

ESTUDIO ELECTROFORETICO DEL POLIMORFISMO ENZIMATICO 6-FOSFO-
GLUCONICO DESHIDROGENASA (6-PGD) EN CONEJOS DE LA RAZA COMUN
ESPAÑOLA.

ZARAGOZA, M.P., ARANA, A., AMORENA, B. y ZARAZAGA, I.

Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universi-
dad de Zaragoza. Zaragoza. España.

INTRODUCCION

Los polimorfismos bioquímicos de conejos (*Oryctolagus cu-
niculus*) han sido objeto de numerosas investigaciones tanto
en razas domésticas como en silvestres. Entre ellos podemos
destacar, como objeto de este estudio, el enzima 6-fosfoglu
cónico deshidrogenasa (6-PGD), catalizador de la reacción:
$$\text{NADP} + \text{6-fosfogluconico} \xrightarrow{\text{6-PGD}} \text{NADPH}_2 + \text{ribosa 5-fosfato} + \text{CO}_2.$$

Coggan descubrió en 1.974 tres variantes fenotípicas de
6-PGD, mediante la utilización de gel de almidón y de acetato
de celulosa. Una de ellas, se caracteriza por la aparición de
una banda intensa rápida (anódica), otra por una banda lenta
(catódica) y otra por 3 bandas (la anódica y la catódica débi-
les, la intermedia intensa). Estas bandas representaban
la expresión fenotípica de dos alelos codominantes pertene-
cientes a un solo locus autosómico. Un alelo (Pgd¹) daba lu-
gar a la banda rápida, el otro alelo (Pgd²) a la lenta y el
heterocigoto (Pgd¹/Pgd²) a las tres bandas.

En el mismo año Vergnes no observó polimorfismo al estu-
diar 6-PGD en esta especie (raza Petit Russe). Sin embargo,
Richardson y col. (1.980) en sus estudios de la enzima 6-PGD
en conejos australianos, franceses e ingleses, encontraron al
igual que Coggan (1.974) un polimorfismo enzimático con tres
variantes idénticas a las descritas y controlado por dos ale-
los de un solo locus.

El presente trabajo ha sido realizado con el propósito de

iniciar la caracterización de la raza Común Española mediante polimorfismos bioquímicos detectados electroforéticamente. Específicamente este trabajo está enfocado al estudio de las frecuencias fenotípicas y alélicas de las variantes polimórficas de 6-PGD en gel de almidón horizontal.

MATERIAL Y METODO

Un total de 100 conejos pertenecientes a la raza Común Española fueron utilizados en el presente estudio caracterizándose fenotípicamente por orejas largas y rectas, cola mediana, patas finas, y uñas color pardo o negro. Su color era gris o pardo, de tamaño mediano, con un peso en vivo de unos dos Kg. y con una edad de ~dos meses. Procedían de varias explotaciones de Cataluña.

Las muestras de sangre se obtuvieron en el matadero a partir de la vena yugular, utilizando heparina como anticoagulante y se mantuvieron a 4 °C por un máximo de 48 horas. Tras una centrifugación (2.000 g, 15 min.), se descartaron el plasma y los glóbulos blancos. El sedimento de glóbulos rojos fue tres veces resuspendido con suero fisiológico (0,9% NaCl, pH=7-7,4), y centrifugado a 1.800 g (10 min.).

La hemólisis de los eritrocitos así lavados, fue inducida mediante congelación (-30°C, 24 horas). El hemolizado resultante fue distribuido en 5 tubos y conservado a -30 °C por un periodo de hasta 6 meses. Para evitar pérdidas de actividad enzimática por sucesivas descongelaciones, las muestras fueron utilizadas para corrido electroforético tras su primera descongelación.

La electroforesis horizontal fue llevada a cabo según el método de Mathai y col. (1.974) con algunas modificaciones. El medio de soporte utilizado fue almidón (12%). Las muestras fueron sometidas a electroforesis durante 17 horas, a 6,5 v/cm., en una cámara frigorífica a 4 °C, usando un buffer gel (0,03 M bórico y 0,012 M de NaOH, pH = 8,6) y un buffer electrodos (0,3 M bórico y 0,06 M NaOH, pH = 8,6).

Antes de someter el gel al paso de corriente eléctrica

fue añadido al tampón-electrodos de la cubeta catódica en el lado más cercano al gel, nicotín adenín dinucleótido fosfato (NADP, 0,02%).

La inserción fue realizada a 4 cm del cátodo utilizando cuadraditos de 5 mm x 5 mm de papel Whatmann n°3, aplicando un voltaje de 120 V en fuente durante 40 min. a 4 °C.

Una vez terminado el corrido, el gel fue dividido por la mitad longitudinalmente y sólo la cara profunda en la que se ha eliminado el efecto borde fue conservada para el estudio. De ella solamente fue utilizada la zona del gel que comprende 5 cm. contados a partir de la línea de inserción hacia el ánodo.

La tinción fue realizada a 37 °C (30-60 min.), en la oscuridad y añadiendo a la superficie del gel una solución que contiene tampón tris-ClH (0,1 m), 6-fosfoglucónico (0,05 mg/ml), NADP (0,4 mg/ml), PMS (0,2 mg/ml), MTT (0,2 mg/ml), Cl₂MG.6H₂O (0,5 mg/ml), y agar (1,6%).

La lectura se realizó inmediatamente después de la tinción, pues con la exposición a la luz se oscurece rápidamente la solución de tinción aplicada al gel, lo que dificulta la identificación de bandas.

RESULTADOS

Tras el corrido electroforético de las muestras procedentes de los 100 individuos de la raza Común Española, pudo observarse un polimorfismo para 6-PGD que consistía en 3 fenotipos distintos con una posición e intensidad de bandas coincidentes con la ya descrita por Coggan (1.974) en otras razas (Fig. 1).

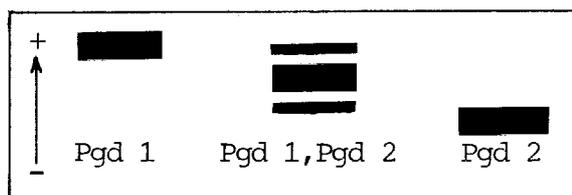


Fig. 1.- Diagrama representativo de los fenotipos observados en 6-PGD.

Una vez clasificados los fenotipos en tres clases, se procedió al cálculo de sus frecuencias para ver la distribución de éstas en la población estudiada. Como en trabajos realizados por otros autores (Richardson y cols., 1.980) y tras la verificación en nuestro laboratorio del tipo de herencia -- del polimorfismo 6-PGD en otras razas, pudieron inferirse los genotipos que controlan a los fenotipos encontrados (Tabla I). Pudo observarse que la frecuencia del genotipo $\underline{\text{Pgd}}^1/\underline{\text{Pgd}}^1$ era muy elevada (0,91) mientras que la del genotipo $\underline{\text{Pgd}}^2/\underline{\text{Pgd}}^2$ era muy baja (0,02). A partir de estos datos se realizó el cálculo de las frecuencias alélicas por recuento de productos génicos (2 por individuo), siendo para $\underline{\text{Pgd}}^1$, $p = 0,945$ y para $\underline{\text{Pgd}}^2$, $q = 0,055$ con un error standard ($\sqrt{pq/N}$) de 0,014, considerablemente más bajo que la frecuencia del alelo más raro (q), a los intervalos de confianza del 95 y 99.

Tabla I.- Frecuencias genotípicas en conejo Común Español.

Fenotipo	Genotipo inferido	Nº de individuos observados (esperados)	Frecuencias genotípicas observadas (esperadas)
Pgd 1	$\underline{\text{Pgd}}^1/\underline{\text{Pgd}}^1$	91 (89,30)	0,91 (0,893)
Pgd 1, Pgd 2	$\underline{\text{Pgd}}^1/\underline{\text{Pgd}}^2$	7 (10,40)	0,07 (0,104)
Pgd 2	$\underline{\text{Pgd}}^2/\underline{\text{Pgd}}^2$	2 (0,30)	0,02 (0,003)

Aunque hubiera sido de interés el conocer si la población estudiada se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg, no se realizó este estudio, ya que las pruebas de χ^2 pierden eficacia y dejan de ser aconsejables cuando el número de genotipos esperados es menor que 5 ($0,3 < 5$). Por otra parte el test de Fisher-Irwin, utilizado en casos en que el número de genotipos esperados es pequeño para todas las categorías presentes en Tablas de 2 x 2, tampoco sería aplicable a estas observaciones.

DISCUSION

Las frecuencias génicas encontradas en esta población de conejo Común Español, concuerdan con las observadas por Coggan y cols. (1.974) en algunos ecotipos de conejos australianos.

Richardson y cols. (1.980) calcularon las frecuencias génicas en poblaciones de conejos ingleses, franceses, tasmanos y de diferentes ecosistemas australianos con el fin de establecer relaciones genéticas entre ellos. Nuestros resultados, concuerdan con los encontrados en ciertas zonas australianas en conejos derivados de antecesores franceses, diferenciándose de los conejos británicos en que éstos no poseen el alelo Pgd^2 y de los franceses porque lo poseen en una frecuencia inferior. Finalmente se diferencia de los tasmanos en que en unas zonas de ese país aparece el alelo Pgd^2 con una frecuencia muy superior y en otras con una frecuencia muy inferior a la encontrada en nuestras observaciones.

El hecho de que las conclusiones de Vergnes (1.974), no concuerden con nuestros resultados al no encontrar variación fenotípica, posiblemente se debe a que el tamaño de la muestra utilizada por este autor era excesivamente pequeño (35 individuos).

Richardson en su estudio de poblaciones de análogas frecuencias a la aquí descrita sugiere la existencia en ellas de un equilibrio Hardy-Weinberg, aunque el alto valor de X^2 estaba asociado a niveles muy significativos. Estos altos niveles pueden comprenderse al observar la enorme contribución por parte de la categoría menos frecuente al valor de X^2 , pudiéndose concluir que dicho test de X^2 no es aconsejable cuando existen unas frecuencias genotípicas excesivamente bajas (< 5).

Una posible explicación de la elevada frecuencia del alelo Pgd^1 en conejo Común Español es que este alelo podría encontrarse en proceso de fijación. La causa de ésta es motivo de muchas hipótesis (selección natural o realizada por el hombre, deriva genética, aislamiento, migración, consanguinidad, etc.).

Concretamente en conejo Común Español el tipo de apareamiento podría influir en estos resultados, ya que al ser una población cunícola poco extendida y restringida a determinadas zonas e incluso familias, los niveles de consanguinidad pueden ser muy altos. Igualmente podría postularse que al realizarse una selección artificial por el hombre ó natural, ésta podría estar relacionada con ciertos rasgos fenotípicos de los animales, como color de pelo, tamaño del animal, tipo de implantación de las orejas, tipo de almohadillas plantares, etc. A su vez dichos rasgos podrían estar asociados con un determinado fenotipo electroforético, dato importante a tener en cuenta para la realización de un posterior trabajo sobre la posible correlación de rasgos físicos, parámetros productivos, reproductivos o incluso de resistencia a ciertas enfermedades con dicho polimorfismo bioquímico.

BIBLIOGRAFIA

- COGGAN, M., BALOWIN, J. y RICHARDSON, B.J. (1.974). Ecological Genetics of the wild rabbit in Australia. I. Geographical Distribution and Biochemical characterization of Phosphogluconate Dehydrogenase variants. Aust. J. Biol. Sci., 27: 671.
- COGGAN, M., RICHARDSON, B.J. y McDERMIC, E.M. (1.974). Biochemical variation in rabbits. Abstract. Anim. Blood Grps. and biochem. Genet. Vol. 5. Supplement 1.
- GRUNDER, A.A., SARTORE, G. y STORMONT, C. (1.965). Genetic variation in red cell esterases of rabbits. Genetics, 52: 1345.
- MATHAI, C.K., OHNO, S. y BEUTLER, E. (1.966). Sex-linkage of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in the family Equidae. Nature, 210: 115.

RICHARDSON, B.J., ROGERS, P.M. y HEWITT, C.M. (1.980).

Ecological Genetics of the wild rabbit in Australia. II. Protein variation in British, French and Australian rabbits and the geographical distribution of the variation in Australia. Aust. J. Biol. Sci., 33: 371.

RICHARDSON, B.J. (1.980). Ecological Genetics of the wild rabbit in Australia. III. Comparison of the micro-geographical distribution of alleles in two different environments. Aust. J. Biol. Sci., 33: 385.

SCHIFF, R. y STORMONT, C. (1.970). The Biochemical Genetics of rabbit erythrocyte esterases: two new esterase loci. Biochem. Genet., 4: 11.

VERGNES, H., POGET, A. y GOVARDERES, C. (1.974). Comparative study of red cell enzyme polymorphism in the pika and the rabbit. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet., 5: 181.

RESUMEN

Una serie de polimorfismos bioquímicos caracterizadores de la especie *Oryctolagus cuniculus* están siendo estudiados en este laboratorio, realizándose para el presente trabajo un análisis electroforético en gel de almidón del enzima 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGD) en conejo Común Español.

El enzima presenta en esta raza un polimorfismo electroforético constituido por tres fenotipos de características idénticas a los ya descritos por Coggan (1.974) que demostró se encontraban controlados por un solo locus autosómico (Pgd) con dos alelos codominantes Pgd¹ y Pgd², dando lugar cada uno de los tres genotipos resultantes (Pgd¹/Pgd¹, Pgd¹/Pgd², Pgd²/Pgd²), a la variante fenotípica correspondiente. Cabe resaltar la gran diferencia entre las frecuencias de ambos alelos Pgd¹ (P = 0,945) y Pgd² (q = 0,055). Una posible explicación a

estas observaciones sería que Pdg¹ se encuentra en proceso de fijación.

Se va a investigar desde la óptica de mejora ganadera, si la presencia de variantes polimórficas, por ejemplo la controlada por el alelo Pgd¹, se encuentra asociada con algunos caracteres que pudieran tener interés en el futuro productivo.

SUMMARY

A variety of biochemical polymorphisms characterizing the species *Oryctolagus cuniculus* is being studied in this laboratory. For the present work, the polymorphism of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) was studied in the Comun Española rabbit breed, using starch gel electrophoresis.

In this breed the enzyme shows three electrophoretic variants (phenotypes) identical to those described by Coggan (1974) who demonstrated they were controlled by a single autosomal locus (Pgd) with two codominant alleles Pgd¹ and Pgd², such that each of the three resulting genotypes (Pgd¹/Pgd¹, Pgd¹/Pgd², Pgd²/Pgd²), give rise to the corresponding phenotypic variant.

The gene frequencies were determined in the studied population. It was observed that, significantly, the difference between both allelic frequencies was high ($p = 0,945$, and $q = 0,055$ for Pgd¹ and Pgd² respectively). It may be possible that Pgd¹ is in the process of fixation.

We are going to investigate, from the point of view of livestock improvement, if the presence of polymorphic variants, for example the variant controlled by allele Pgd¹, could be associated with production traits.

