemas de pastoreo, estabulación libre o fija. Tiene una talla pequeña. Tiene colores caoba o negro uniforme; piel fina; pelo corto y un peso promedio en las hembras es de 45 Kg, y machos de 65 a 75 Kg. Por lo general no tiene cuernos pero puede presentarlos, cola corta y eréctil; ubre amplia y voluminosa, con pezones hacia delante y afuera, patas finas y sólidas (Neumann, 2001).

Características de la raza alpina

Es originaria de la zona suiza-francesa, posiblemente sea la raza más vieja. Esta raza se difundió y fue mejorada en los Alpes Franceses, donde adquirió su

nombre "Alpino Francesa". Es la más larga y de mayor clase de las razas suizas. Presenta un cuello esbelto; no tiene papada, ambos sexos son sin cuernos, sin embargo puede presentarse animales con ellos; sus orejas son rectas. Su pelo es corto, su color puede ser bayo claro u oscuro, castaño, agamuzado, negro con blanco y café; las manchas nunca son definidas. Tienen un tamaño de mediano a grande, con un peso promedio de 77 Kg los machos y 57 Kg. Las hembras. La alpina es rustica y se puede adaptar a diferentes climas, manteniendo siempre una buena producción y salud. Se le ubica en segundo lugar en la escala de producción de leche (Neumann, 2001; González, 2001).

Características de la raza Nubia

Esta raza es de origen africano aunque fue desarrollada en Inglaterra como el resultado del cruzamiento entre las cabras de tipo Egipcio, Hindú, Toggenburg y las Inglesas. Los animales de la raza Nubia son rústicos y se adaptan bien a todos los climas y condiciones, no son muy precoces pero después muestran actividad sexual gran parte de año. Esta raza se considera adecuada para una doble explotación de leche y carne. Se caracteriza por orejas largas y colgantes y una nariz tipo romana o curva, su pelo es corto y brillante; generalmente es acorné aunque puede presentar cuernos. Las hembras carecen de barba. Esta raza presenta diferentes colores y combinaciones incluyendo negro, gris, blanco, crema, diferentes tonalidades de café y rojo. Tiene un tamaño de mediano a grande. El peso en la hembra es de 60 Kg y de 80 Kg en el macho (González, 2001).

VARIABILIDAD GENÉTICA

La biodiversidad intraespecífica de la cabra (*Capra hircus*), y con ello la conformación de razas, se debe a la variación de su material genético como el de cualquier otra especie. Desde hace casi un siglo, para estudiar las variaciones entre individuos se utilizan los llamados Polimorfismos Genéticos o Marcadores Genético-Moleculares. Son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie. En general, la característica que debe poseer un buen marcador genético es el tener un patrón de herencia bien establecido.

Hace algunos años los análisis de polimorfismos estaban basados fundamentalmente en el estudio de marcadores genéticos convencionales (antígenos eritrocitarios y leucocitarios, proteínas séricas y enzimas eritrocitarias). En la década de los 80's se consigue un avance espectacular en el campo de la genética a raíz del descubrimiento de las regiones

hipervariables del ADN (Jeffreys, 1985). A partir de este momento, la utilidad de los polimorfismos clásicos va disminuyendo conforme se generaliza el estudio de estos nuevos marcadores, mucho más informativos, debido principalmente a la gran variabilidad y estabilidad química del ADN, así como a la alta sensibilidad de las técnicas que lo analizan.

Los polimorfismos de ADN hipervariables poseen tal capacidad identificadora que son considerados, hoy en día, un instrumento de elección en la identificación de razas en ganado animal. Para adentrarse en el estudio de estos polimorfismos, se tienen que revisar algunos aspectos básicos del ADN.

Estructura y función del ADN

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética del individuo. El conjunto de esta información presente en las células se denomina genoma y, según su localización, podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple.

La cabra doméstica (*Capra hircus*), posee una carga cromosómica, donde el número diploide de cromosomas $2n$, se define como $2n = 60$ (Makino, 1943). En el genoma existen 2 tipos de ADN, según la función biológica que desempeñen:

ADN expresivo (30%). Este tipo de ADN, también llamado codificante, tiene una función conocida, como por ejemplo la expresión de un gen cuyo producto final es una proteína. Soporta gran presión selectiva, lo que se traduce en una variabilidad de regiones limitada.

ADN no codificante (70%). Comprende secuencias de ADN transcripcionalmente inactivas de funciones diversas (como por ejemplo, promotores de genes) y, en otros muchos casos, de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN, por ser altamente polimórfico, tiene un gran interés de cara a la identificación de individuos. Lo podemos clasificar en:

ADN de copia única. Está compuesto por secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma. Se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN.

ADN de copia múltiple. Las secuencias de este tipo de ADN, también denominado ADN Repetitivo, pueden ser altamente repetitivas, moderadamente o poco repetitivas. Podemos clasificarlas en base a sus dos características más importantes: su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición. Se pueden reconocer dos grupos principales:

ADN Repetido en Tándem (10% del genoma). Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas en tándem. Según el tamaño de la unidad de repetición se subdivide en 3 tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsátélite.

ADN Repetitivo Disperso (15-20% del genoma). Las unidades de repetición no se agrupan, sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Esta representado por 2 familias: SINES y LINEs.

MARCADORES MOLECULARES

Un marcador molecular es un sitio en el que aparece heterocigosis para algún tipo de variación neutra del ADN, en donde la variación neutra, es aquella que no esta asociada a ninguna variación fenotípica observable (Yuasa y Umetsu, 2005). Debido a que los marcadores moleculares se detectan muy fácilmente y son muy numerosos en el genoma, su uso permite llenar los huecos entre los genes del fenotipo conocido (Thomas, 2005). Los marcadores de ADN han extendido las aplicaciones de los marcadores genéticos clásicos. Actualmente se utilizan de manera rutinaria las "huellas genéticas" detectadas con marcadores moleculares en casos forenses y de paternidad en humanos, y para clasificación y protección parietal en plantas (Nayak *et al.*, 2005). La posibilidad de producir mapas genéticos esencialmente saturados con marcadores (utilizando las teorías de mapeo genético clásico), ha conducido a la clonación de genes de función bioquímica desconocida debido a su localización con marcadores moleculares. La estrategia radica en encontrar marcadores moleculares fuertemente ligados al gen de interés y que flanquean dicho gen. Esta estrategia ya ha tenido éxito en varios organismos, incluyendo el hombre, plantas y ratones entre otros (Mahmood *et al.*, 2005). Los avances en el uso de los marcadores moleculares y su futuro son prometedores.

Los tres tipos de marcadores moleculares empleados de manera más amplia son:

1. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
2. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), y
3. Polimorfismos en fragmentos amplificados (AFLP).

Para detectar polimorfismos con marcadores moleculares se han usado dos técnicas básicas de biología molecular:

- Hibridización tipo Southern y
- La reacción de polimerización en cadena (PCR).

RFLPs.- Los RFLPs (Polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción) comprenden la extracción, y posteriormente la digestión de ADN genómico con

enzimas de restricción y separado por medio de electroforesis en geles. El patrón de fragmentos es, por así decirlo, la huella dactilar del individuo o raza. La invención de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), he dado lugar a una nueva ola de marcadores de ADN que pueden ser utilizados en la dactiloscopia genética.

RAPDs.- Es un conjunto de fragmentos amplificados de ADN, llamados ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, del inglés randomly amplified polymorphic ADN, y pronunciado “rapid”) y se emplea para caracterizar a un individuo (Figueira *et al.*, 1992). La identificación de los marcadores genéticos RAPD (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) son fragmentos amplificados de ADN genómico usando simples primers de oligonucleótidos de secuencia arbitraria en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1988).

AFLPs.- La metodología recién desarrollada es la de los AFLP, que combina análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción con detección por PCR. La base del polimorfismo de los AFLP es igual que en el caso de los RFLP. En el procedimiento de los AFLP, se corta el ADN genómico con enzimas de restricción como en el caso de los RFLP; sin embargo, en lugar de utilizar una sonda para detectar polimorfismos se usa PCR. Los oligonucleótidos utilizados no son de secuencias al azar, sino específicos para los sitios de restricción. Primero se lleva a cabo una ligación de adaptadores específicos, en los extremos cortados, luego se hace la PCR con oligonucleótidos homólogos a los adaptadores y con una base selectiva. A continuación se hace una segunda PCR con tres bases selectivas. Durante la reacción, en realidad, son los fragmentos de restricción los que son amplificados. El marcaje de uno de los oligonucleótidos con radiactividad permite visualizar las bandas amplificadas después de electroforesis en geles de acrilamida.

POLIMORFISMOS DEL ADN

El término polimorfismo fue empleado por Ford (1940) para designar “la aparición conjunta en un lugar de dos o más formas discontinuas de una especie, de tal manera que la más rara de ellas no se puede mantener simplemente a través de la mutación periódica”. En la práctica, para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más común para ese locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus. En el ADN codificante existe poca variabilidad individual. El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Por

ejemplo, si se producen diferentes formas de una proteína se puede condicionar su función o actividad, bien intrínsecamente, bien por influencia ambiental. El ADN no codificante, por el contrario, al no estar sujeto a presión selectiva intensa, puede soportar generalmente grandes niveles de variabilidad sin que se produzca repercusión fenotípica. Esta característica ha convertido a este tipo de ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos para distinción de razas. Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Pueden dividirse en 2 tipos:

UTILIDAD DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA GANADERÍA

El desarrollo de marcadores moleculares de ADN ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. El análisis del genoma y la creación de mapas genéticos de alta resolución se están desarrollando gran velocidad gracias al uso de estos marcadores. Su potencial radica en su elevado número y en la facilidad de análisis por PCR (Saiki *et al.*, 1988). Uno de los principales objetivos de la investigación en producción animal es la de identificar regiones del genoma de nuestros animales asociadas a caracteres de interés. Suelen ser genes que controlan la expresión de caracteres de importancia económica, o asociados a enfermedades. Muchos de estos caracteres se expresan de forma muy variada y son controlados por un elevado número de genes.

Para identificar regiones de ADN asociadas con un carácter en particular, el método más utilizado es el de usar marcadores distribuidos en el genoma para analizar una población que muestra variación fenotípica para este carácter (referida a una población control). Analizando la asociación de varios alelos segregando en cualquier de los marcadores con el carácter de interés nos permite identificar las regiones de esos genes.

Los marcadores genéticos más utilizados son los basados en clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismo al azar (fingerprint markers) (Dodgson *et al.*, 1997).

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad (Cheng y Crittenden, 1994):

- a) Buena distribución a lo largo del genoma,
- b) Alto grado de polimorfismo
- c) La técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica

d) Debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios

Si el trabajo de investigación se centra en el estudio de una especie en concreto, los marcadores moleculares que presentan alto grado de variabilidad intra específica son las herramientas más útiles para realizar numerosos tipos de análisis en nuestras poblaciones (Dawson *et al.*, 1997).

A continuación menciono las aplicaciones de los marcadores moleculares más utilizados actualmente.

- Identificación individual y relaciones de parentesco
- Evaluación de polimorfismo y estudios de poblacionales
- Mapas genéticos
- Estudios evolutivos

Vaiman y colaboradores (1996) han establecido el primer mapa genético del genoma de cabras, por medio de marcadores microsatélites, los cuales fueron generados y probados por amplificación con ADN de cabras machos, bajo condiciones estandarizadas de PCR. Este trabajo arrojó la construcción de un mapa meiótico cubriendo 2300 cM, que se estima que es menos del 80% de la longitud total del genoma caprino. Con ello, conformaron por comparación, 15 grupos de linaje, concluyendo que 12 secuencias codificadas pueden ser útiles para estudios comparativos entre cabras. Sin embargo, por conclusiones preliminares advierten que entre razas, la diferencia genómica en cabras es mucho menor al 1%.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización de área de Estudio

El estudio se realizó en el Campo Experimental INIFAP entre los 22° 58' de latitud norte y 102° 30' de longitud oeste, a una altitud de 2,153 metros sobre el nivel del mar. El estudio estuvo basado en un hato formado por cabras de las razas celtibéricas, alpinas, nubias y granadinas. Se muestrearon individuos del hato principal tanto machos como hembras, de las cuatro razas en estudio. En total se obtuvieron 73 muestras de sangre, provenientes de los animales de dichas razas (8 cabras Celtibéricas, 10 alpinas, 11 nubias y 9 granadinas) y de los productos de las diferentes cruces (9 cabras de Celtibérica X Celtibérica, 9 de Celtibérica X Alpina, 8 de Celtibérica X Granadina y 9 de Celtibérica X Nubia).

De cada animal se obtuvieron aprox. 10 ml de sangre por vena punción yugular en tubos vacutainer al vacío, los cuales fueron analizados en el laboratorio de biología molecular del INIFAP-Zacatecas.

Extracción del ADN

Se utilizó el método de extracción de ADN propuesto por Weising *et al.*, (1995) con modificaciones para realizarlo en modo "mini-prep" según Haley *et al.*, (1994), con arreglo al siguiente protocolo:

Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min., posteriormente se retiró el suero de cada una de ellas y se mantuvo el coágulo, del cual se pesaron 500mg y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y a este se le aplicó 600 µl de Buffer de extracción (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1% de B-mercaptoetanol) agitando la mezcla hasta homogeneizar. Las muestras son incubadas por 20 minutos a 65 °C. (cada 3 minutos se homogenizan). Después de la incubación se le agregaron 600 µl de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) (frío), y fueron mezcladas con agitación por 15 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm por 15 minutos (aquí se formaron tres fases), y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo contenido 600µl de isopropanol frío. Las muestras fueron mezcladas y dejadas a temperatura ambiente por 5 minutos. En seguida se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y los tubos fueron invertidos por 5 minutos para secar la pastilla de ADN. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en 100µl de buffer TE (Tris- EDTA 0.01 mM pH 8.0) y 100µl de etanol al 100%. Se colocaron en baño maría por 9 min para disolver la pastilla de ADN.

Cuantificación de ADN

El ADN resultante fue cuantificado mediante la utilización de un espectrofotómetro de UV Visible, marca Jenway modelo 3365, usando cubetas de cuarzo. Se midió absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm; la relación entre ambos valores es un indicador de la pureza del material extraído, ya que las proteínas absorben luz UV a 280 nm. Posteriormente, se procedió a calcular la cantidad de ADN por gramo de tejido mediante: $ng \text{ ADN} = \text{Factor de dilución} \times \text{Absorbancia } 260 \text{ nm} \times K$ Donde K es 50 ng. \square^{-1} , la concentración de ADN con absorbancia a 260 nm igual a 1. Luego, se calculó el ADN total, al considerar el volumen total resultante de cada extracción, y éste se relacionó con la cantidad de masa original.

Análisis RAPDs

Se utilizaron 20 decámeros o indicadores de secuencias conocidas (Vaiman *et al.*, 2000):

Tabla 1. Decámeros empleados para la identificación de razas.

No	Secuencia	No	Secuencia
1	5' ctccccgcac 3'	11	5' agctcttaac 3'
2	5' ttaggtgtgg 3'	12	5' tagattgcat 3'
3	5' gacatacccc 3'	13	5' tgaattaga 3'
4	5' gttgttgcct 3'	14	5' tatacattaa 3'
5	5' cccaccacag 3'	15	5' aagagttga 3'
6	5' agtcttttcc 3'	16	5' ctaaagata 3'
7	5' ttaatgata 3'	17	5' ataaagcatg 3'
8	5' tcaaaactct 3'	18	5' attaagagct 3'
9	5' tatcatttag 3'	19	5' atgcaatcta 3'
10	5' catgctttat 3'	20	5' tctaattgea 3'

Las reacciones de amplificación de ADN usando PCR para los análisis de RAPDs se conformaron de la siguiente manera (Williams et al., 1990; Haley et al. 1994) para cada una de las muestras analizadas y para cada uno de los primeros utilizados: En tubos Eppendorf de 500 µl, se colocaron: 10 µl de Buffer PCR 10X (500 nM KCl, 100mM Tris pH 8.4, 15 mM MgCl₂, 1 µg/ml gelatina); 10 µl D NTPS 10X (2.5 mM ATP, 2.5 mM GTP y 2.5 mM CTP); 2 µl de cada primer (sentido y antisentido); 2 µl de ADN polimerasa Invitrogen; 10 µl de ADN templado y 64 µl de H₂O dd.

Los tubos se incubaron en el termociclador a 94°C /3 minutos, para completar la desnaturalización. El programa de los ciclos para la reacción de polimerasa en cadena (PCR) consistió de 3 ciclos de 1 min/94°C, 1 min/35°C, 2 min/72°C; 34 ciclos de 10 sec/94°C, 20 sec/40°C; 2 min/72°C; 1 ciclo de 5 min/72°C. (Young y Kelly, 1996) y al termino, se incubo a 72°C/10 min., manteniendo la reacción a 4°C. Al final se llevo acabo el análisis de amplificación en geles de agarosa por electroforesis.

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación de la PCR (RAPDs) fueron sometidos a electroforesis en geles al 1.4% (Young and Kelly, 1996) en una unidad de electroforesis horizontal/submarino Emprotech SSII0805, en donde el gel tiene un tamaño de 12 por 14 cm, y un grosor aproximado de 2 cm. Esto se realizó de la siguiente manera: Se pusieron 0.5 gramos de agarosa (1 %) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se disolvieron en 50 ml de buffer TAE 1 X (Tris base (40mM), EDTA-Na₂. 2H₂O (2mM). Se puso la solución a calentar en el horno de microondas y se dejo ahí, hasta que desaparecieron los grumos formados; de vez en cuando se sacó el matraz y se agitó para luego observar si ya se habían disuelto la agarosa. Después, se dejó enfriar y cuando llegó a una temperatura cercana a las 60°C, se le adicionó 5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml. (Williams et al. 1990). Se

mezcló bien y se vació el contenido a una cámara de electroforesis sumergida previamente armada con su peine, y se dejó gelificar la solución de agarosa por 20 minutos.

Casa carril fue cargado con una mezcla de 10ul del producto de la PCR mas 4 µl de buffer de carga [azul de bromofenol al 1% (0.1%), 1 ml de xileno-cianol al 10% (1%), 5 ml de glicerol (50%), 200ul de buffer TAE 50 (1X)]. Después se retiro el peine del gel y se cargó cada pozo con la muestra. Se puso con cuidado, el buffer TAE1 X (ó el TBE 1X) para el corrimiento, y se le aplicó una corriente constante de 100Volts por 30 minutos (Davis et al., 1986). También se aplicaron 2 µl de marcadores (0.7ug/ul) ya preparados de peso molecular para ADN 1Kb plus (de 100pb a 12Kb) marca Invitrogen Life Technologies (Cat. No.: 10787-018, 2002).

Una vez terminada la electroforesis, se puso el gel en el trasiluminador y se encendió la lámpara de luz ultravioleta para visualizar las bandas teñidas con el bromuro de etidio. Posteriormente se capturó la imagen y el análisis densitométrico de las bandas, se hizo empleando un fotodocumentador modelo Chemi-Doc marca Bio-Rad.

Densitometría

Las imágenes de las bandas de proteína, Western blot y ADNc, fueron capturadas con un fotodocumentador ChemiDoc marca Bio – Rad. Luego se sometieron a un análisis densitométrico semi-cuantitativo, con el software Quantity One de marca Bio-Rad, con el fin de calcular el tamaño en base a pares de base.

Análisis AFLPs

En la determinación de los AFLPs se analizaron cuatro cabras Celtibéricas, tres Alpinas, tres Granadinas, tres Nubias, tres cabras provenientes de las cruza Celtibérica X Celtibérica, tres de las Celtibéricas X Alpinas, tres de las Celtibéricas X Granadinas y tres de las Celtibéricas X Nubias.

El primer paso de la técnica de AFLPs es generar fragmentos de restricción usando dos endonucleasas (Eco RI y MseI)

1.- Para ello se preparó la siguiente muestra cada uno de los individuos en estudio:

Para cada muestra se preparó en un tubo de micro centrifuga, la mezcla restricción-ligación, (10.00 µl de 5X RL Buffer; 0.50 µl de 5 U EcoRI; 1.25 µl de 5 u Miel; 1.00 µl de Eco Adapter; 1.00 µl de Mse Adapter; 1.00 µl de Ligase [1U/µl]; 1.00 µl de ATP 10mM y de DdH₂O) y 10 µl de DNA (500 ng en 10 µl). Para un

volumen total de 50 µl. Se incubó a 37° por 4 horas. Se realizó una disolución de 1:4 agregando 150 µl de TE 0.1 mM EDTA, y se almacenó a -20° C.

2.- Mezcla de la reacción de pre-amplificación: Cada muestra contenía 10.80 µl de ddH₂O; 0.6 µl de Eco+A (50 ng/ul); 0.6 µl de Mse+C (50 ng/ul); 0.8 µl de dNTPS (5mM); 2.0 µl de PCR 10X; 0.2 µl de Taq DNA y 15.0 µl de polimerasa.

Se agregó a un tubo de PCR (0.2 ml): 5 µl de DNA diluido (digerido y ligado) y 15 µl de la mezcla de preamplificación; Taq polimerasa de Perkin Elmer (5U/ul) usando 0.08 µl por reacción, ajustando el volumen final con Milli-Q water. Se amplificó usando un termociclador Techne Genius con el siguiente programa:

20 ciclos de: 92°C por 60 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 60 seg.

De los productos pre-amplificados se resuspendieron a 200 µl con buffer Te 0.1.MEDTA, y se almacenaron a 4° C.

3.- Mezcla para amplificación selectiva: Esta formada por: 10.9 µl de ddH₂O, 0.5 µl de Eco (+2), 0.6 µl de Mse (+2), 0.8 µl de dNTPs (5mM), 2.0 µl de PCR 10X, 0.2 µl de Taq polimerasa. A cada tubo de PCR se le agregó 5 µl del producto de la pre-amplificación y 15 µl de la mezcla.

Las condiciones de amplificación fueron:

Ciclo 1: 94°C 30 seg, 65°C 30 seg, 72°C 60 seg. Ciclo 2 – 13: 94°C 30seg, 65 - 0.7°C., 72°C 60 seg. Ciclo 14 – 36: 94°C 30 seg, 56°C 30 seg, 72°C 60 seg.

Los productos de amplificación se vieron a través de un secuenciador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material Biológico

De todos los individuos de las cuatro razas (Celtibérica, Alpina, Granadina y Nubia) se obtuvieron buenos rendimientos de tejido sanguíneo, adecuados para la extracción del ADN. Lo mismo fue para los individuos provenientes de las diferentes cruza (Celtibérica X Celtibérica, Celtibérica X Alpina, Celtibérica X Granadina y Celtibérica X Nubia).

Se realizó la extracción de ADN, observándose para cada muestra el pellet del ADN de diferentes tamaños, por lo que se procedió en primera instancia a realizar un corrimiento electroforético para observar la presencia del ADN y de paso su posible integridad. La

figura 1 muestra un corrimiento donde se observa la presencia del ADN tomando al azar un individuo de cada raza. M1 y M2 son marcadores moleculares comerciales (sd y sfd respectivamente), la C corresponde a la raza celtibérica, la G granadina, N nubia y A alpina.

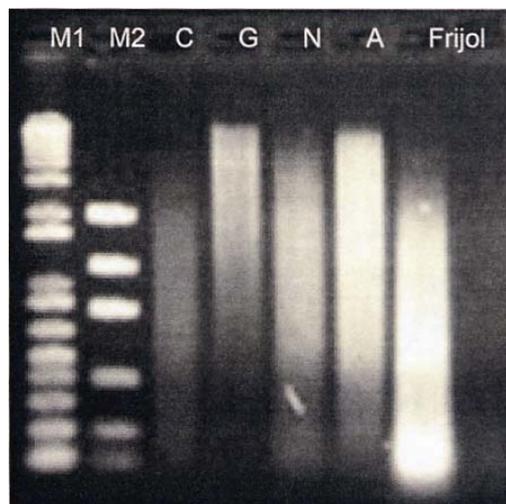


Figura1. Extracción de ADN genómico de cabras de las razas celtibérica (C), granadina (G), nubia (N) y alpina (A).

Para conocer la concentración total de cada muestra se procedió a cuantificarla por medio del fluorímetro. Los valores de las concentraciones variaron desde los 85 µg/ml de ADN en un individuo hembra de la raza Alpina, hasta los 230 µg/ml de ADN en un cabrito del producto de la cruce Celtibérico X Granadina. Después de la cuantificación espectrofotométrica, las muestras fueron ajustadas a una concentración de ~50 µg/ml de ADN y 10 µl de cada muestra fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% (Buffer 1X Tris-Borato para confirmar la presencia de los bandeos de ADN.

Análisis de RAPDs

Para cada una de las 73 muestras correspondientes a los individuos en estudio, se realizaron 30 combinaciones con los 20 decámeros o indicadores al azar previamente establecidos, con el objetivo de encontrar poliformismo que funcionara como marcador molecular distintivo para la raza Celtibérica. Dentro de los resultados más revelantes de RAPDs se muestra en la figura 2 un ensayo de RAPs utilizando los decámeros 5' ttaggtgtgg 3' y 5' catgctttat 3', y el 100 bp DNA Ladder como marcador molecular comercial. Este juego de decámeros sirvió como marcador que distingue 2 grupos, uno formado por las

razas granadina y nubia, con un par de bandas de 640 y 442 pb, y otro grupo formado por las razas alpina y celtibérica sin presencia de bandas.



Figura 2. polimorfismo generado por los primers SENTIDO 5' ttaggtgtgg 3' ANTISENTIDO 5' catgctttat 3' en cabras de las razas celtibérica (C), granadina (G), nubia (N) y alpina (A). Marcador molecular (M).

Otro conjunto de primers utilizados que generó polimorfismo fue el sentido 5' cccaccacg 3' y antisentido 5' ctcccgcac 3' y se muestra en la figura 3. se aprecia nuevamente la formación de dos grupos, pero esta vez las razas alpina y nubia conforman un grupo con una banda de 96 pb, mientras que las razas granadina y celtibérica forman otro grupo con una banda de 124 pb, como se aprecia en la figura 3.

El resultado de un análisis de RAPDs con el juego del decamero 5' aagagtttga 3' como sentido, y el 5' tagattgcat 3' como antisentido, generó bandas polimórficas que se distinguen a los individuos de la raza celtibéricas con respecto a las demás, e muestra en la figura 4. Se distingue un grupo formado por las razas Granadina, Nubia y Alpina con un patrón de 2 bandas de 648 y 512 pb; y otro grupo distintivo perteneciente a los individuos de la raza Celtibérica con una banda de 648 pb que comparte con las otras tres razas, pero con una banda de 860 pb exclusiva de esta raza.

Los resultados de los análisis de RAPDs para el producto de las cruza entre machos celtibéricos con hembras granadinas, alpinas y nubias se muestran a continuación, mostrando únicamente los decámetros con resultados notorios. Así la figura 5 muestra el polimorfismo generado con el conjunto de decámetros usando como sentido 5' aagagtttga 3' y antisentido 5' tagattgcat 3', donde M es el marcador de peso

molecular comercial 1 kb plus DNA Ladder, C corresponde a individuos de raza celtibérica, CXA individuos de la cruza entre ♂ celtibéricos y ♀ alpinas, CXG ♂ celtibéricos y ♀ granadinas y CXN ♂ celtibéricos y ♀ nubias.

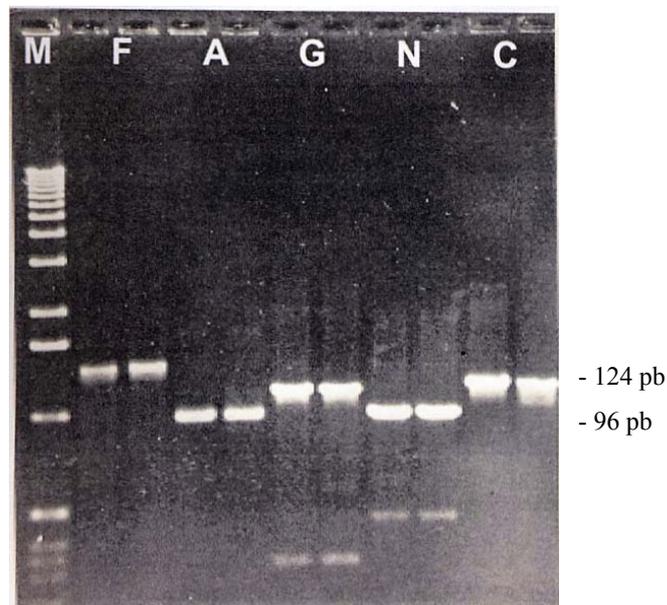


Figura 3. Polimorfismo generado por los primers SENTIDO 5' cccaccacg 3' (5) ANTISENTIDO 5' ctcccgcac 3' (1) en las cabras de las razas celtibérica (C), granadina (G), nubia (N) y alpina (A), ADN de frijol (F), Marcador molecular (M).

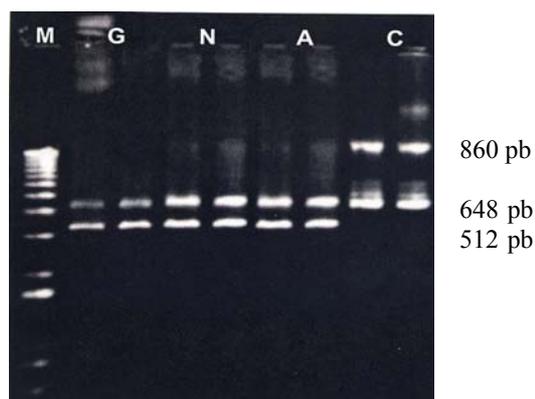


Figura 4 Polimorfismo generado por los primers SENTIDO 5' aagagtttga 3' (5) ANTISENTIDO 5' tagattgcat 3' (1) en las cabras de las razas celtibérica (C), granadina (G), nubia (N) y alpina (A), Marcador molecular (M).

Como se puede apreciar, existen dos grupos muy característicos. Uno de ellos corresponde a l de la raza celtibérica y los individuos productos de la cruce entre celtibérica y alpina. Estos equiparan un patrón de bandas de 2000 pb, 1320 pb, 1000 pb y de 850 pb. Pero el grupo de celtibérica y alpina tiene una banda más, de 792 pb. Y por otro lado, los individuos productos de las cruces celtibérica por granadina y celtibérica por la nubia presentan un bandeo idéntico con bandas de 2000, 1650, 1320, 828, 733 y de 650 pb.

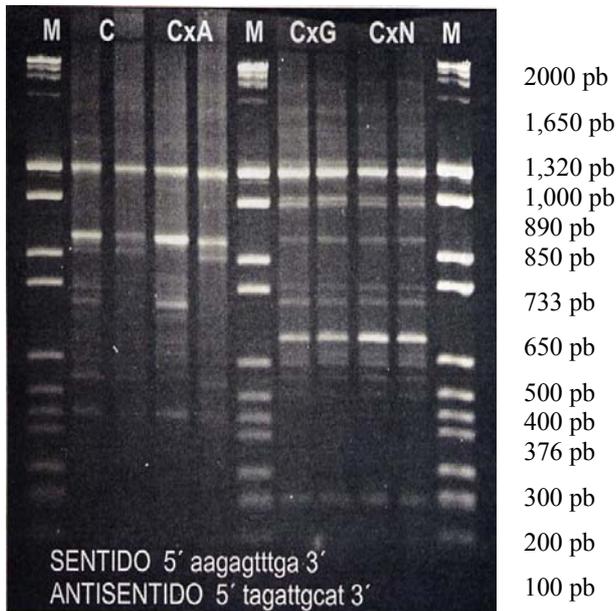


Fig. 5 Polimorfismo generado por los primers SENTIDO 5' aagagtttga 3' (5) ANTISENTIDO 5' tagattgcat 3' (1) en las cabras de las razas celtibérica (C), celtobérica por alpina (CXA), celtibérica por granadina (CXG), y celtibérica por nubia (CXN), Marcador molecular (M).

Para otro conjunto de primers (sentido 5' catgctttat 3' y asntisentido 5' ataaagcatg 3') con resultados sin distinción polimórfica se muestra en la figura 6. De un total de 144 combinaciones con los primers, el juego de primers utilizando como sentido y 5' aagagtttga 3', y 5' tagattgcat 3' como antisentido, generó un marcador molecular distintivo entre la raza Celtibérica con las razas Granadina, Alpina y Nubia de 860 pares de bases, el cual fue secuenciado para conocer el orden de los nucleótidos de tal marcador. Dicha secuencia, resultado ser la siguiente:

1 gttgatgtag cttaaactta aagcaaggca ctgaaaatgc
ctagatNagt gtaccaactc

61 cataaacaca taggtttggt cccagccttc ctgftaactc
tcaacagact tacNcatgca
121 agcatccacN ccccgggtgag taacgccttc caaatcaata
agactaagag gaggaggtat
181 caagcacaca tctcgtagct tacaacgcct cgcttaacca
cNcccctacg ggagacagca
241 gtgacaaaaa ttaagccata aacNaaagtt tgactaagcc
atgttgacca ggggttgtaa
301 atctcgtgcc agccaccgag gtcatacagat taaccaagc
taacaggaat acggcgtaaa
361 acgtgttNaa gcactacatc aaatagagtt aaattctaat
taaactgtaa aaagccataa
421 ttacaacaaa aatagatgac gaaagtaacc ctactgcagc
tgatacNcta tagctaagac
481 ccaaaNtggg attagatacc ccaactatgct tagccctaaa
cacaaataat tacagaacaa
541 aaattattcg ccagagtact accggcaaca gcccgaNact
caaaggactt ggcgggtgctt
601 tataNccttc tagaggagcc tgtctataa tcNNtaaacc
ccgataaacc tcaccaatcc
661 ttgctaatac agtctatata ccgccatctt cagcaaaccc
tNaaaaggaa caaaagtaag
721 ctcaatcacN acacataaag acgttaggtc aaggtgtaac
ccatggaatg ggaagaaatg
781 ggctacattt tctacctaa gaaaattaat acgNaagcca
ttatgaaatt aatgNccaaa
841 ggaggattta gtNgtaaact

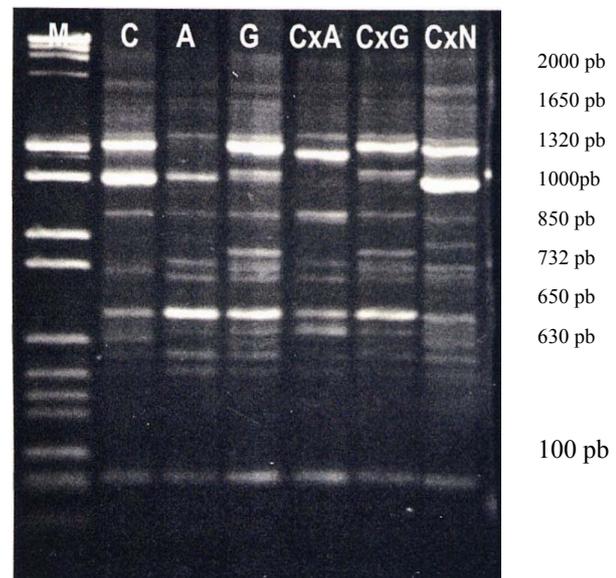


Fig.6 Polimorfismo generado por los primers SENTIDO 5' catgctttat 3' (5) ANTISENTIDO 5' ataaagcatg 3' (1) en las cabras de las razas celtibérica (C), alpina (A), granadina (G), celtibérica por alpina (CXA), celtibérica por granadina (CXG), y celtibérica por nubia (CXN), Marcador molecular (M).

AFLPS

Mediante AFLPs, se determinó el parentesco genético de los grupos en estudio, para con ello establecer posibles relaciones filogenéticas. Se utilizaron cuatro juegos de primers selectivos.

Se muestran los resultados de cada juego:

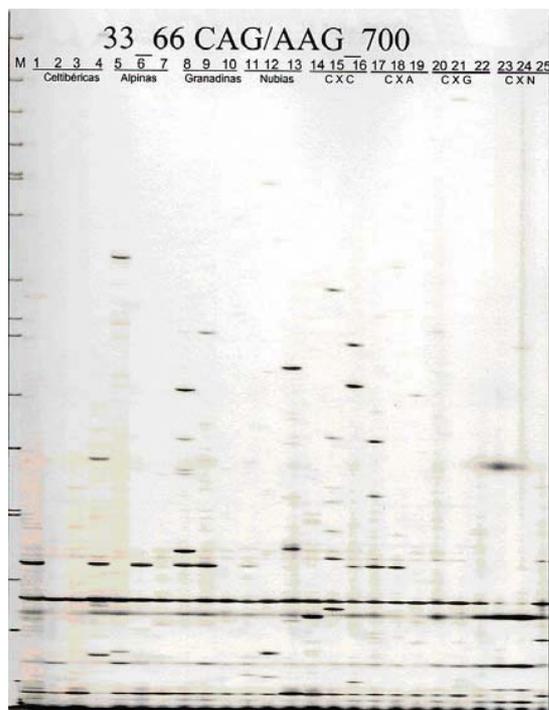


Figura 7. Electroforesis de AFLPs usando el juego cebador/enzima CAG/AAG, donde los carriles 1 al 4 corresponden a cabras de la raza Celtibérica; los carriles 5, 6 y 7 a cabras alpinas; 8, 9 y 10 a Granadinas; 11, 12 y 13 a Nubias; 14, 15 y 16 a cabras provenientes de la cruce entre Celtibérica X Celtibérica; 17, 18 y 19 a cabras de la cruce de Celtibérica X Alpina; 20, 21 y 22 a Celtibéricas X Granadinas y los carriles 23, 24 y 25 a cabras de las cruces de Celtibérica X Nubia. (M) marcador molecular.

El análisis de AFLPs permitieron la discriminación de todas las razas con la combinación de 4 primers selectivos: a) CAG/AAG; b) CAC/ACT; c) CAG/AAG y d) CAG/AAG. Las observaciones basadas en la cuantificación de la presencia/ausencia de bandas entre los individuos estudiados, permitieron establecer agrupaciones con parentescos genéticos entre las 4 diferentes razas utilizadas. Las similitudes genéticas estuvieron en los rangos de 0.31 a 0.92 coeficiente de Jaccard.

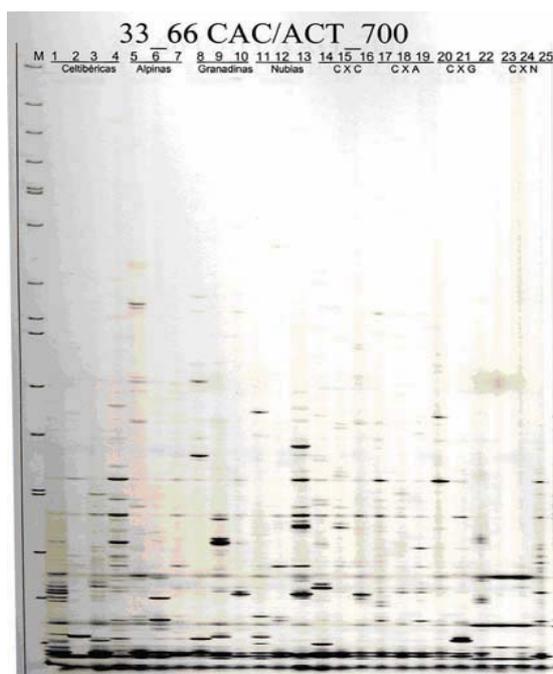


Figura 8. Electroforesis de AFLPs usando el juego cebador/enzima CAC/ACT, donde los carriles 1 al 4 corresponden a cabras de la raza Celtibérica; los carriles 5,6 y 7 a cabras Alpinas; 8, 9 y 10 a Granadinas; 11, 12 y 13 a Nubias; 14, 15 y 16 a cabras provenientes de la cruce entre Celtibérica X Celtibérica; 17, 18 y 19 a cabras de la cruce de Celtibérica y Alpina; 20, 21 y 22 a Celtibéricas X Granadinas y los carriles 23, 24 y 25 a cabras de las cruces de Celtibérica X Nubia. (M) marcador molecular.

Con lo anterior se determinó la conformación de dos grandes grupos, uno formado por la raza Celtibérica, Nubia y Alpina; y el otro formado únicamente por la raza Granadina. Dentro del primer grupo, la raza Celtibérica se le aparentan genéticamente la raza Nubia en mayor grado, seguido por la Alpina, existiendo además, más acercamiento de la raza Nubia y Alpina con la Celtibérica cada una por separado, que entre estas dos, es decir, El parentesco genético entre las razas Alpina y Nubia es más distante que entre cada una de ellas con la raza Celtibérica.

Por otro lado, la raza Granadina esta más alejada de las otras razas formando un grupo aparte, solo con ciertas similitudes con la raza Alpina, sin embargo esta relación es muy distante.

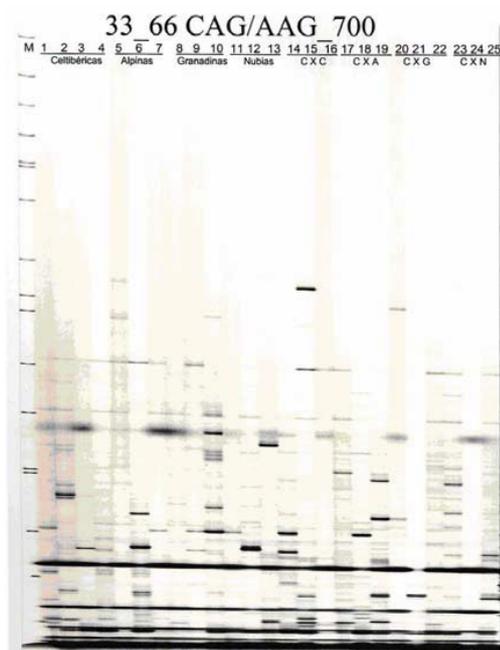


Figura 9. Electroforesis de AFLPs usando el juego cebador/enzima CAG/AAG, donde los carriles 1 al 4 corresponden a cabras de la raza Celtibérica; los carriles 5,6 y 7 a cabras Alpinas; 8, 9 y 10 a Granadinas; 11, 12 y 13 a Nubias; 14, 15 y 16 a cabras provenientes de la cruce entre Celtibérica X Celtibérica; 17, 18 y 19 a cabras de la cruce de Celtibérica y Alpina; 20, 21 y 22 a Celtibéricas X Granadinas y los carriles 23, 24 y 25 a cabras de las cruces de Celtibérica X Nubia. (M) marcador molecular.

CONCLUSIONES

En cabras, la obtención de ADN de alta calidad para trabajos de biología molecular resulta mejor de muestras sanguíneas obtenidas por veno punción yugular.

Utilizando el juego de primers 5' aagagttga 3' como SENTIDO y 5' tagattgcat 3' como ANTISENTIDO, genera un marcador molecular de 860 pares de bases por medio de RAPDs, distintivo entre la raza criolla Celtibérica con las razas Granadina, Alpina y Nubia. Así mismo, con la combinación de cuatro primers selectivos a) CAG/AAG; b) CAC/ACT; c) CAG/AAG y d) CAG/AAG, mediante AFLPs permitieron la discriminación de todas las razas en estudio, conformando dos grupos:

- El primero conformado por las razas Celtibérica, Nubia y Alpina, en donde estas dos últimas comparten similitudes con la primera mas que entre ellas mismas,

pero determinándose un parentesco mayor entre la raza Celtibérica y la raza Nubia.

- El segundo grupo esta conformado únicamente por la raza Granadina, determinándose con ello, un parentesco más lejano con el resto de las razas en estudio.

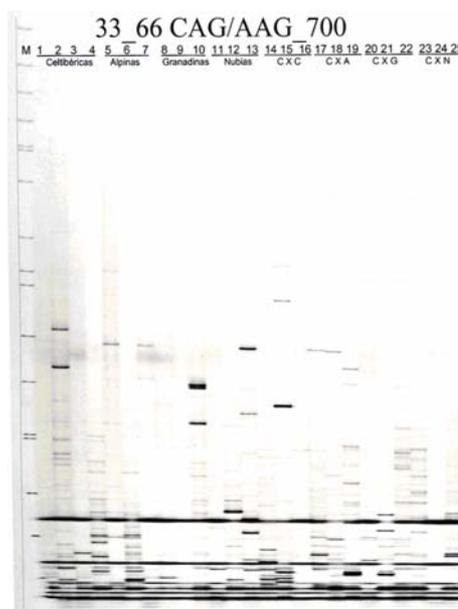


Figura 10. Electroforesis de AFLPs usando el juego cebador/enzima CAG/AAG, donde los carriles 1 al 4 corresponden a cabras de la raza Celtibérica; los carriles 5,6 y 7 a cabras Alpinas; 8, 9 y 10 a Granadinas; 11, 12 y 13 a Nubias; 14, 15 y 16 a cabras provenientes de la cruce entre Celtibérica X Celtibérica; 17, 18 y 19 a cabras de la cruce de Celtibérica y Alpina; 20, 21 y 22 a Celtibéricas X Granadinas y los carriles 23, 24 y 25 a cabras de las cruces de Celtibérica X Nubia. (M) marcador molecular

REFERENCIAS

Cheng, H.H., Crittenden, L.B. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* 73: 539-546

Davis, L., Dibner, M., Battey, J. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York.

Ford, E.B. 1940. Polymorphism and taxonomy. In: *New systematics.* Ed by JS Huxley. Larendon Press, Oxford, pp 493.

- González, A. 2001. Manuales para la educación agropecuaria. Cabras. Área: producción animal. Editorial trillas. Pp 36 – 38
- Haley, S. D., Afandor, L.K., Kelly, J.F. 1994. Selection for monogenic resistance traits with coupling – and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Sci.* 34: 1061-1066.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature.* 341: 67-73.
- Koelag, J. H. 1982. Cabras. Manual para la educación agropecuaria. SEP Ed. Trillas. México. Pp. 57-58
- Mahmood, T., Rahman, M.H., Stringam, J.P., Raneg, J.P., Good, A.G. 2005. Molecular markers for seed colour in *Brassica juncea*. *Genome.* 48: 755-760.
- Makino, S. 1943. The chromosome complexes in goat (*Capra hircus L.*) and sheep (*Ovis aries L.*) and their relationships. *Chromosomes studies in domestic Mammals, II. Cytology.* 13: 39-54.
- Nayak, S., Naik, P.K., Acharya, L., Mukherjee, A.K., Panda, P.E., Das, P. 2005. Assessment of genetic diversity among 16 promising cultivars of ginger using cytological and molecular markers. *Z Naturforsch [C].* 60: 485-492.
- Neumann, K. F. 2001. Crianza de caprinos. Centro de estudios agropecuarios. Grupo editorial Iberoamericana S. A. De C. V. Serie Agronegocios. Impreso en México. pp. 8, 9, 14, 22, 24.
- Quittet, E. 1990. La cabra. Guía práctica para el ganadero. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 3ra. Reimpresión. pp. 14,15.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. 1988. Analysis of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science.* 139:487-491.
- Thomas, S.C. 2005. The estimation of genetic relationships using molecular markers and their efficiency in estimating heritability in natural populations. *Phil. Trans R Soc. Lond. B Biol Sci.* 360: 1457-67.
- Vaiman, D., Schibles, L., Bourgeois, F., Oustry, A., Amigues, Y., Cribiu, E.P. 1996. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics.* 144: 279-305.
- Vaiman, D., Brunialti, A., Bensaada, M., Derbois, C., Vaiman, A., Crawford, A., Metzeau, P., Cribiu, E.P. 2000. Isolation of subtelomeric DNA sequences labeling sheep and goat chromosome ends. *Genet. Sel. Evol.* 32: 599-619.
- Vera, G.T. 1993. Reproducción del ganado caprino. UANL. Centro Regional de Fomento Agropecuario. 63-65.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Young, R.A., Kelly, J.D. 1996. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 37-41.
- Yuasa, I., Umetsu, K. 2005. Molecular aspects of biochemical markers. *Leg Med (Tokyo).* 7: 251-254.

Submitted January 06, 2008 – Accepted April 02, 2008
Revised received June 03, 2008