

Análisis de dos poblaciones de gallinas criollas (*Gallus domesticus*) utilizando RAPD's como marcadores moleculares

An analysis of two native poultry populations (*Gallus domesticus*) using RAPD's as molecular markers

Irma Morelia Soto Huipe^a, Guadalupe Zavala Páramo^a, Horacio Cano Camacho^a, Joel E. López Meza^a

RESUMEN

México cuenta con una enorme riqueza de gallinas criollas; sin embargo, el conocimiento acerca de su diversidad es mínimo. En el presente trabajo se analizaron 20 individuos de dos poblaciones de gallinas criollas (*Gallus domesticus*), seleccionadas basándose en su producción de huevos, mediante la identificación de polimorfismos generados por la amplificación aleatoria de ADN (RAPD's). Los productos de amplificación generados presentaron tamaños en el rango de 0.2 a 1.1 kilobases (kb). Se detectó polimorfismo entre las poblaciones y dentro de las mismas, siendo la población de gallinas de baja producción la que presentó menor variabilidad. Existe una conservación de los productos de 0.2, 0.4, 0.5 y 0.6 kb en las dos poblaciones. El fragmento de 1.1 kb presente en la población de gallinas de baja producción de huevo no se generó en la otra población, lo cual indica que pudiera ser considerado como un candidato a marcador genético para caracterizar aquellas gallinas malas ponedoras; o bien, que su ausencia determine que una gallina puede tener una buena producción de huevos. La técnica de RAPD's es una herramienta útil para detectar polimorfismos en una población, y los resultados preliminares obtenidos permiten establecer en el ámbito molecular la variabilidad entre las poblaciones de gallinas.

PALABRAS CLAVE: Gallinas criollas, Producción de huevo, Marcadores moleculares, RAPD's.

ABSTRACT

México has a great variety of native poultry but knowledge about its diversity is minimal. In this study, twenty individuals belonging to two populations of native hens (*Gallus domesticus*) were analyzed. They were chosen by egg production, through polymorphism identification generated by DNA random amplification (RAPD's). Amplification generated products show different sizes between 0.2 to 1.1 kb. Polymorphism was detected between populations and inside populations, being the low egg production hen population the one which showed the lowest variability. Both populations show conserved products at 0.2 kb, 0.4 kb, 0.5 kb and 0.6 kb. The 1.1 kb fragment present in the lower egg production hen population did not show up in the other population, thus indicating that it could be a candidate as a genetic marker for characterization of hens with low egg production; or that the absence of this fragment could indicate hens with good egg production. The RAPD technique is a useful tool for identifying polymorphisms in a population and preliminary results allow to establish molecular variability between hen populations.

KEY WORDS: Native chickens, Egg production, Molecular markers, RAPD's.

La gallina doméstica (*Gallus domesticus*) tiene su origen en el *Gallus bankiva*, del sudeste de Asia, del cual se derivaron las razas y estirpes que existen

The common hen (*Gallus domesticus*) has its origin in *Gallus bankiva*, found in Southeast Asia, from which all current races and lineages derivate⁽¹⁾. These hens were introduced to the American continent by the conquistadors some 500 years ago

Recibido el 22 de noviembre de 2001 y aceptado para su publicación el 31 de mayo de 2002.

^a Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarimbaro, Mich. Correspondencia y solicitud de separatas al último autor.

actualmente⁽¹⁾. Estas gallinas fueron introducidas al continente americano por los conquistadores hace más de 500 años y desde entonces se ha practicado la avicultura doméstica o de traspatio^(2,3).

Las gallinas criollas por definición, son aquellas aves propias del lugar que han desarrollado características para su supervivencia, y se clasifican como semipesadas, ya que no corresponden al patrón de las aves de postura ni a las de engorda^(4,5). Estas características le confieren una gran importancia para la economía familiar en el medio rural⁽⁶⁾, no obstante se tiene poco conocimiento acerca de sus características genéticas. En este sentido el uso de marcadores moleculares representa una buena alternativa para la caracterización de las poblaciones de gallinas criollas.

Los marcadores moleculares son usados en la biomedicina, en las ciencias forenses y en ecología entre otras, con el fin de hacer análisis genómico (localizar genéticamente donde se encuentran los rasgos de interés) para hacer mapas genéticos, clonación de genes, diagnósticos médicos e identificación de características para mejoramiento de plantas y animales^(7,8). Los diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguen entre ellos por las diferencias en la capacidad para detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples, así mismo si son de tipo dominante o co-dominante. Los marcadores genéticos se basan en proteínas u otras moléculas que se pueden usar para diferenciar individuos, tales como isoenzimas, complejos proteicos, fenilpropanoides, glucósidos, hasta los marcadores más modernos basados en ADN⁽⁸⁾.

En el presente trabajo se muestran los avances que se tienen en el análisis genético de dos poblaciones de gallinas criollas diferenciadas sobre la base de su productividad, medida como postura de huevos, a través del uso de polimorfismos derivados de la amplificación al azar de ADN (RAPD's).

Para llevar a cabo el experimento se requirió de muestras de sangre de gallinas criollas, que fueron tomadas de 20 aves del lote de postura ubicadas en la Posta Veterinaria de la UMSNH en Morelia, Mich. Las gallinas se seleccionaron basándose en

and since then they have been used in commercial or backyard aviculture^(2,3).

By definition, native poultry is the one which belongs to the site in which it has developed the necessary traits for survival, and is classified as semiheavy, because it doesn't meet the standards either of laying or to meat production poultry^(4,5). These traits are of great importance to the economy of rural families⁽⁶⁾, even though current knowledge on its genetic characteristics is limited. In this sense, the use of genetic markers represents a valid alternative for characterization of native poultry populations.

Molecular markers are used in biomedicine, in forensic sciences and in ecology, among others, for genomic tests (to locate genetically, sites of features of interest) necessary for gene maps, gene clonation, diagnosis and character identification for animal and plant improvement^(7,8). Several types of molecular markers can be differentiated through their capacity to detect polymorphisms in multiple or single *loci*, even if they are dominant or co-dominant. Genetic markers are based on proteins or other molecules that can be used to differentiate individuals, such as isoenzymes, protein complexes, phenyl-propanoids, glycosides and the most modern markers based on DNA⁽⁸⁾.

In this study, progress on genetic analysis of two native poultry populations, differentiated by productivity, based on egg production, through polymorphism identification generated by DNA random amplification (RAPD) is shown.

To carry out this experiment, blood samples of twenty native hens, taken from individuals belonging to the Laying Hen Unit of the Posta Veterinaria of the UMSNH in Morelia, Mich., were analyzed. Twenty hens were chosen in accordance with their egg production and placed in two groups, 10 individuals showing the maximum production (20 eggs/month) and 10 individuals with low production (1 egg/month).

Blood samples were taken from the internal wing cubital vein, by means of Becton Dickinson

la producción de huevo y se ubicaron en dos grupos, 10 de ellas con una producción máxima de huevos (20 huevos/mes), y 10 aves con una baja producción (1 huevo/mes).

Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cubital interna del ala, utilizando tubos vacutainer (Becton Dickinson. Se obtuvo de 0.5 a 1 ml de sangre por individuo, y posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. La extracción de ADN de cada gallina se hizo a partir de la sangre colectada, por un método modificado tomado de Sambrook y Rusell⁽⁹⁾. Se colocaron 200 μ l de sangre en un microtubo de 1.5 ml y se le adicionaron 200 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1.6 %, después de mezclar por inversión se agregaron 80 μ l de solución de lisozima (20 mg/ml) y se incubó durante 20 min a 37 °C. Enseguida se agregaron 290 μ l de acetato de amonio (7.5 M) y se mezcló suavemente; luego se incubó 5 min a temperatura ambiente; después se agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente. Se centrifugó durante 10 min a 9.3 xg, se recuperó el sobrenadante y se pasó a un microtubo nuevo de 1.5 ml, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 5 min en hielo; se centrifugó nuevamente a 9.3 xg durante 10 min. Se eliminó la fase acuosa y se enjuagó la pastilla con 200 μ l de etanol al 70 %, dejando secar, para después resuspender en 100 μ l de agua desionizada estéril. Finalmente, se revisó la integridad y se determinó la concentración de la muestra de ADN, comparando con estándares por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, con buffer TAE 1X, corrido a 70 V y teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y por espectrofotometría a 260 nm⁽⁹⁾.

Para realizar los RAPD's se utilizó el Kit "RAPD Analysis Kit", de Amersham Pharmacia Biotech. Se evaluaron 6 oligonucleótidos: 1) 5'-d[GGTGCGGAA]-3'; 2) 5'-d[GTTTCGCTCC]-3'; 3) 5'-d[GTAGACCCGT]-3'; 4) 5'-d[AAGAGCCCGT]3'; 5) 5'-d[AACGCGCAAC]3' y 6) 5'-d[CCCGTCAGCA]3'. La mezcla de reacción contenida en el kit consistió en: polimerasa termoestable (AmplitaqTM

vacutainer tubes. Between 0.5 ml and 1 ml was taken from each individual and stored at 4 °C until processed. DNA for each hen was extracted by means of a modified method taken from Sambrook and Russell⁽⁹⁾. two hundred μ l of blood were placed in a 1.5 ml micro tube to which were added 200 μ l of a 1.6 % dodecyl sodium sulphate solution, and after mixing through inversion, 80 μ l of a 20 g/l lyzosome solution were added and incubated at 37 °C for 20 min. Immediately, 290 μ l of a 7.5 M ammonium acetate solution were added, gently mixed and incubated for 5 min at room temperature. An equal volume of a chlorophorm:isoamylic alcohol solution (24:1) was added and shaken vigorously. This mixture was centrifuged for 10 min at 9.3 xg and the floating liquid was recuperated and placed in a new 1.5 ml tube. Two volumes of absolute ethanol were added, mixed through inversion, let to rest for 5 min on ice and centrifuged for 10 min at 9.3 xg. The acuous phase was eliminated and the remaining lozenge was rinsed with 200 μ l ethanol 70 %, let to dry, and re-suspended in 100 μ l of sterile deionized water. Finally, integrity was analyzed and DNA concentration in the sample was determined, by comparison to electrophoresis standards in an 0.8 % agarose gel with TAE 1X buffer, run at 70 V and dyed with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) and through spectrophotometry at 260 nm⁽⁹⁾.

To conduct the RAPD's an Amersham Pharmacia Biotech RAPD Analysis Kit was used. Six oligonucleotides were evaluated: 1) 5'-d[GGTGCGGAA]-3'; 2) 5'-d[GTTTCGCTCC]-3'; 3) 5'-d[GTAGACCCGT]-3'; 4) 5'-d[AAGAGCCCGT]3'; 5) 5'-d[AACGCGCAAC]3' and 6) 5'-d[CCCGTCAGCA]3'. The reaction mixture provided with the kit was made up by thermo-stable polymerase (AmplitaqTM DNA polymerase and Stöffel fragment), dNTPs (0.4 mM for each dNTP), BSA (2.5 μ g) and a buffer [3 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 10 mM Tris, (pH 8.3)], to which were added 50 ng of hen blood DNA and 25 picaM of the oligonucleotide to be assessed. Sterile deionized water was added to complete a 25 μ l volume and thoroughly mixed, and finally 50 μ l of mineral oil were added. An Ericomp (Delta Cyclor ITM System) thermo cyclor was used for amplifica-

ADN polimerasa y el fragmento Stoffel), dNTPs (0.4 mM de cada dNTP), BSA (2.5 μ g) y buffer [3mM MgCl₂, 30 mM KCl y 10 mM de Tris, (pH 8.3)]; a lo que se añadió 50 ng de ADN de sangre de gallina y 25 picomoles del oligonucleótido a evaluar. Después se agregó agua estéril desionizada para obtener un volumen final de 25 μ l, para enseguida mezclar bien; y por último se agregaron 50 μ l de aceite mineral. Se utilizó un termociclador Ericomp (Delta Cyler ITM System) para la amplificación utilizando 45 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 1 min⁽¹⁰⁾.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en buffer de corrida TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Al gel se le adicionaron 0.5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 20 ml de agarosa. La electroforesis se realizó a 80 volts por 3 h. Después se registró la imagen tomando una foto al gel, para lo cual se utilizó un sistema de foto documentación EAGLE EYE II (Stratagene).

Las fotografías de los geles fueron analizadas utilizando el programa RFLPScan 2.1 (Scanalytics), mediante el cual se estimaron los pesos moleculares de los fragmentos amplificados, así como también los índices de similitud y polimorfismo en las dos diferentes poblaciones de gallinas.

Para el desarrollo de este trabajo fue necesario establecer un método de extracción de ADN de sangre de gallina. Se evaluaron diferentes técnicas para elegir de entre ellas aquella donde se obtuviera un ADN de buena calidad y en una cantidad adecuada para llevar a cabo los análisis correspondientes. Los métodos probados fueron: el uso de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) y la acción conjunta de lisozima y SDS, encontrando que de estos, el método que mayor y mejor cantidad de ADN reveló fue el uso de lisozima y SDS (datos no mostrados).

El uso de marcadores moleculares generados a partir de RAPD's se ha empleado en estudios en aves con anterioridad, y ha demostrado su utilidad para

tion at 45 cycles at the following conditions: 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min and 72 °C for 1 min⁽¹⁰⁾.

Amplification products were analyzed through electrophoresis in a 2 % agarose gel in a TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). To this gel, 0.5 μ l of ethidium bromide (10 mg/ml) were added for every 20 ml of agarose. Electrophoresis was carried out at 80 volts for 3 hours. The image was recorded by a photograph of the gel with an EAGLE EYE II (Stratagene) photo documentation system.

Gel photographs were analyzed with an RFLPScan 2.1 (Scanalytics) software, through which molecular weights of the amplified fragments were estimated, as well as similarity and polymorphism indices for the two hen populations.

To carry out this study a method for DNA extraction from poultry blood had to be settled on. Several techniques were evaluated to determine which provided good quality DNA in sufficient amounts to perform these tests. The methods tested were: CTAB (Cetyl tri-methyl ammonia bromide) and the joint action of lysozyme and SDS. Of the two, the second one provided a larger amount and better quality DNA (data not shown).

The use of molecular markers generated from RAPDs has been applied before in poultry studies, and its usefulness has been demonstrated when several populations were analyzed^(11,12,13). In this paper, the analysis of two native hen populations through the use of RAPDs as molecular markers is made described. A molecular marker possibly linked to the egg production character was obtained after random fragments were generated through the employment of an arbitrary oligonucleotide.

All six oligonucleotides were tested in a randomized pattern through amplification with a DNA hen blood sample. Criteria for choosing the oligonucleotide to be used was the amount of discrete fragments and their molecular weight. Results of this evaluation are shown in Figure 1, in which it can be appreciated that all oligonucleotides generated amplification

analizar diferentes poblaciones^(11,12,13). En este trabajo, se analizaron dos poblaciones de gallinas criollas mediante el uso de RAPD's como marcadores moleculares, se identificó un posible marcador molecular que aparentemente está ligado a la característica de producción de huevo, el cual se obtuvo después de generar fragmentos aleatorios mediante el uso de un oligonucleótido arbitrario.

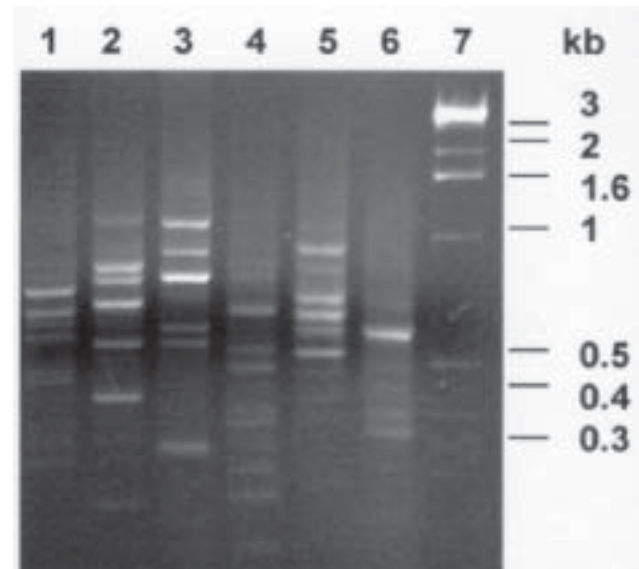
Se evaluaron los seis oligonucleótidos con diseño arbitrario a través de una amplificación con una muestra de ADN de sangre de gallina. El criterio de selección del oligonucleótido a utilizar fue el número de fragmentos discretos y al peso molecular de los mismos. Los resultados de esta evaluación se presentan en la Figura 1, donde se observa que todos los oligonucleótidos generaron productos de amplificación en el ADN de gallina. Se seleccionó de entre ellos el oligonucleótido 2 (5'-d[**GTTTCGC TCC**]-3') debido a que presentó el mejor rango de fragmentos respecto al tamaño de los productos (0.2 a 1 kb) y la cantidad de fragmentos que se generaron. Además, con el oligonucleótido 3 se obtuvo un buen número de fragmentos, sólo que no reúnen los requisitos señalados anteriormente, por lo que no se consideró para el análisis. Por otro lado, el oligonucleótido 5 pudiera ser un buen candidato a utilizar, aunque hay que señalar que el tamaño de los productos de amplificación presentó un rango estrecho.

A pesar de existir estudios del uso de marcadores moleculares en aves, las poblaciones criollas han quedado rezagadas en la aplicación de este tipo de herramientas que permitan identificar características productivas importantes, no obstante las capacidades que han demostrado tener estos organismos. Por citar un ejemplo, existen poblaciones de gallinas criollas con altos niveles de producción de huevo (20 huevos/mes), la cual es una producción similar a la que presentan las estirpes comerciales de postura⁽⁶⁾.

Una vez seleccionado el oligonucleótido 2, las 20 muestras de ADN de sangre de gallina fueron sometidas al proceso de RAPD's para obtener los distintos perfiles electroforéticos. Las fotografías

Figura 1. Perfil de amplificación obtenido con 6 oligonucleótidos al azar utilizando el ADN de gallina como templado

Figure 1. Amplification profile obtained with 6 oligonucleotides using poultry DNA as template



Lanes 1-6: oligonucleotides. Lane 7: molecular weight marker (1 kb, ladder, Gibco)

products in poultry DNA. Among the oligonucleotides, number 2 (5'-d[**GTTTCGC TCC**]-3) was chosen because it showed the best fragment range with regard to generated product size (0.2 kb to 1 kb) and quantity. Besides, even though with oligonucleotide 3 an acceptable number of fragments was obtained, they didn't meet the requirements already mentioned and therefore wasn't taken into account for this test. On the other hand, oligonucleotide 5 could be a good candidate, although it must be said that its amplification product size range was very small.

Although there are several studies on the use of molecular markers in poultry, native populations haven't been analyzed with these tools which allow to identify important productive characters, even though these birds show a great production capacity. Just to give an example, one can find native populations with high egg production levels (20 eggs/month), similar to those of laying hen commercial lineages⁽⁶⁾.

de los geles fueron analizadas mediante la utilización del “software RFLPScan 2.1”, con la finalidad de calcular los pesos moleculares de los fragmentos amplificados y los índices de similitud y polimorfismo.

En el Cuadro 1 se encuentra un resumen de los resultados del análisis de las dos poblaciones de gallinas, donde se observa que la población de gallinas con baja producción de huevo generó el mayor número de fragmentos, sin embargo presentó un índice de polimorfismo bajo y el rango más alto del tamaño molecular de los fragmentos generados.

Los resultados de los RAPD's para las poblaciones de gallinas con una producción máxima y baja de huevo, se presentan en las Figuras 2 y 3, respectivamente. Se observa que existen productos de ADN que se comparten entre y dentro de las poblaciones. Entre las poblaciones, los fragmentos conservados poseen tamaños moleculares de 0.6, 0.5, 0.4 y 0.2 kb. Sin embargo, destaca que la población de baja producción de huevo posee un producto de 1.1 kb, que está ausente en la otra población.

En la Figura 2 se presentan los productos de amplificación que se obtuvieron para los 10 individuos de la población de gallinas de producción alta de huevos (20 huevos/mes) utilizando el oligonucleótido 2. Las amplificaciones generadas están dentro del rango de 0.2 a 1 kb; sin embargo, sólo un individuo de esta población generó un producto de 1 kb (Figura 2, carril 4). Esta población presentó un índice de similitud de 70.1 %, debido a que se generaron un total de 57 fragmentos de los cuales

Once oligonucleotide 2 was chosen, the 20 DNA hen blood samples underwent the RAPDs process to obtain its electrophoretic profiles. Gel photographs were analyzed through the RFLPScan 2.1 software to estimate the molecular weight of the different amplified fragments and also similarity and polymorphism indices.

In Table 1 a summary of results of analysis of the two native hen populations is shown, and as can be seen, the population with low egg production generated the highest fragment quantity; however, the corresponding polymorphism index was low and the molecular size of the fragments was very high.

RAPDs results for hen populations with maximum and low egg production is shown in Figures 2 and 3. Some DNA products are shared among and inside the populations. Among populations, conserved fragments are of 0.6, 0.5, 0.4, and 0.2 kb size, while in the low production population a product of 1.1 kb can be found which is absent in the other.

In Figure 2, amplification products obtained for the 10 individuals comprising the high egg production population (20 eggs/month) using oligonucleotide 2 are shown. Generated amplification lie between the 0.2 and 1 kb range, however, only one individual generated a 1 kb product (Figure 2, lane 4). This population showed a 70.1 % similarity index, because of a total of 57 generated fragments, 40 were shared between individuals with the following weights: (0.2, 0.4, 0.5 and 0.6 kb.

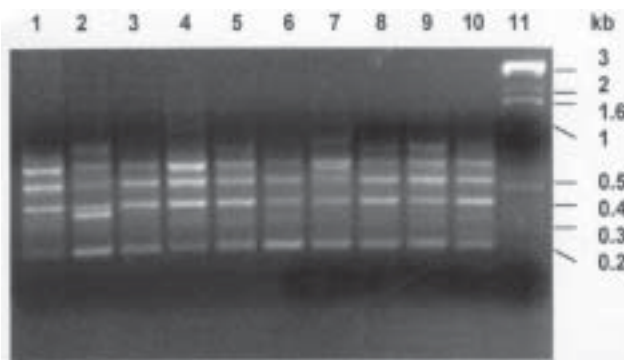
Cuadro 1. Resultados obtenidos de los análisis de los RAPD's de dos poblaciones de gallinas criollas (*Gallus domesticus*)

Table 1. Results obtained from RAPD's tests of two native hen populations (*Gallus domesticus*)

Population	Molecular size (kb)	Individuals (No.)	Polymorphism index (%)	Similarity index (%)	Total fragments	Total shared fragments (%)
Maximum egg production	0.2-1.00	10	29.82	70.18	57	40
Low egg production	0.2-1.10	10	25.37	74.63	67	50

Figura 2. Perfiles electroforéticos generados por el uso de RAPD's en la población de gallinas criollas (*Gallus domesticus*) de máxima producción de huevo (20 huevos/mes)

Figure 2. Electrophoretic profiles generated with RAPD's in a maximum egg production native hen (*Gallus domesticus*) population (20 eggs/month)



Lanes 1-10: evaluated individuals; Lane 11: molecular weight marker (kb).

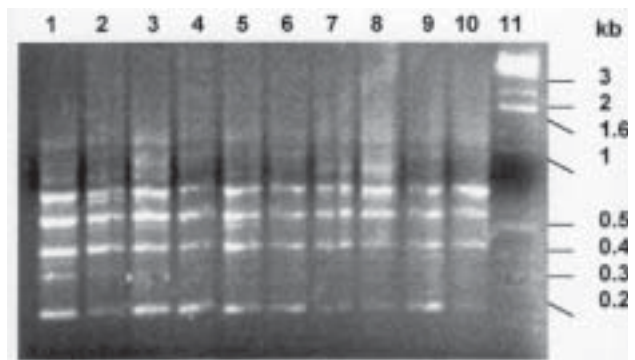
se comparten 40 entre los individuos, cuyos pesos son: 0.2, 0.4, 0.5 y 0.6 kb. Además, el 60 % de los individuos presentaron seis fragmentos (Figura 2, carriles 1-2 y 4-7), el 20 % cinco fragmentos (Figura 2, carriles 8-9), el 10 % siete fragmentos (Figura 2, carril 10) y el 10 % cuatro fragmentos (Figura 2, carril 3).

La segunda población analizada fue la de gallinas con baja producción de huevo (1 huevo/mes), y los productos amplificados se muestran en la Figura 3. Los fragmentos presentaron pesos moleculares en el rango de 0.2 a 1.1 kb. Esta población generó un total de 67 fragmentos, de los cuales comparte 50, siendo estos de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 y 1.1 kb, lo que indica que tiene un índice de similitud de 74.6 %, cifra que sugiere que la población es homogénea. Además, esta población presenta un 30 % de individuos que generaron ocho fragmentos (Figura 3, carriles 1-3), un 20 % generó siete fragmentos (Figura 3, carriles 5 y 9), el 40 % generó seis fragmentos (Figura 3, carriles 4 y 6-8) y el 10 % amplificó cinco fragmentos (Figura 3, carril 10).

El nivel de polimorfismo detectado dentro de las

Figura 3. Perfiles electroforéticos generados por el uso de RAPD's en la población de gallinas criollas (*Gallus domesticus*) con baja producción de huevo (1 huevo/mes)

Figure 3. Electrophoretic profiles generated with RAPD's in a low egg production native hen (*Gallus domesticus*) population (1 egg/month)



Lanes 1-10: evaluated individuals; Lane 11: molecular weight marker (kb).

Furthermore, 60 % of the individuals presented six fragments (Figure 2, lanes 1-2 and 4-7), 20 % five fragments (Figure 2, lanes 8-9), 10 % seven fragments (Figure 2, lane 10) and 10 % four fragments (Figure 2, lane 3).

The second population to be analyzed was that of low egg production (1 egg/month) and the amplified products are shown in Figure 3. These fragments showed molecular weights in the 0.2 to 1.1 kb range. This population generated a total of 67 fragments, of which 50 are shared being of 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 and 1.1 kb in size, which indicates a 74 % similarity index, which suggests an homogeneous population. Furthermore, 30 % of this population generated eight fragments (Figure 3, lanes 1-3), 20 % generated seven fragments (Figure 3, lanes 5 and 9), 40 % generated six fragments (figure 3, lanes 4 and 6-8) and 10 % amplified five fragments (Figure 3, lane 10).

The polymorphism level detected inside the evaluated native hen populations, indicates the presence of homogeneity, especially in the low egg production population. This is an unexpected result,

poblaciones de gallinas criollas evaluadas, muestra que existe homogeneidad, sobre todo en la población de gallinas de baja producción de huevo. Este fue un resultado inesperado, ya que se trata de animales con una amplia diversidad de características fenotípicas, como son el color, peso, tamaño, plumaje, etc., además de provenir de distintos orígenes, lo que indicaría su gran variabilidad genética. Además, la población de gallinas de baja producción de huevo podría considerarse como una población de aves no seleccionadas, con relación a la otra población que presenta una mayor producción, a pesar de tratarse del mismo tipo de animales⁽⁶⁾.

En el análisis de estirpes comerciales de gallinas se han utilizado con éxito distintos tipos de marcadores moleculares, con los cuales se han realizado estudios de relaciones filogenéticas y caracterizaciones de acuerdo a la productividad^(12,13,14). Los estudios de relaciones filogenéticas indican que el polimorfismo generado dentro de las poblaciones fue menor que el generado entre ellas; estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. Los índices de polimorfismo detectados fueron: 29.8 y 25.3 % para las poblaciones de gallinas con alta y baja producción de huevo, respectivamente, lo cual indica que se trata de poblaciones homogéneas, a pesar de no provenir de una misma línea genética.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la diferencia evidente entre las dos poblaciones de gallinas es un producto de 1.1 kb que presentan todos los individuos de la población de baja producción de huevo, y que no está presente en ningún individuo de la otra población. Este fragmento es un candidato a ser un posible marcador que caracterice a todas aquellas gallinas que sean malas ponedoras; o bien, que la ausencia del mismo determine que las gallinas pueden llegar a tener una producción de huevo buena; sin embargo, aún es necesario llevar a cabo otro tipo de estudios, por ejemplo, análisis Southern o bien una evaluación con un tamaño de muestra mayor para proponer su uso como tal. Por lo señalado, los RAPD's resultan ser una técnica útil, que con el auxilio de otras herramientas alternas se pueden llegar a obtener o generar elementos

as these animals show a wide variety of phenotypic characteristics, such as weight, color, plumage, etc. besides being of diverse origins, which implies a high genetic variability. Besides, the low egg production hens could be considered as a non-improved poultry population relative to the other, which shows higher productivity, even though they are of the same type⁽⁶⁾.

When commercial lineages are analyzed, several genetic markers have been used successfully, for studies related to phylogenetic relationships and characterizations according to productivity^(12, 13,14). Studies on phylogenetic relationships indicate that polymorphism generated inside populations was smaller than the one generated between them, and these results agree with the ones obtained in this study. The polymorphism indices obtained were 29.8 and 25.3 % respectively for the high and low egg production populations, which indicates homogeneous populations, even though they don't come from the same genetic line.

According to the results obtained in this study, the main difference between the two populations is a 1.1 kb product which is present in all the individuals of the low egg production population and absent in all the individuals of the other population. This fragment is a possible candidate as a marker for characterization of bad laying hens, or, its absence could determine the possibility of a good egg production. However, other type of studies should be performed, such as a Southern test or an evaluation carried out on a larger population before its use could be proposed. RAPDs is a useful technique, which when used in combination with other tools, could produce or generate molecular elements of great value for identifying productive characters.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. Aureliano Juárez-Caratachea for his help in the collection of blood samples, and for native hen production data.

moleculares de gran valor para la identificación de características productivas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Aureliano Juárez Caratachea por la ayuda brindada en la colecta de las muestras de sangre y los datos de producción de las gallinas criollas.

LITERATURA CITADA

1. Orozco F. Genética de caracteres cualitativos. En: Razas de gallinas españolas. Madrid, España. Ed. Mundi-Prensa; 1989:30-40.
2. Segura CJC. Rescate genético y fomento avícola de las aves indias o criollas en México. Reunión de producción animal tropical, CEICADES, Tabasco 1989:44-46.
3. Rosado AA. Mejoramiento de la avicultura rural en México. Acontecer Avícola 1999;VI(35):62.
4. Franco A, Franco LF. La gallina criolla, generalidades y perspectivas. Zootecnia 1989;2:713.
5. Segura CJC, López BL. Crecimiento y producción de huevo de gallinas criollas bajo un sistema de manejo intensivo en Yucatán. XIX Convención nacional ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, México 1994:285-287.
6. Juárez CA, Manríquez AJA, Segura CJC. Rasgos de apariencia fenotípica en la avicultura rural de los municipios de la Rivera del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México [en línea]. *Livest Res Rural Develop* 2000;12(1).
7. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-6535.
8. Simpson J. Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 1997;60:73-76.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press; 2001.
10. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short protocols in molecular biology*. 4th ed. USA: Wiley & Sons, Inc; 1999.
11. Levin I, Crittenden LB, Dogson JB. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics* 1993;16:224-230.
12. Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor KE. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. *Poult Sci* 1996;75:579-584.
13. Wei R, Dentine MR, Bitgood JJ. Random amplified polymorphic DNA markers in crosses between inbred lines of Rhode Island red and White Leghorn chickens. *Anim Genet* 1997;28(4):291-294.
14. Cheng HH, Levin I, Vallejo RL, Khatib H, Dodgson JB, Crittenden LB, Hillel J. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poult Sci* 1995;74(11):1855-1874.

