



Universidad
Politécnica
de Cartagena



Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



*Máster Universitario
en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario*

Genética del color del plumaje de la gallina como herramienta de certificación de raza: La gallina Murciana como caso de estudio

Autore: Michele Montalto

Dirección: Eva Armero Ibáñez

Cartagena, 14/06/2021

Declaración de Honestidad Académica

El alumno D. **Montalto Michele**, con DNI **AY7032210**,

como autor del TFE de título **Genética del color del plumaje de la gallina como herramienta de certificación de raza: La gallina Murciana como caso de estudio**

dirigido por Dña. **Armero Ibañez Eva**

para la obtención del título

- Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas Biológicos
- Máster Universitario en Ingeniería Agronómica
- Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

DECLARA:

- Que el mencionado TFE es íntegramente de su autoría.
- Que se trata de un trabajo original e inédito en el que no existe plagio.
- Que en todo momento se respeta la propiedad intelectual y en ningún caso se han utilizado como propios resultados ni materiales obtenidos o generados por otros autores.
- Que los resultados y materiales realizados por otros autores han sido debidamente identificados en la memoria.
- Que se ha aplicado al texto íntegro del TFE el control antiplagio que establece la *Normativa de Trabajos Fin de Estudios en la ETSIA*, y acompaña esta declaración de las páginas primera y última del informe obtenido de Turnitin a través de Aul@Virtual.
- Qué los directores del TFE conocen y han dado el visto bueno a los resultados del control antiplagio y, en su caso, han informado en la forma que indica el documento *Política de Calidad y Código de Buenas Prácticas*.

Y para que así conste, firma la presente declaración en,

Cartagena, a 15 de junio de 2021

Fdo. **Montalto Michele**

Genética del color del plumaje de la gallina como herramienta de certificación de raza La gallina Murciana como caso de estudio

por MICHELE MONTALTO

Fecha de entrega: 14-jun-2021 09:44a.m. (UTC+0200)

Identificador de la entrega: 1606159636

Nombre del archivo:

61208_MICHELE_MONTALTO_Genetica_del_color_del_plumaje_de_la_gallina_como_herramienta_de_certificacion_de_raza_La_gallina_Murciana__1798351559.pdf
(1.98M)

Total de palabras: 11503

Total de caracteres: 62926

Genética del color del plumaje de la gallina como herramienta de certificación de raza La gallina Murciana como caso de estudio

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	docplayer.es Fuente de Internet	8%
2	gallinamurciana.org Fuente de Internet	1%
3	creativecommons.org Fuente de Internet	1%
4	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	1%
5	repositorio.bib.upct.es Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Universidad Carlos III de Madrid Trabajo del estudiante	1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Universidad de las Islas Baleares Trabajo del estudiante	1%
9	www.aida-itea.org Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 25 words

Excluir bibliografía

Activo

INFORME DE SIMILITUD DE TFM

Eva Armero Ibáñez, directora del Trabajo Fin de Máster del alumno Michele Montalto,

INFORMO QUE:

El grado de similitud encontrado en el TFM titulado "Genética del color del plumaje de la gallina como herramienta de certificación de raza: La gallina Murciana como caso de estudio" del 13 % gran parte se corresponde con metodología que está definida como tal o a descripciones morfológicas de los animales recogidas en el Boletín Oficial del Estado. Por lo que doy fe de la originalidad del trabajo y consiento a la presentación y defensa del presente TFM.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Cartagena a 15 de junio de 2019

**EVA ARMERO
IBÁÑEZ -
NIF:2016112
3J**

Firmado digitalmente por EVA
ARMERO IBÁÑEZ - NIF:20161123J
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=EVA ARMERO IBÁÑEZ -
NIF:20161123J,
serialNumber=20161123J,
givenName=EVA, sn=ARMERO
IBÁÑEZ, ou=CIUDADANOS,
o=ACCV, c=ES
Fecha: 2021.06.15 16:59:35
+02'00'

Directora de TFM

ÍNDICE

ÍNDICE	II
ABSTRACT	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 La coloración del plumaje de las gallinas.....	2
1.2 Aspectos bioquímicos de la coloración de las aves.....	2
1.3 Base molecular para la definición del color de las gallinas.....	4
1.4 El gen MC1R	5
1.5 Los genes modificadores.....	7
1.6 Otros marcadores moleculares que determinan el color del plumaje.....	12
1.7 La Gallina Murciana.....	12
2. OBJETIVOS	16
2. Objetivo del estudio	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Material animal.....	16
3.2 Descripción fenotípica de la raza Murciana	16
3.3 Extracción de ADN.....	20
3.4 Lectura de ADN con QUBIT	23
3.5 Amplificación de las secuencias de interés	24
3.6 Purificación de las secuencias amplificadas.....	27
3.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
3.8 Reacción de secuenciación.....	29
3.9 Análisis de cromatogramas con el software Chromas	31
3.10 Análisis de las alineaciones con software Jalview.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Lectura de ADN con QUBIT	33
4.2 Electroforesis en gel de agarosa	33
4.3 Análisis de electroforegramas con el software Chromas.....	34
4.4 Análisis de las alineaciones con software Jalview.....	35
5. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

ABSTRACT

This research aims to analyse the variations of the MC1R gene in two chicken breeds to expand the current knowledge in this area of study.

Specifically, the interest was directed to the analysis of chickens of the Murciana breed, a topic of great interest today for breeding and trade.

The first part of this thesis was directed to an analysis of the scientific context in which the study originated, with a description of the available evidence on the genetics of the transmission of the phenotypic character of the coloration of the plumage of chickens, the biochemical aspects involved, the involvement of specific genes with special reference to the MC1R gene and potential modifier genes. In addition, the most interesting aspects of the Murciana hen were presented.

In the second part of the thesis, however, the research project carried out was described, detailing the experimental phases carried out in the laboratory and the bioinformatic analyses that were carried out to identify the identified polymorphisms.

The research was based on the already known indications that are available in the scientific literature on the participation of the MC1R gene in the determination of the melanin pigment distribution in the plumage of chickens and led to the identification and confirmation of several polymorphisms that had also been described. in previous studies aimed at analysing other breeds of chickens.

Although this research has some limitations (such as the number of samples analysed), it is the basis for the development of future analyses carried out on larger samples that can add greater significance to the results obtained so far.

RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo analizar las variaciones del gen MC1R en dos razas de pollos para ampliar los conocimientos actuales en esta área de estudio.

En concreto, el interés se dirigió al análisis de gallina de la raza Murciana, tema de gran interés en la actualidad para la cría y el comercio.

La primera parte de esta tesis estuvo dirigida a un análisis del contexto científico en el que se originó el estudio, con una descripción de la evidencia disponible sobre la genética de la transmisión del carácter fenotípico de la coloración del plumaje de pollos, los aspectos bioquímicos involucrados, la participación de genes específicos con especial referencia al gen MC1R y los genes modificadores potenciales. Además, se presentaron los aspectos más interesantes de la gallina de raza murciana.

En la segunda parte de la tesis, sin embargo, se describió el proyecto de investigación realizado, detallando las fases experimentales realizadas en el laboratorio y los análisis bioinformáticos que se realizaron para identificar los polimorfismos identificados.

La investigación se basó en las indicaciones ya conocidas que están disponibles en la literatura científica sobre la participación del gen MC1R en la determinación de la distribución del pigmento melanina en el plumaje de pollos y condujo a la identificación y confirmación de varios polimorfismos que también habían sido descritos en estudios previos destinados a analizar otras razas de gallinas.

Si bien esta investigación tiene algunas limitaciones (como la cantidad de muestras analizadas), es la base para el desarrollo de análisis futuros que se realicen sobre muestras más grandes que puedan añadir mayor significación a los resultados obtenidos hasta el momento.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La coloración del plumaje de las gallinas.

El color del plumaje es una característica relevante del fenotipo de las aves, que a menudo también es decisivo para la asignación del animal a una raza en particular. De hecho, hace mucho tiempo, el color del plumaje formó la base para el desarrollo de sistemas de clasificación animal.

El color del plumaje, además de ser una característica física, determina - en la mayoría de las especies y razas - las formas en las que los animales se comunican entre sí y juegan un papel importante en la adaptación a las condiciones ambientales (Cott, 1940).

La identificación de la variedad de tipos de plumaje que se encuentran entre las aves se originó a partir de los efectos ejercidos por la presión de la selección natural (Roulin, 2004) y resulta de dos procesos físicos diferentes pero relacionados:

(a) se conocen mecanismos químicos que determinan la coloración como resultado de la producción de sustancias que absorben la luz a una determinada longitud de onda y forman los denominados pigmentos coloreados;

(b) el mecanismo óptico interviene debido a la interferencia de la luz reflejada por las microestructuras biológicas de las plumas, que determinan los colores estructurales (D'Alba et al., 2012).

En consecuencia, los dos procesos interactúan para determinar la variedad de color del plumaje de los animales.

En las aves, se describen tres grupos de pigmentos que dan variaciones en el color del plumaje y son la melanina, los carotenoides y los pigmentos de colores inusuales (por ejemplo, la porfirina). La mayoría de estos pigmentos están presentes solo en algunos grupos de aves (Lopes et al., 2016), mientras que los más comunes son las melaninas y los carotenoides. Las melaninas son generalmente más comunes (McGraw et al., 2004).

1.2 Aspectos bioquímicos de la coloración de las aves

Como se mencionó anteriormente, el pigmento más común en las aves es la melanina, de la que se pueden reconocer dos tipos: eumelanina y feomelanina. La eumelanina es una molécula más grande responsable de los tonos negros y marrones, mientras que la feomelanina es responsable de los tonos amarillo rojizo. Estos pigmentos se producen de forma endógena en los tejidos periféricos mediante la acción de células melanocíticas especializadas.

Los melanocitos son las células más comunes en la piel, el cabello, los folículos de las plumas y los ojos (Dupin, Le Douarin, 2003), pero también se encuentran en el oído interno, el esófago, la glándula tiroides, los huesos y el corazón. e incluso el cerebro (Zucca et al., 2014).

En mamíferos y aves, la melanina se produce en pequeños orgánulos llamados melanosomas, que contienen todas las enzimas necesarias para el proceso de pigmentación. Dependiendo de la estructura y ubicación de los melanosomas, el color del plumaje de las aves puede ser variable (Maia et al., 2013).

Las melaninas aviares están formadas por el aminoácido aromático tirosina (Lerner, Fitzpatrick, 1950) y, a través de la enzima tirosinasa, se cataliza la oxidación inicial de tirosina a dopaquinona, molécula intermedia para la síntesis de ambos tipos de melanina. La vía metabólica activada tras la producción de este intermedio determina la síntesis de uno u otro pigmento, ya que si se activan las enzimas adicionales TRP1 (*Tyrosinase related protein 1*) y TRP2 (*Tyrosinase-related protein-2*) / DCT (*Dopachrome tautomerase*) se producirá la síntesis de eumelanina negra. Además del control molecular, la melanogénesis también puede verse influenciada por condiciones ambientales o fisiológicas específicas y, por lo tanto, el color del plumaje dependerá de la estación, el sexo y otros factores variables.

En este sentido, se enfatiza que la expresión de melanina está influenciada por cuatro clases de hormonas (andrógenos, estrógenos, hormonas pituitarias y hormonas tiroideas). Además, la melanina puede interactuar con otros pigmentos, dando lugar a la posible manifestación compleja del color de las plumas (Rzepka et al., 2016).

El pigmento amarillo del plumaje, por otro lado, requiere la presencia de un aminoácido adicional, la cisteína, pero también la expresión de este pigmento puede estar influenciada por otros factores concomitantes (Ancans et al., 2001) o por la modulación cuantitativa de tirosinasa en términos de concentración o actividad (Ito et al., 2000). Por el contrario, una mayor expresión de TRP1 y TRP2 / DCT se relaciona con la presentación de una pigmentación oscura en muchas aves como gallinas, patos, codornices, palomas y gansos (Galvan et al., 2017).

La figura 1 muestra la anatomía del folículo de la pluma durante las fases de reposo y crecimiento.

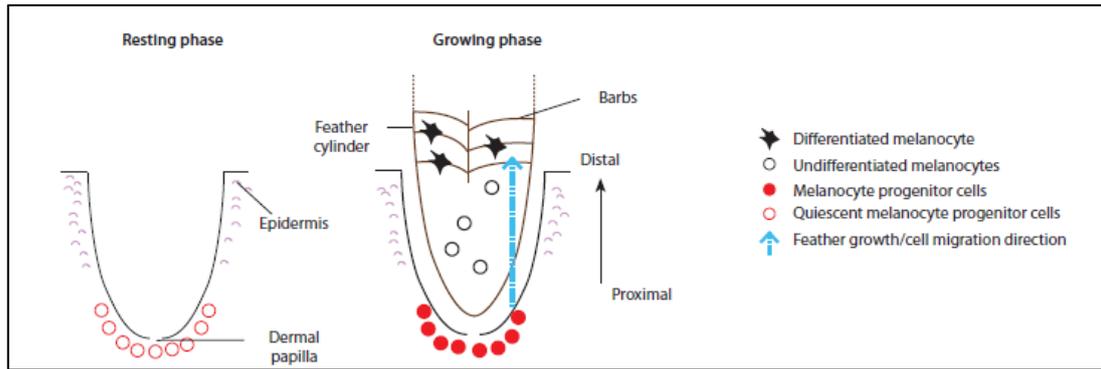


Figura 1. Anatomía del folículo de la pluma durante la fase de reposo y crecimiento (Schwochow-Thalmann, 2018).

1.3 Base molecular para la definición del color de las gallinas

En gallinas, el color del plumaje puede representar un marcador genético, útil para la identificación de razas, poblaciones y grupos reproductivos con sus respectivas características (Moiseyeva et al., 2012; Mitrofanova et al., 2017).

Dada la diversidad de expresión de los pigmentos de las aves y sus funciones, comprender la base molecular de la presentación del color de las plumas sigue siendo un objeto de investigación científica en la actualidad. Hasta la fecha, el mayor conocimiento que brindan los estudios sectoriales es inherente al conocimiento de los procesos moleculares que subyacen a la síntesis de melanina.

El proceso de melanogénesis se divide en diferentes fases que involucran múltiples loci genéticos que contribuyen a la compleja expresión de los genes del color del plumaje de las aves (Doucet et al., 2004).

Los estudios moleculares realizados en mamíferos y aves han demostrado que el locus identificado como responsable de la expresión del color negro codifica el receptor de melanocortina 1 (MC1R) (Takeuchi et al., 1996; Mundy, 2005).

Este receptor se encuentra a nivel de la membrana de los melanocitos y está codificado por un gen pequeño (menos de 1000 pb de longitud).

Cuando este receptor se une a su antagonista (α MSH) se produce un cambio en la conformación del receptor y la activación de la adenilciclase que provoca la transición del ATP para formar AMP cíclico que, a su vez, conduce a la activación de CREB (cAMP response element-binding protein), MITF (microphthalmia-associated transcription factor) y factores de transcripción (Schiaffino, 2010).

Una mayor actividad de MC1R generalmente resulta en una pigmentación más oscura, mientras que una menor actividad de este receptor contribuye a la producción de feomelanina. (Garcia-Borron et al., 2005).

El mecanismo genético-molecular de la expresión de un tipo particular de color aún no se comprende del todo en la actualidad, ya que actualmente existen varios genes identificados con el efecto de influir en este rasgo fenotípico. Algunos genes causan efectos primarios sobre la variedad de colores, otros desempeñan el papel de modificadores y reguladores que influyen en la distribución zonal del pigmento, así como en su distribución dentro de las plumas individuales (bandas, manchas, bordes y otros patrones) (Yurchenko et al., 2015).

1.4 El gen MC1R

La distribución básica o zonal de la eumelanina en el cuerpo del pollo está determinada por mutaciones en el gen *MC1R*, que conducen a un cambio en la activación del receptor, que son la base de las diferentes opciones de color asociadas con el locus E en gallinas (Smyth, 1990; Hoque et al., 2013).

El locus E reconoce la presencia de varios alelos, entre los que se incluyen:

- E - plumaje negro (*Minorca, Black Australorp, Pantsirevskaya*);
- E^R - negro restringido (*Yurlov crower*);
- e^{Wh} - trigueño dominante (*New Hampshire*);
- e⁺ - color de tipo selvaje (*Italian Partridge*);
- e^b - marrón (*Zagorsk salmon, Faverol*);
- e^{bc} - crema (*Sicilian Buttercup*);
- e^y - trigueño recesivo (*Rhode Island*).

La serie alélica presentada tiene el siguiente orden de dominancia: E > E^R > e⁺ > e^{Wh} > e^b > e^{bc} > e^y.

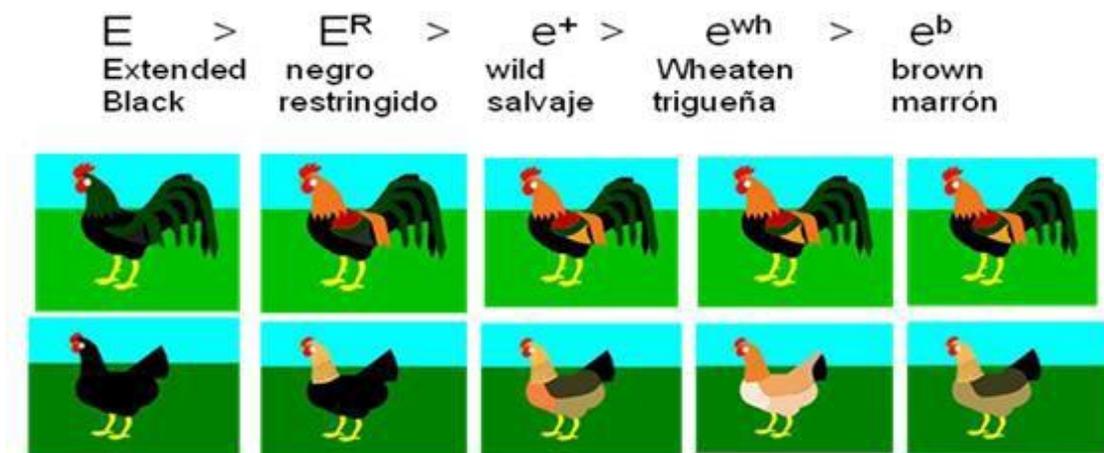


Figura 2. Representación de las cinco variedades alélicas más comunes del locus E (<http://kippenjungle.nl/kruising.html>)

Las figuras 2 y 3 muestra los colores del plumaje determinados por las diversas formas alélicas del locus E descritas anteriormente.

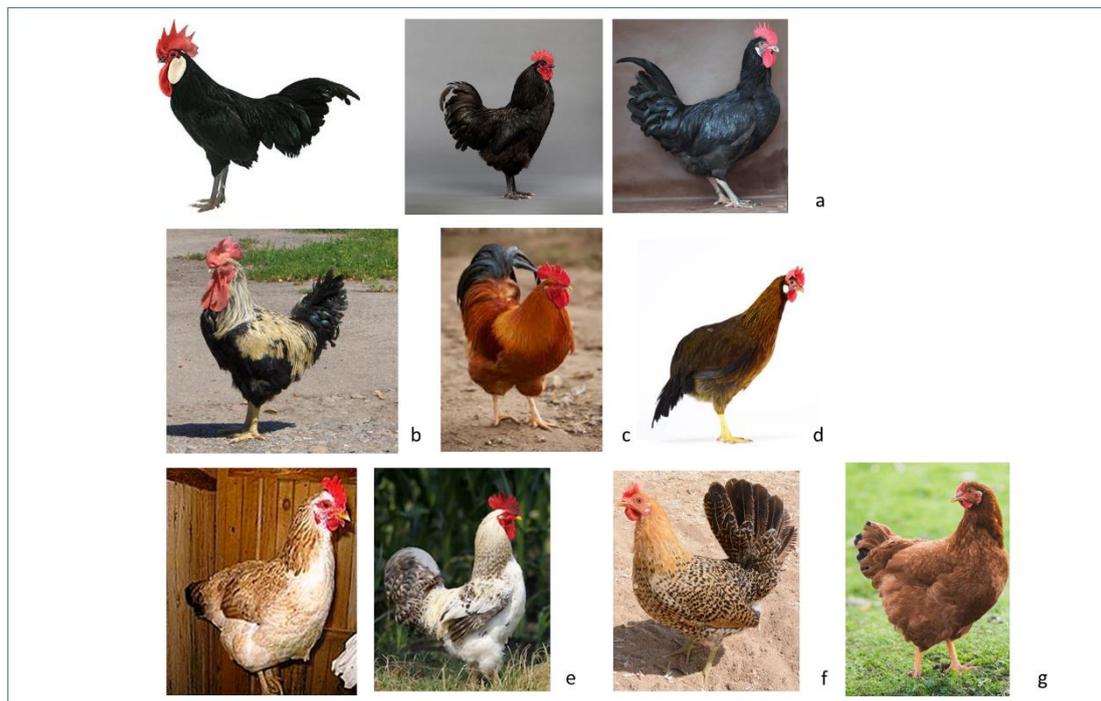


Figura 3. Colores del plumaje. (a) Minorca, Black Australorp, Pantsirevskaya; (b) Yurlov crower; (c) New Hampshire; (d) Italian Partridge; (e) Zagorsk salmon, Faverol; (f) Sicilian Buttercup; (g) Rhode Island.

La presencia de estos alelos influye en la distribución de los pigmentos de melanina (eumelanina y feomelanina) en las plumas de la gallina (Davila et al., 2014).

La biosíntesis y los tipos de melanina producidos están influenciados por la actividad de la tirosinasa (Chang et al., 2006). Se ha encontrado que la falta de función de esta enzima conduce a una pérdida completa de melanina en la piel, plumas, retina y provoca albinismo en varias especies animales.

La tirosinasa es una enzima importante en la biogénesis de la melanina (Niwa et al., 2002). En Liu et al. (2010), los genes de la tirosinasa (TYR) y la melanocortina 1 (MC1R) fueron reconocidos como los principales genes involucrados en la pigmentación del plumaje en gallinas. Desde el nacimiento del animal hasta los 112 días, se identificaron los perfiles de cambio de color del plumaje en los niveles de expresión génica de TYR y MC1R. En particular, el nivel de expresión de TYR fue más alto a la edad de 1 día y luego disminuyó drásticamente durante los períodos posteriores; el nivel de expresión de MC1R fue mayor el día 28 que en los otros puntos estudiados.

Además, la expresión de TYR en gallinas portadoras de los alelos E / E y E / e del locus MC1R fue mayor desde el nacimiento hasta los 28 días que los portadores de alelos e / e. Estos estudios han demostrado que los mecanismos que afectan el color de las plumas en gallinas de 1 día y los que regulan el color del plumaje en la vejez son diferentes.

Aunque el gen TYR está en interacción con el gen MC1R para la determinación del color del plumaje, los diferentes fenotipos observables no corresponden a las diferentes clases de genotipos para los genes TYR e MC1R (Liu et al., 2010).

De los estudios experimentales descritos se desprende claramente que los genes MC1R y TYR representan la base genética molecular para la formación del plumaje de color en las gallinas. Sin embargo, como se describirá a continuación, otros genes intervienen en la expresión fenotípica y constituyen modificadores de su expresión.

1.5 Los genes modificadores

Los cambios en el color del plumaje de las gallinas, definidos por cualquier genotipo en el locus E, pueden ser modulados por la interacción del alelo dominante I (inhibition), que inhibe la expresión de eumelanina, destruyendo los melanocitos.

El locus I está asociado con el gen PMEL17 (Melanocyte protein), ubicado en el cromosoma 33 en gallinas, codifica proteínas específicas de melanocitos, importantes para el desarrollo normal de los melanomas (Natt et al., 2007).

El locus tiene cuatro alelos diferentes:

- blanco dominante (I),
- *smoky* (IS),
- alelo que restaura parcialmente la pigmentación y da un fenotipo grisáceo, recesivo para el blanco dominante, pero parcialmente dominante para el alelo *wild type* (i),
- *Dun* (ID) solo inhibe la expresión de eumelanina y hace que el color sea marrón (Gaudet et al., 2011).

El blanco dominante se encontró en White Leghorn y se asoció con la inserción de 9 pb en el exón 10 del gen PMEL17, lo que resultó en la introducción de tres aminoácidos en la región transmembrana del producto codificado.

De manera similar, se detectó la delección de cinco aminoácidos en la región transmembrana en una proteína codificada por Dun.

El alelo smoky se identificó en White Leghorn e incluye tanto la inserción de 9 pb en el exón 10 como la delección de 12 nucleótidos en el exón 6.

La mutación marrón oscuro (Db, dark brown) en gallinas reduce la expresión de eumelanina negra y aumenta la expresión de feomelanina roja, pero solo en algunas partes del plumaje.

Gunnarsson et al. (2011) sugirió la asociación del fenotipo Db con la delección de 8,3 kb ubicada 14 kb por encima del gen SOX10 en el cromosoma 1, que es un factor de transcripción importante en los melanocitos y algunos otros tipos de células.

El mecanismo de acción de esta mutación sugiere que la delección descrita conduce a una disminución en la expresión del gen SOX10, que a su vez reduce la expresión de enzimas clave en la síntesis de pigmentos, como la tirosinasa. El alelo DB es particularmente interesante porque afecta la naturaleza de la pigmentación más que la presencia o ausencia de pigmentación.

Otro gen que afecta la expresión de tirosinasa es el gen MLPH (Melanophilin) (Xu et al., 2016). Vaez et al. (2008) estudiaron la coloración azul (LAV = lavanda) del plumaje de pollo sobre la base de análisis de ortología con el gen conocido de los ratones. Este análisis condujo a la identificación de un polimorfismo de un solo nucleótido que reduce la expresión del gen color E.

Además de la pigmentación principal, se observa que la pigmentación secundaria del plumaje está determinada por la presencia de manchas blancas o distribución específica de eumelanina en las plumas individuales (Smyth, 1990). Los estudios de genética molecular realizados recientemente sobre el tema han ampliado enormemente el conocimiento de los

mecanismos genéticos para determinar la tinción secundaria. En algunas razas de gallinas se encuentra un color heterogéneo del plumaje, con una coloración jaspeada que se ha asociado a una mutación del receptor de endotelina B2 (EDNRB2) ubicado en el cromosoma 4 (Kinoshita et al., 2014). Estos estudios encontraron un polimorfismo en la región codificante de EDNRB2, que conduce a la sustitución Arg332His, asociada con el locus mo “molting”.

Otra mutación de G1008T se ha asociado con provocar la sustitución del aminoácido Cys244Phe en el exón 5 y dar como resultado la síntesis de proteínas no funcionales que se unen a la endotelina. Como consecuencia de esta sustitución, existe una variación en la diferenciación, proliferación y migración de melanocitos. El plumaje de las gallinas mo^w/mo^w se aclara, casi alcanza el color blanco con varias plumas parcialmente pigmentadas. Los análisis realizados sobre el tema mostraron que este fenotipo no está asociado al gen de la tirosinasa y mostró un tipo de herencia autosómico recesivo frente al fenotipo pigmentado. A diferencia de los albinos, las gallinas mutantes mo^w/mo^w tienen coloración del iris de los ojos y algunas manchas pigmentadas de color amarillo blancuzco.

Los resultados de la investigación indican que la activación EDN3 (endotelina 3) - EDNRB2 es un mecanismo necesario para que se produzca una pigmentación normal en las aves (Kinoshita et al., 2014).

En las razas modernas de gallinas, a menudo se encuentra un color rayado del plumaje, relacionado con el sexo, caracterizado por una raya completamente blanca en el fondo principal del plumaje y causada por el llamado efecto barring o barrado.

Se observa un aclaramiento del color tanto en el plumaje de las aves adultas como en la pelusa de las gallinas recién nacidos (Campo, 1991; Dorshorst, Ashwell, 2009).

La coloración ligada al sexo está determinada por el locus B barrado asociado con el gen CDKN2A (Hellström et al., 2010, 2011). El locus B afecta el aclaramiento del pigmento dérmico y el pico y limita la propagación del pigmento negro, dando como resultado una pluma rayada (Jerome, 1939). Dado que el gen B se encuentra en el cromosoma Z, solo puede ser homocigoto en los gallos y heterocigótico en las gallinas. El grado de debilitamiento de la pigmentación depende del estado homo o heterocigoto del alelo (Kogan, 1979).

En los estudios de Di Schwochow Thalmann et al. (2017) Se encontró que el patrón de rayas del plumaje ligado al sexo en gallinas estaba asociado con dos mutaciones no codificantes y dos mutaciones codificantes que afectan la transcripción de ARF (Alternate Reading Frame) en el locus supresor de tumores CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2^a). Estas mutaciones forman cuatro alelos funcionalmente diferentes - BN, B1, B2 e B0. La última variante alélica se caracteriza por una reducción extrema de los niveles de melanina (Schwochow Thalmann et al., 2017). Estas variantes alélicas se formaron a partir de

cuatro SNP ubicados en una región de 12 kb que comprende el exón 1 de CDKN2A. Dos de los SNP identificados se encuentran en regiones no codificantes, SNP1 en el promotor y SNP2 en el intrón 1. Los otros dos SNP son mutaciones con cambio de sentido. SNP3 provoca la sustitución de valina por ácido aspártico (V9D), mientras que SNP4 provoca la sustitución de arginina por cisteína (R10C).

El haplotipo B1 incluye SNP1, SNP2, SNP3. El haplotipo B2 incluye SNP1, SNP2, SNP4 e B0 - SNP1, SNP2.

Además del color rayado del plumaje ligado al sexo, se ha identificado un patrón hereditario autosómico que lleva a la expresión de rayas en el plumaje en gallinas.

La presencia de rayas negras oscuras sobre fondo blanco o rojo, en este caso, se induce, probablemente, no por bloqueo, sino por aumento de la melanogénesis en contraste con el color determinado por las variantes recesivas E

El cambio en el tipo de color del plumaje depende, en gran parte, de los cambios en el número de plumas con eumelanina y feomelanina (Guernsey et al., 2013), que puede crear varias variaciones en el plumaje básico. Por ejemplo, el color marrón en diferentes razas de gallinas varía de marrón oscuro a dorado o amarillo pálido.

Los genes que regulan la variabilidad del color pueden tener un efecto pleiotrópico e influir en otros rasgos económicamente útiles en las gallinas. Puede utilizarse como indicador de la intensidad del crecimiento y para la identificación de algunas patologías típicas de las aves.

Por ejemplo, el gen del receptor de endotelina EDNRB2 está asociado con la capacidad de las gallinas tibetanas para adaptarse a la hipoxia en condiciones de montaña (Zhang et al., 2017). El polimorfismo en el promotor del gen de la tirosinasa TYR da como resultado piel y huesos negros en las gallinas, lo cual es importante en la selección de aves reproductoras que poseen estos rasgos (Yu et al., 2017).

Las interacciones entre los genes de la pigmentación y el medio ambiente pueden contribuir a la formación de melanoma y tumores (Ibarrola-Villava et al., 2012).

La tabla 1 muestra las características de los loci mapeados en los cromosomas de las gallinas y determina las variantes básicas del color del plumaje y también enumera los principales genes involucrados en los procesos de pigmentación del plumaje de estos animales (Makarova et al., 2019)

Tabla 1. Loci que influyen en los tipos básicos de plumaje de las gallinas

Locus	Cromosoma	Genotipo	Colore	Razza
MC1R	11	E	Negro	Minorca, Australorp Black
		E ^R	Abedul	Yurlov Crower
		e ^{Wh}	Trigueño dominante	New Hampshire
		e ⁺	Tipo salvaje	Leghorn Light Brown (Italian Partridge)
		e ^b	Marrón	Zagorsk Salmon, Faverolles
		e ^{bc}	Marrón crema	Buttercup
		e ^y	Trigueño recesivo	Alcune linee di Rhode Island
EDN3	20	FM	Pigmentación negra intensa del tejido conectivo interno y la piel externa	Silkie White
SOX10	1	Db	Marrón oscuro	Friesian Fowl
CDKN2A	Z	B0	Blanco	Cruce Junglefowl rosso y White Leghorn
		B1	Barrado (rayas blancas y pigmentadas)	Plymouth Rock
		B2	Macho blanco y gallina rayada	Cruce entre Red Junglefowl y White Leghorn
PMEL17	33	I (dominante blanco)	Blanco con rojo/marrón	White Leghorn
		D	Mas claro del <i>wild type</i>	Dun
		S	<i>Smoky</i>	Smoky
SLC45A2	Z	A1	Blanco	Incrocio tra Junglefowl rosso e White Leghorn
		S	Plateado	Yurlov Crower
MLPH	7	LAV*L	Lavanda	Orpington
TYR	1	C*C	Blanco	Silkie White
		c ^a	Blanco	White Leghorn
EDNRB2	4	mo ^w	Blanco recesivo	Minohiki
		mo	Moteada	Cochin Dwarf, Australorp Black Speckled

(Makarova et al., 2019).

1.6 Otros marcadores moleculares que determinan el color del plumaje

Recientemente se han realizado estudios para evaluar los efectos de la asociación genome-wide (GWAS) de plumaje negro con únicos SNP (single nucleotide polymorphism). Park et al. (2013) encontraron 12 SNP significativamente asociados con los colores del plumaje. En particular, se identificó un SNP (rs14339964) en la región del intrón de AKT3 (AKT serine/threonine kinase 3), ubicado en el cromosoma 3, que se sabe que es uno de los genes clave en la formación de células de melanoma (Tsao et al., 2012). Este hallazgo llevó a los autores a plantear la hipótesis de que las mutaciones en AKT3 se pueden asociar a la expresión de la pigmentación del plumaje. Otros dos SNP (GGaluGA344987 y rs14641648 en los cromosomas 3 y 8, respectivamente) se encuentran en la región intergénica cerca de los genes KRT7 (keratin 7) y PAP2 (phytochrome-associated protein 2), también asociados con la expresión de pigmentación. PAP2 es conocido por su papel en el aumento del nivel de pigmentación (Shan et al., 2009) y KRT7 pertenece a los genes de la familia de la queratina y está asociado con tumores de melanocitos (Blum et al., 2010).

Además, el polimorfismo detectado en el intrón del gen DDX6 (DEAD-box helicase 6) también puede estar asociado con la tinción, ya que es un gen cuyo papel está bien establecido en la determinación del vitíligo, una enfermedad cutánea conocida (Tang et al., 2012).

Yang et al. (2017) identificaron 13 SNP significativos en 10 genes que probablemente influyen en la síntesis de eumelanina, a saber, los genes SHH (sonic hedgehog signaling molecule) y NUA1 (NUAK family kinase). Basándose en estudios previos, han sugerido que los genes de la quinasa NUA1 y el gen de señalización SHH pueden desempeñar un papel en el desarrollo de las células de melanoblastos durante el período embrionario, afectando también a la pigmentación de las plumas.

1.7 La Gallina Murciana

Las primeras referencias escritas obtenidas sobre la raza murciana se identifican en el escrito del profesor Ramón J. Crespo (1941) en una enciclopedia cuyo primer volumen está dedicado a la avicultura. La raza fue constituida por el ingeniero director de la Estación Pecuaria Central, profesor D. Zacarías Salazar y Mouliá, recorriendo los parajes de la vega murciana, donde los campesinos criaban los mejores tipos de gallinas, y recogiendo los ejemplares mejor desarrollados y de buena conformación.

Este primer material se trasladó a la Estación Pecuaria donde, por selección, se terminó de definir la raza. La gallina tiene dos variedades, la trigueña y la plateada.

La Murciana es una raza del Tronco mediterráneo, desde el punto de vista productivo es una gallina considerada ligera. El peso del gallo puede variar de 3,40 a 3,75 kg mientras que el de la gallina de 2,30 a 2,60 kg. Es poco productora de huevos (aproximadamente 100 al año, con un huevo de tamaño mediano, de al menos 50 gramos, con una cáscara de color crema rosado. y un ritmo de crecimiento lento.

El objetivo general del programa de mejora de gallinas murcianas es llevar a cabo su recuperación y conservación, aumentando el censo de animales según estándares de raza, evitando la endogamia, deriva genética y pérdida de variabilidad genética.

En la tabla 2 se muestra el censo de animales de los últimos años, y se observa que desde 2010 hasta el 2014 el censo de animales era superior y después ha descendido hasta el valor de 472 animales registrados en 2020. En ningún caso, la raza no supera los 1000 animales por lo que se considera en peligro de extinción.

Tabla 1. Número de gallinas murcianas a lo largo de los años.

Ano	Censo
2009	315
2010	800
2011	840
2012	740
2014	782
2015	357
2016	168
2017	130
2018	187
2019	267
2020	472

Fuente:<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/>

En cuanto a la variabilidad dentro de la raza, los criadores han observado que existe una diferenciación entre dos líneas que va más allá del color del plumaje. En concreto, se constató que existe una línea de mayor formato con gallos que se acercan a los 3,75 kilos y suelen ser más oscuros y esta línea está más asociada a la Vega Murciana. También hay una

segunda línea de formato más pequeño con gallos más cercanos a los 3 kilos y que suelen ser más plateados y esta línea está más relacionada con el Valle del Guadalentín.

Por otro lado, se observa que la variabilidad genética para el estándar de la raza es actualmente alta, por lo que en la descendencia de los cruces realizados se observan animales de diferente color de plumaje con gallos completamente negros, cenicientos o completamente rojos, lo que lleva plantear la hipótesis de que este tipo de animales se deriva de cruces con animales de otras razas (Agamur, 2016).

Las características del gallo y la gallina murcianos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Características de la gallina y el gallo de raza murciana

Característica	Gallo	Gallina
Cabeza	Grande y ancha	Las mismas características que el gallo
Cara	Lisa y de color rojo vivo	Las mismas características que el gallo
Cresta	Sencilla, grande, derecha y con dientes bien definidos, en número de 5 a 7 y perpendiculares a la curva de la cabeza, con el espolón pegado a la línea del cuello y de color rojo vivo	Algo caída hacia un lateral.
Barbillas	Grandes y colgantes, con el borde inferior redondeado y rojo vivo	Redondeadas
Orejillas	Moderadamente alargadas, pegadas a la cara y de color blanco	Redondeadas
Pico	Mediano, fuerte y curvado, de color amarillo	Las mismas características que el gallo
Ojos	Redondos y proporcionados al rostro. Iris de color castaño rojizo	Las mismas características que el gallo
Cuello	Robusto y de longitud media. La esclavina abundante, descansando en la espalda	Espada horizontal.
Tronco	Ancho, bien desarrollado y bastante largo; muy ligeramente inclinado hacia atrás	Las mismas características que el gallo
Dorso	Ancho, ligeramente inclinado desde el cuello a las hoces, pero con tendencia a la horizontalidad y numerosos caireles que casi entran en contacto con la esclavina dando la impresión de una espalda corta	Las mismas características que el gallo
Pecho	Ancho, largo y robusto	Las mismas características que el gallo
Cola	Tamaño medio, timoneras anchas y superpuestas, hoces caudales con tendencia a la verticalidad	Con una inclinación de 45.º respecto a la horizontal
Abdomen	Ancho, profundo y bien desarrollado	Las mismas características que el gallo
Alas	Bien plegadas y juntas al cuerpo, de anchura inferior a su longitud	Las mismas características que el gallo
Muslos	Fuertes y robustos	Las mismas características que el gallo

Tarsos	Proporcionados al tamaño del ave, lisos y de color amarillo	Las mismas características que el gallo
Dedos	En número de cuatro, fuertes, abiertos, derechos y de color amarillo	Las mismas características que el gallo
Variedades de color	<p>Trigueña El pecho es negro. La esclavina es de color blanco crema, con ligero flameado gris. Los hombros y el dorso tienen una mezcla de blanco crema con rojo. Los caireles son como la esclavina, pero con el flameado gris más reducido. La cola es negra con reflejo verdoso. Las coberteras grandes de las alas son negras con reflejo verde. Las remeras secundarias tienen las barbas internas de color negro grisáceo, y las externas (espejo del ala) son crema casi blanco. Las remeras primarias son negras.</p> <p>Plateada. Similar al de la variedad «trigueña», pero sin los tonos rojizos o marrones del dorso y caireles; es decir, blanco puro, así como la esclavina muy blanca y el «espejo de ala» también blanco.</p>	<p>Trigueña El pecho y las plumas que cubren los muslos son de color blanco crema. El cuello es asalmonado con flameado marrón oscuro sin ser negro. El dorso y los hombros son de color salmón de tono uniforme en toda su extensión pero con un leve ribeteado más claro.</p> <p>Plateada En la esclavina, el dorso y parte de las alas tiene coloración que puede variar entre el claro y el oscuro (blanca, crema, marrón claro) pero con briznas negras o grisáceas y a veces de color gris verdoso. El pecho, el vientre y la zona alrededor de la cloaca es crema casi blanco o blanco puro. La cola es negra.</p>

(Boletín Oficial de la Región de Murcia, Decreto 129, 2010).

Entre los organismos que se ocupan de la cría de esta raza de gallinas se encuentra la Asociación “Amigos por la Gallina Murciana” (AGAMUR) en la que colabora la Estación Experimental Agroalimentaria Tomas Ferro (ESEA), donde se encuentra un Núcleo de Selección. Es un centro de investigación dependiente de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena.

AGAMUR se ocupa de la cría de la raza autóctona en peligro de extinción gallina murciana, raza ya reconocida por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y posteriormente reconocida como raza por FESACOCUR (Federación Española de Avicultura, Colombicultura y Cría del Conejo) del Convenio Europeo.

El objetivo general del proyecto de protección y cría es dar lugar a una economía circular de la producción de la raza aviar "Gallina Murciana" en peligro de extinción (UPCT, 2019).

2. OBJETIVOS

2. Objetivo del estudio

El presente TFM se encuentra en el marco del Programa de Recuperación y Conservación de la Gallina Murciana. El objetivo general es velar por la pureza de la raza, para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las secuencias genéticas consenso del gen MC1R (gen del color) de la gallina murciana
- Estudiar la asociación del genotipo de los individuos para el gen MC1R con su fenotipo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material animal.

Se utilizaron 7 gallinas criadas en la Estación Experimental Agroalimentaria (ESEA) Tomas Ferro de la Escuela de Ingeniería Agronómica de Cartagena, y dos animales de raza Pekínés que se sabía que eran trigueños y nos servirán para comparar las secuencias.

3.2 Descripción fenotípica de la raza Murciana

Antes de describir las características fenotípicas de la gallina Murciana vamos a presentar una fotografía con las partes del cuerpo y plumas que luego se van a mencionar (Fig. 4):



Figura 4. Nomenclatura de los distintos tipos de plumas en un ejemplar de gallo de raza Murciana

Las características fenotípicas y del color del plumaje que se recogen a continuación fueron descritas previamente en Orozco (2001) y quedan recogidas en el Decreto n.º 129/2010.

Características fenotípicas:

Morfología del gallo: La cabeza es grande y ancha; La cara lisa y de color rojo vivo;

La cresta sencilla, grande, derecha y con dientes bien definidos, en número de 5 a 7 y perpendiculares a la curva de la cabeza, con el espolón que está pegado a la línea del cuello y de color rojo vivo; las barbillas están grandes y colgantes, redondeado en el borde inferior y de color rojo vivo; las orejillas pegadas a la cara y de color blanco; pico mediano, fuerte y curvado, de color amarillo; ojos redondos y proporcionados al rostro; iris de color castaño rojizo; cuello robusto y de longitud media. La esclavina abundante, descansando en la espalda; tronco ancho, bien desarrollado y bastante largo; el pecho es ancho, largo y robusto; La cola tiene un tamaño medio, con las timoneras anchas, hoces caudales con tendencia a la verticalidad; abdomen ancho, profundo y bien desarrollado; alas bien plegadas y juntas al cuerpo, de anchura inferior a su longitud; muslos fuertes y robustos; tarsos proporcionados al tamaño del ave, lisos y de color amarillo; dedos en número de cuatro, fuertes, abiertos, derechos y de color amarillo.

Morfología de la gallina: más pequeña en comparación con el gallo; la cresta que está caída hacia un lado; las barbillas redondeadas; orejillas redondeadas; espalda horizontal; cola con una inclinación de 45 grados respecto a la horizontal.

Variedades de color:

Las descripciones que se han hecho hasta la fecha sobre el color del plumaje en la raza Murciana parecen indicar la existencia de dos variedades (Orozco, 2001). Respecto a los gallos se observa el pecho negro y con el manto completamente blanco y otro similar, pero con el manto manchado con tonalidades desde el amarillo al naranja rojizo llegando incluso al castaño. En el caso de las hembras predomina la variedad trigueña, con otra variedad mal definida que se caracteriza por la esclavina, el dorso y parte de las alas con coloración que puede variar entre el claro y el oscuro -blanca, crema, marrón claro- pero con briznas negras o grisáceas y a veces de color gris verdoso. A continuación, hacemos una descripción más detallada de estas dos variedades:

-Variedad trigueña

Gallo: El color del pecho es negro. La esclavina es de color blanco crema, con ligero flameado gris. Los hombros y el dorso tienen una mezcla de blanco crema con rojo. La cola es negra con reflejo verde. Las plumas coberteras grandes de las alas son negras con reflejo verde. Las remeras secundarias tienen las barbas internas de color negro grisáceo, las externas (espejo del ala) son crema casi blanco. Las remeras primarias son negras (Fig. 5A).

Gallina: El pecho y las plumas que cubren los muslos son de color blanco crema. El cuello es asalmonado con flameado marrón oscuro sin ser negro. El dorso y los hombros son de color salmón de tono uniforme en toda su extensión, pero con un leve ribeteado más claro. El color de las coberteras de las alas es un poco más claro que el dorso. La cola también es asalmonada en su principio, pero con los extremos de las plumas timoneras más o menos oscuros, pero sin llegar a negros. (Fig. 5B).



Figura 5. Variedad trigüeña de gallo (A) y gallina (B) de raza Murciana criadas en la granja de Tomas Ferro (Universidad Politécnica de Cartagena)

-Variedad plateada

Gallo: Similar al de la variedad trigüeña, pero sin los tonos rojizos o marrones del dorso y caireles; es decir, blanco puro, así como la esclavina muy blanca y el "espejo del ala" también blanco (Fig. 6A).

Gallina: En la esclavina, el dorso y parte de las alas tiene coloración que puede variar entre el claro y el oscuro (blanca, crema, marrón claro). El pecho, el vientre y la zona alrededor de la cloaca es crema casi blanco o blanco puro y la cola es negra (Fig. 6B).

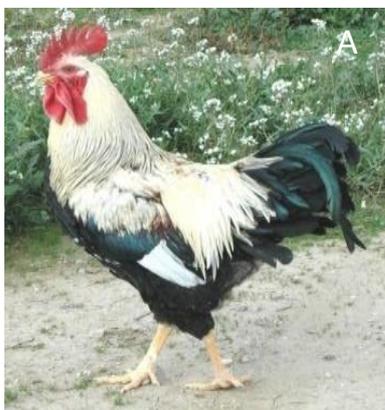


Figura 6. Variedad plateada de gallo (A) y gallina (B) de raza Murciana criadas en la granja de Tomas Ferro (Universidad Politécnica de Cartagena)

El trabajo experimental objeto de esta tesis se ha estructurado en las siguientes fases.

1. Extracción de ADN de muestras;
2. Lectura QUBIT
3. Amplificación de las secuencias de interés;
4. Electroforesis en gel de agarosa;
5. Reacción de secuenciación;
6. Análisis de electroferogramas con el software Chromas;
7. Análisis BLAST de las secuencias obtenidas;
8. Alineación de las secuencias experimentales con el software BioEdit;
9. Análisis de alineaciones con el software Jalview.

Los protocolos seguidos en las distintas fases del trabajo experimental se describen con mayor detalle a continuación.

3.3 Extracción de ADN

El ADN se extrajo tomando muestras de médula de plumas más pequeñas, es decir, plumas primarias.

El protocolo utilizado para la extracción del ADN contemplaba el uso del kit E.Z.N.A.® Forensic DNA (Omega) y se dividió en las siguientes fases:

1. Cortar la muestra en fragmentos (0,5-1 cm) y transferirla a un tubo de centrifuga de 1,5 ml sin nucleasas (para las plumas, elija plumas primarias).
2. Añadir 250 µL de Buffer TL.
3. Añadir 25 µL de solución de proteinasa K.
4. Añadir 20 µL di DTT 1M. y ponerla en el Vortex para mezclar bien.
5. Incubar a 60 ° C durante 30 minutos con agitación ocasional.
6. Añadir 250 µL de Buffer BL. Vortex para mezclar bien.
7. Añadir 250 µL de etanol 100%. Vortex para mezclar bien.
8. Centrifugar a máxima velocidad para precipitar cualquier muestra adherida a la tapa o las paredes del tubo.

9. Insertar una mini columna de ADN HiBind® en un tubo de 2 ml suministrado con el kit.
10. Transferir toda la muestra a la columna, incluido cualquier precipitado que se haya formado.
11. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
12. Eliminar el filtrado y el tubo de recogida.
13. Añadir 500 µL de HBC Buffer (Este Buffer debe diluirse con isopropanol al 100% antes de su uso).
14. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
15. Eliminar el filtrado y el tubo de recogida.
16. Transferir la mini columna de ADN HiBind® a un nuevo tubo de 2 ml.
17. Añadir 700 µL de ADN Wash Buffer (Este Buffer debe diluirse con etanol al 100% antes de su uso).
18. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
19. Repetir los pasos anteriores para un segundo lavado de ADN.
20. Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos para secar la columna (este paso es fundamental para eliminar todo el etanol residual que podría interferir con las aplicaciones posteriores).
21. Colocar la columna en un tubo sin nucleasas de 1,5 o 2 ml.
22. Añadir 100 µL de tampón de elución calentado a 70 ° C.
23. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
24. Repetir la elución (la incubación a 70 ° C aumenta el rendimiento de ADN por elución, mientras que el uso del primero eluido para la segunda elución aumenta la concentración de ADN).
25. Almacenar el ADN a -20 ° C.

Las siguientes figuras muestran el kit utilizado para la extracción de ADN de muestras de gallinas, las muestras extraídas y las herramientas necesarias para el protocolo descrito.



Figura 7. Kit E.Z.N.A.® Forensic ADN utilizado para la extracción de ADN genómico.

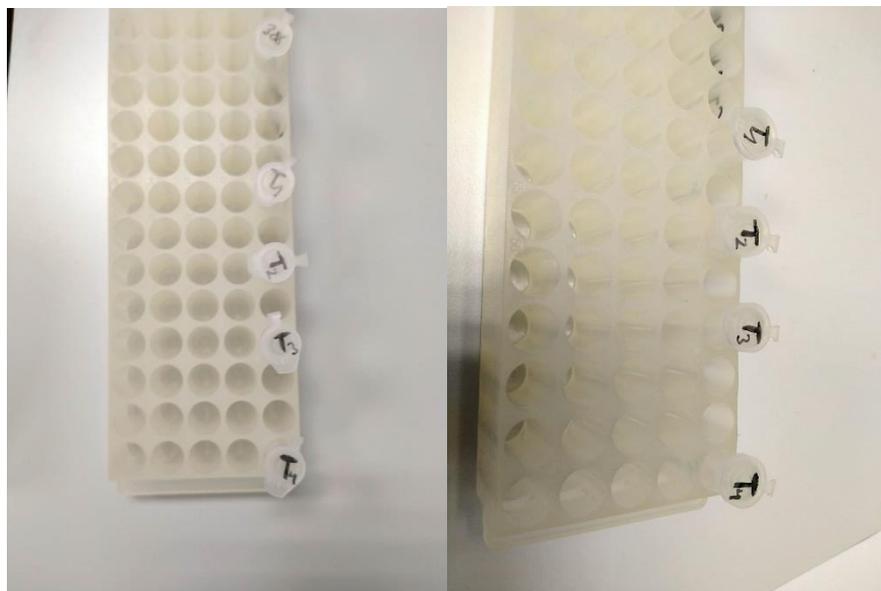


Figura 8. Muestras de ADN extraídas.



Figura 9. Vortex y termomixer utilizado en la extracción de ADN.



Figura 10. Centrífuga utilizada para la extracción de muestras de ADN.

3.4 Lectura de ADN con QUBIT

El fluorómetro Qubit™ 4 es un fluorómetro de sobremesa que se puede utilizar para la cuantificación de ADN, ARN, microARN y proteínas, así como para medir la integridad y calidad del ARN. El uso de la herramienta basada en Qubit™ permitió un análisis sensible y preciso.

Las lecturas con este instrumento son de hecho más sensibles que las obtenidas con las mediciones de absorbancia UV, que mide cualquier cosa que absorba a 260 nm: ADN, ARN, proteínas, nucleótidos libres o exceso de sales.

Una vez cuantificadas las muestras se hicieron diluciones en las proporciones oportunas para obtener concentraciones de 10 ng/μl y asegurar una amplificación del gen óptima.

3.5 Amplificación de las secuencias de interés

La amplificación de las secuencias de interés se realizó mediante una ADN polimerasa *hot start*.

La PCR *hot start* es una técnica que inhibe la actividad de la polimerasa Taq polimerasa o la incorporación de dNTP (deossinucleoside trifosfato) durante la preparación de la reacción hasta que se produce una etapa de activación mediada por calor. La PCR *hot start* permite la preparación de la reacción a temperatura ambiente sin incurrir en los problemas derivados de la amplificación inespecífica y la formación de dímeros de cebadores.

En la siguiente imagen se representa esquemáticamente la diferencia entre un PCR clásico y uno basado en tecnología *hot start*.

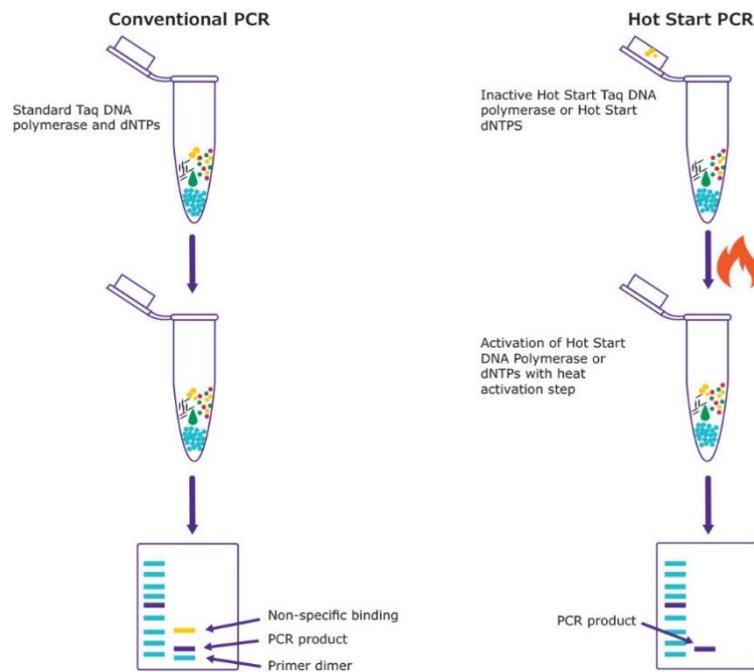


Figura 11. PCR. Ventajas de utilizar la *hot start* PCR

Los cebadores diseñados para amplificar el gen MC1R de interés tenían las siguientes secuencias:

primer forward: 5'-ATCCTTGTGCCTGGGGTG-3'

primer reverse: 5'-CATCCATCCATCCATCCTCCTGTC-3'

Los reactivos utilizados para la preparación de la PCR fueron los del kit AmpliTaq Gold® DNA Polymerase de Applied Biosystems. Las mezclas de reacción se prepararon como sigue:

- 12,5 µL di Hot start mix;
- 1 µL de primer Forward (0,2-0,5 µM);
- 1 µL de primer Reverse (0,2-0,5 µM);
- ADN (acerca de 10^4 copias, < 1 µg DNA/reacción);
- H₂O para traer el volumen necesario.

El programa de amplificación se realizó con un termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems e incluyó los siguientes pasos térmicos:

- Activación 95°C 10 min,
- Desaturación 95°C 45 sec,
- *Annealing* 65°C 45 sec,
- Extensión 72°C 1 min 30 sec,
- Extensión final 72°C 5 min.

Las siguientes imágenes muestran el termociclador utilizado para las amplificaciones descritas y la preparación de las reacciones.



Figura 12. Termociclador utilizado para la amplificación de las regiones de interés.



Figura 13. Preparación de reacciones de amplificación.

3.6 Purificación de las secuencias amplificadas

Tras la reacción de amplificación, las muestras de ADN se purificaron siguiendo el protocolo descrito y utilizando el kit PCR de purificación Thermo Scientific™ GeneJET:

1. Añadir 1 μ l de Binding Buffer por cada μ l de PCR (1:1). El color amarillo indica que se encuentra a un pH óptimo para la columna de ADN. Si el color fuese naranja o violeta, añadir 10 μ l a 3 M de acetato de sodio, pH 5,2 y mezclar. El color se volverá amarillo.
2. Transferir la solución a la columna de purificación y centrifugar >12000 g por 30-60s. Descarta el líquido sobrante.
3. Añadir 700 μ l de Wash Buffer (diluido con cloral previamente). Centrifugar por 30-60 s. Descartar al líquido sobrante.
4. Centrifugar la columna nuevamente por 1 min para eliminar el Wash Buffer residual.
5. Transferir la columna a un endendorf de 1,5 ml. Añadir 50 μ l de Elution Buffer sobre el centro de la columna y centrifugar por 1 min.
6. Quitar la columna y guardar el ADN purificado a -20°C.

(Si el fragmento de ADN es > 10 kb precalentar el Elution Buffer a 65°C antes de aplicarlo a la columna).

Las siguientes imágenes muestran el kit utilizado y un detalle del procedimiento de purificación de las secuencias amplificadas.

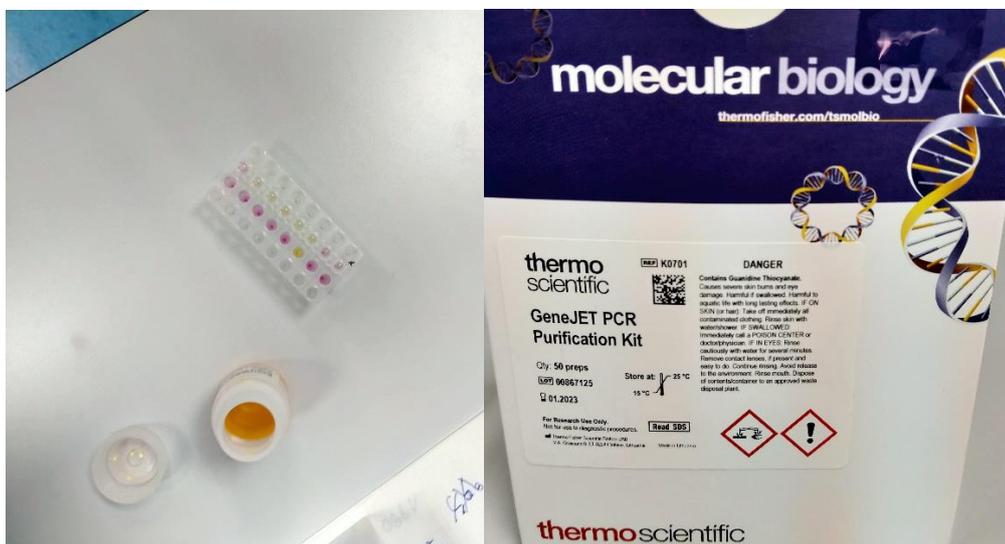


Figura 14. Imágenes de la purificación de los productos amplificados y del kit utilizado para la purificación.

3.7 Electroforesis en gel de agarosa

Después de la purificación, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % que la amplificación se había hecho correctamente.

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la migración y separación de partículas cargadas (iones) bajo la influencia de un campo eléctrico y consta de dos electrodos con carga opuesta (ánodo y cátodo), conectados por un electrolito utilizado como medio conductor. El efecto de separación de las partículas iónicas depende de las diferencias en su velocidad (v), que es el producto de la movilidad de la partícula (m) y de la intensidad de campo (E).

La movilidad (m) es determinada por el tamaño, la forma y la carga de la partícula y también por la temperatura durante la separación.

Las condiciones electroforéticas se caracterizan por parámetros eléctricos (corriente, voltaje, potencia) y por factores como fuerza iónica, valor de pH, viscosidad, tamaño de poro, que describen el medio en el que se mueven las partículas (Fritsch e Krause, 2003).

3.8 Reacción de secuenciación

En las reacciones de secuenciación, los cebadores son alargados por la polimerasa de ADN (Taq). Los desoxinucleótidos marcados con fluorescencia se introducen uno a la vez y el cebador se extiende de una manera dependiente del molde. En la misma reacción, la polimerasa Taq agrega nucleótidos modificados (didesoxi) marcados con fluorescencia al ADN desnaturalizado que terminan la formación de una nueva cadena de ADN cuando se encuentran con sus nucleótidos complementarios en la secuencia target. Esto da como resultado cadenas de ADN de longitud variable, que se separan en un gel por electroforesis y reflejan la secuencia analizada. Cada capilar del secuenciador en el que tiene lugar la electroforesis de los fragmentos amplificados se calibra por separado para los colorantes utilizados en las reacciones de secuenciación para que el software pueda realizar el análisis multicomponente para identificar cada uno de los fragmentos marcados con colorante (Figura 15). Estas reacciones de secuenciación se analizan luego utilizando un software específico.

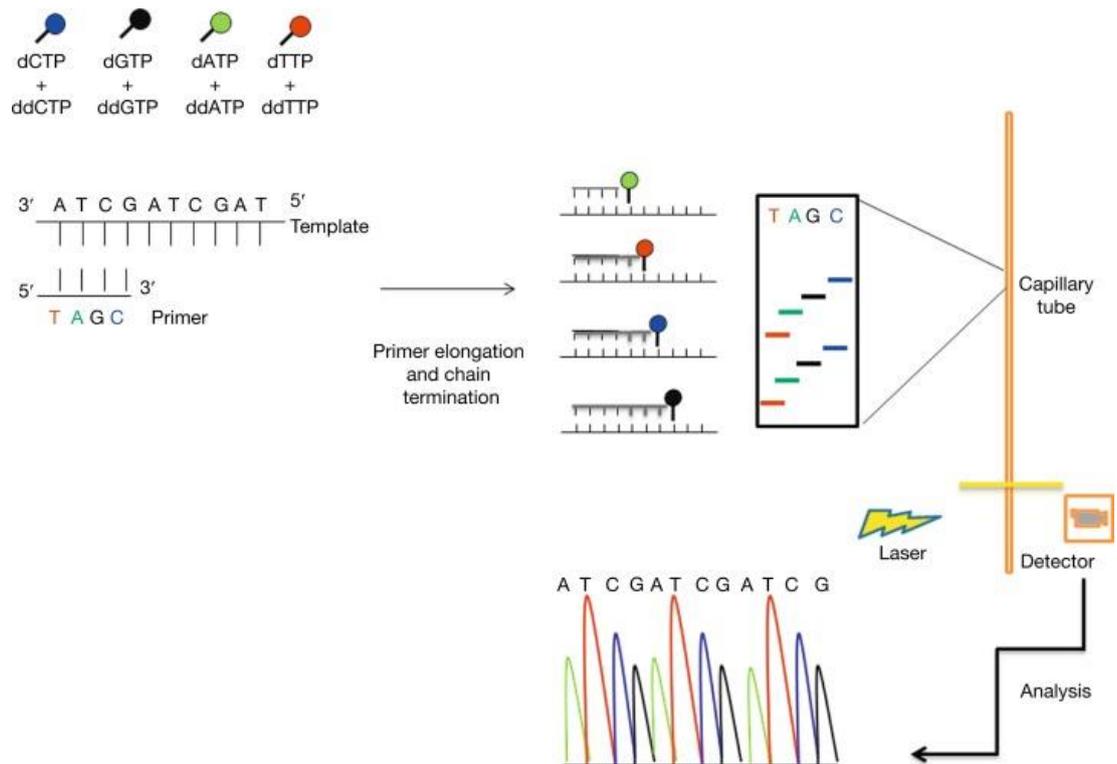


Figura 15. Reacción de secuenciación con el método Sanger.

La secuenciación de Sanger requiere una plantilla de ADN, un cebador de secuenciación, una ADN polimerasa termoestable, nucleótidos (dNTP), didesoxinucleótidos (ddNTP) y tampón. Los ciclos térmicos en las reacciones de secuenciación amplifican los productos terminados por uno de los cuatro ddNTP. La relación entre desoxinucleótidos y ddNTP se optimiza para producir una población equilibrada de productos de corto y largo alcance. Los cuatro terminadores ddNTP están marcados con diferentes tintes fluorescentes. Se realiza una sola reacción con todos los reactivos y todos los ddNTP marcados con colorante en un solo tubo. Los fragmentos fluorescentes se generan mediante la incorporación de ddNTP marcados con colorante. Cada ddNTP diferente (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) tendrá un tinte de color diferente. Todos los fragmentos terminados (aquellos que terminan con un ddNTP), por lo tanto, contienen un tinte en sus extremos 3'. Los productos de esta reacción se inyectan en un capilar y se distinguen como nucleótidos individuales con fluoróforos únicos reconocidos por láser. La información del láser es capturada por los tubos fotomultiplicadores para generar un electroferograma que representa la secuencia única (Zhang e Fernandes, 2014).

3.9 Análisis de cromatogramas con el software Chromas

Chromas es un visor y editor gratuito que le permite analizar los cromatogramas procesados por secuenciadores Sanger automatizados.

Con este software fue posible analizar las secuencias del gen MC1R obtenidas y corregir aquellas indeterminaciones incongruentes.

3.10 Análisis de las alineaciones con software Jalview

Jalview es un programa *open source* gratuito desarrollado para el editing interactivo, el análisis y la visualización de más alineaciones de secuencias. Con este software es posible editar secuencias, obtener información sobre la estructura secundaria, árboles filogenéticos y estructuras moleculares 3D.

En el presente trabajo experimental se utilizó el programa para resaltar las diferencias presentes entre las secuencias analizadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Valoración morfológica de los animales

44 2018 2



47 2018 2



15708 2019 2



21897 2019 2



15710 2019 2



43 2018 2



112 2017 2



En la tabla se muestra la valoración morfológica de los animales seleccionados.

Tabla 2. Número de identificación, valoración media, peso y sexo.

ANILLA	CABEZA	COLA	PECHO,	MUSLOS,	CRESTA,	COLOR,	MEDIA	Peso	Sexo
47	9	9	9	9	7	8	84	1825	2
44	8	9	9	9	9	8	84	2400	2
43	9	8	9	9	9	8	85	1900	2
21897	9	9	9	9	9	9	90	1873	2
15708	9	8	9	9	8	9	88	1868	2
15710	9	9	9	9	6	9	87	1615	2
112	9	9	9	9	6	7,5	81		2

Las gallinas 47, 44, 43, fenotípicamente se parecen entre ellas y parecen ser la variedad trigüeña mientras que la gallina 15708 parece ser la variedad plateada. Las 21897, 15710 y la 112 son la más diferentes y fenotípicamente no se puede establecer la variedad.

4.1 Lectura de ADN con QUBIT

En particular, en los análisis realizados posteriormente se utilizaron las muestras T2 y T4, 44, 43, 47, 15708, 21897, 15710 y 112.

4.2 Electroforesis en gel de agarosa

Una vez purificadas las reacciones de amplificación, se verificó la especificidad de la amplificación en un gel de agarosa al 1,5%.

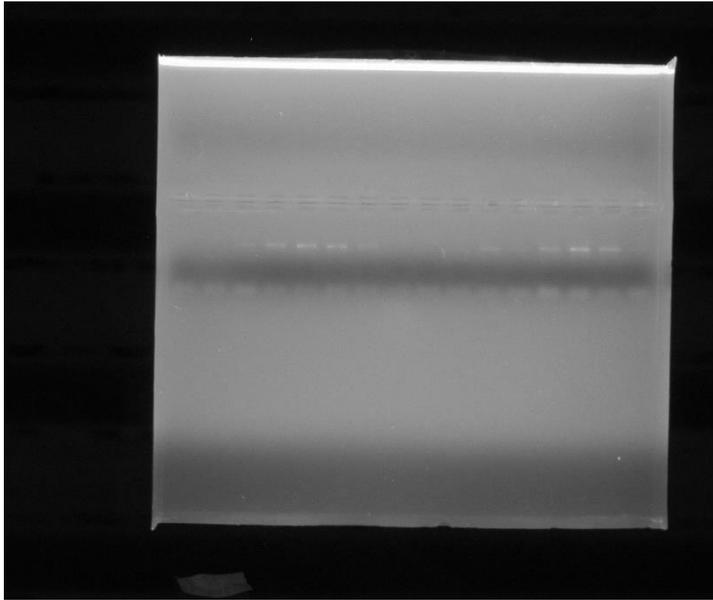


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados.

4.3 Análisis de electroforegramas con el software Chromas

Las siguientes figuras muestran imágenes que muestran los electroforegramas obtenidos.

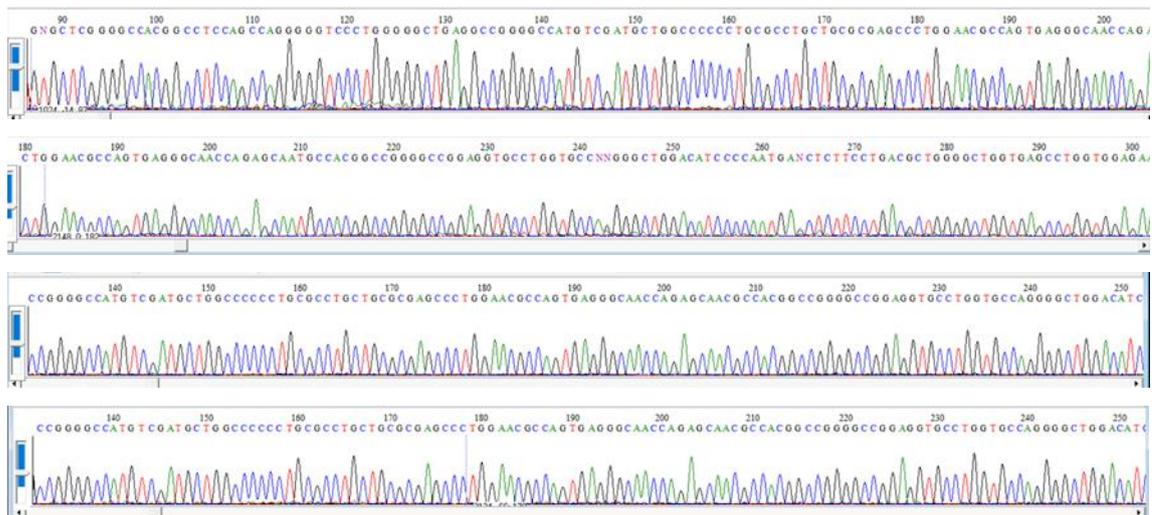
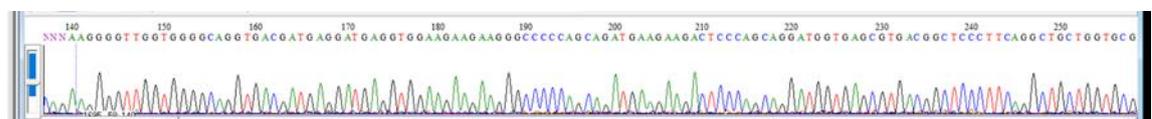


Figura 17. Electroforegramas obtenidos de la secuenciación de los amplificados forward.



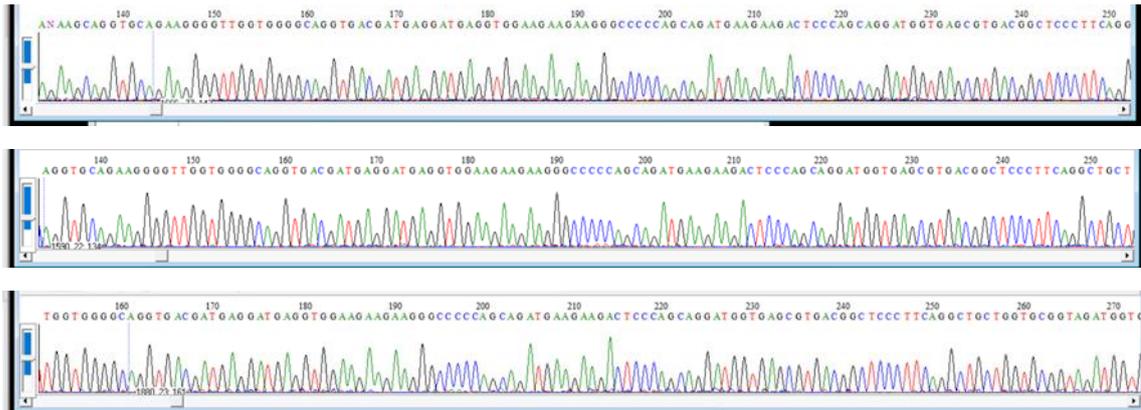


Figura 18. Electroforegramas obtenidos de la secuenciación de los amplificadores reverse.

4.4 Análisis de las alineaciones con software Jalview

De los análisis realizados, la secuencia consenso de las dos razas resultó de la siguiente manera: Secuencia consenso de gallina trigueña:

```

ATGTCGATGCTGGCCCCCTGCGCCTGCTGCGCGAGCCCTGGAACGCCAGTGAG
GGCAACCAGAGCAATGCCACGGCCGGGGCCGGAGGTGCCTGGTGCCAGGGGCT
GGACATCCCCAATGAGCTCTTCCTGACGCTGGGGCTGGTGAGCCTGGTGGAGAA
CCTGCTGGTGGTGGCCGCCATCCTCAAGAACAGGAATCTGCACTCGCCCACGTA
CTACTTCATCTGCTGCCTGGCCGTCTCCGACATGCTGGTGAGCGTCAGCAACCTG
GCCAAGACGCTCTTCATGCTGCTGATGGAGCACGGCGTGCTGGTGATCCGCGCC
AGCATCGTCCGCCACATGGACAATGTCATCGACATGCTCATCTGCAGCTCCGTCG
TGTCTCCCTCTCCTTCCTGGGGGTCATCGCCGTGGACCGCTACATCACCATCTT
CTATGCGCTGCGCTACCACAGCATCATGACGCTGCAGCGCGCCGTGGTCACCAT
GGCCAGCGTCTGGCTGGCCAGCACCGTCTCCAGCACCGTCTTAATCACCTACTAC
CGCAACAACGCCATCCTGCTCTGCCTCATTGGCTTCTTCCTCTTCATGCTGGTCTT
CATGCTGGTGTCTACATTCACATGTTTCGCGCTGGCGTGCCACCCCGTGCAGCAGC
ATCTCCAGCCAGCAGAAGCAGCCACCATCTACCGCACCAAGCAGCCTGAAGGG
AGCCGTCACGCTTACCATCCTGCTGGGGAGTCTTCTTCATCTGCTGGGGGCCCT
TTCTTCTTTCACCTCATCCTCATCGTACCTTGCCCCACCAACCCCTTTCTGCACC
TGCTTCTTCCAACATAATTTCAACCCTCTTTCCTCATCCCTCATCATCTGCAATTC
CAGTGGTCCGAANNCCNTGNATC

```

Las características de la alineación son las siguientes:

- Sequences: 2
- Minimum Sequence Length: 642
- Maximum Sequence Length: 1179
- Average Length: 910

Secuencia de consenso de la gallina murciana:

```

ATGTCGATGCTGG--CCCCCTGCGCCT-GCTGCGCGAGCCCT--
GGAACGCCAGTGAGGG--CAACCAGAGCAACG-CCACGGCCGGGGCC--
GGAGGTGCCTGG-TGCCAGGGG-CTGGACATCCCC-AATGAGCTCTTCCT--
GACGCTGGGGCTGG-TGAGCCTGGTGGAGAACCTGCTGG-TGGTGGCC-
GCCATCCTCAAGAACAGGAA-TCTGCA-CTCGCCC-
ATGTACTACTTCATCTGCTGCCTGG-
CCGTCTCCGACATGCTGGTGAGCGTCAGCAACCTGGCCGAGACGCTCTTCATGCT
GCTGATGGAGCACGGCGTGCTGGTGATCCGCGCCAGCATCGTCCGCCACATGGA
CAATGTCATCGACATGCTCATCTGCAGCTCCGTCGTGTCTCCTCCTTCCTTG
GGTTCATCGCCGTGGACCGCTACATCGCCATCTTCTATGCGCTGCGCTACCACAG
CATCATGACGCTGCAGCGCGCCGTGGTACCATGGCCAGCGTCTGGCTGGCCAG
CACCGTCTCCAGACCGTCTTAATCACCTACTACCGCAACCAACGCCATCCTGCT
CTGCCTCAATTGGCTTTCTTCTTCTTCATGCTGGTCTCATGCTGGTGTCTACAT
TCACATGTTTCGCGCTGGCACGCCACCACGTGCGCAGCATCTCCAGCCAGCAGAA
GCAGCCCACCATCTACCGCACCA-GCAGCCTTGAGAAGGGAGCCGTCACGCT-
CACCATCCTGCTTGGGGAGTCTTCTTTCATCTGCTGGGGGGGGCCCCCTTCTTCTTC
CACCTNCCATCCTCATCGTACCTGGCCCCAACCAACCCCTTTCTGCACCTTGCT
TCTTCCAGCTATTTC AACCTTCTNTCCTCATTCCTCATCATCTGCCAAATTCANT
GGGTCCGATCCCCNGAATCTATGCCCTTCCCGGA
    
```

Esta secuencia se deriva de un alineamiento múltiple con las siguientes características:

- Sequences: 8
- Minimum Sequence Length: 443
- Maximum Sequence Length: 1193
- Average Length: 936
-

La siguiente imagen ilustra la comparación realizada con el software Jalview para comparar las secuencias de consenso de la gallina murciana y trigueña:



Figura 19. Jalview resultado de la comparación entre secuencias consenso.

Tabla 3. Inserciones identificadas en las dos secuencias de consenso.

Secuencia de posición a partir del ATG inicial	Murciana	Trigueña
550	ins C	
573	ins A	
581	ins T	
698		ins A
706-708	ins TGA	
727		ins T
740	ins T	
752	ins C	
768-770	ins GGC	
789	ins C	
814	ins Ta	
834	ins T	
884	ins C	

Tabla 4. Variaciones de pares de bases identificadas en las dos secuencias consenso.

Secuencia de posición a partir del ATG inicial	Murciana	Trigueña
69	C	T
212	T	C
274	G	A
427	G	A
639	A	G
640	C	T
647	A	C
774	C	T
783	C	T
807	G	T
852	C	T
858	T	C
870	T	C

Las siguientes imágenes muestran los análisis realizados con el software Jalview para identificar las secuencias consenso de las muestras de gallina murciana y trigueña:

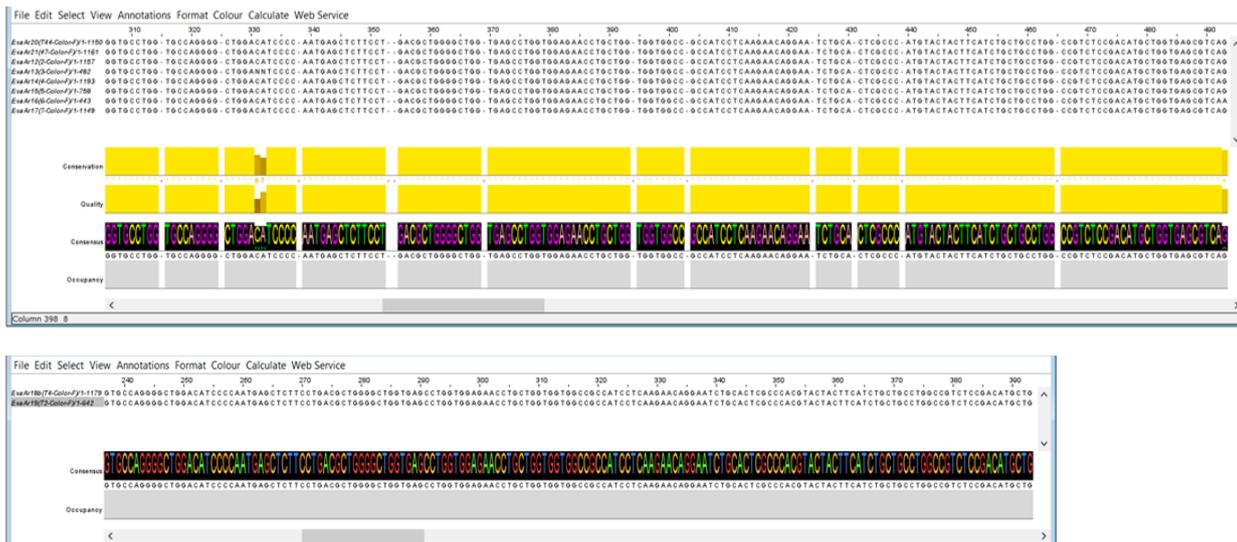


Figura 20. Análisis de Jalview para obtener secuencias de consenso Murciana y trigueña.

Tabla 5. Variaciones o inserciones de pares de bases identificadas en las secuencias consenso de las muestras analizadas.

Posición	15708	21897	15710	43	112	44	47
133						G → C	G → C
134							G → C
139						T → A	
140							G → A
146						T → A	
167							
284							
493				G → A			
502				C → T			
504							
639							
657							
780						Ins. C	
803		Ins. T	Ins. A		Ins. A		
811		Ins. T	Ins. T				
869							
941		G → A					
944		G → A					
970		Ins. T					
971		Ins. G					
974		G → A					

La identificación de marcadores genéticos correlacionados con diferencias fenotípicas es un factor importante para la identificación de las diferentes variedades de aves y con referencia específica a las gallinas.

El estudio realizado permitió identificar algunos polimorfismos en el gen MC1R de las razas de pollos estudiadas. Las mutaciones que ya habían sido descritas en estudios previos fueron: C69T, T212C, G274A, A427G.

Se han logrado enormes avances en la detección de polimorfismos del gen MC1R en relación con las variaciones de color del pelaje en animales vertebrados durante los últimos años (Kerje et al., 2003) y en particular en las gallinas, el gen MC1R juega un papel clave en la regulación de la pigmentación de las plumas a través de la presencia de eumelanina (color negro / marrón) y feomelanina (color rojo / amarillo) (Jackson, 1997).

El gen MC1R de las gallinas se encuentra en el cromosoma 11 y codifica una proteína de 314 aminoácidos en un solo exón (Takeuchi et al., 1996; Kerje et al., 2003). Se realizó un estudio previo para el análisis de las relaciones del color del plumaje con los genes TYR y MC1R en pollos coreanos (Heo et al., 2011) y los análisis de genotipos indicaron que los genotipos TT, AA y GG coincidían con las pigmentaciones de eumelanina, feomelanina y plumaje albino en las posiciones de nucleótidos 69, 376 y 427, respectivamente. En contraste, las altas frecuencias alélicas con los alelos T, A y G correspondieron al color del plumaje negro, rojo / amarillo y blanco en las posiciones de los nucleótidos 69, 376 y 427, respectivamente (Hoque et al., 2013).

El estudio de Davila et al. (2014) investigó el efecto del gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) sobre el color del plumaje en pollos y se secuenció el gen en 77 machos y 77 hembras de 13 razas españolas. Se detectaron 11 SNP significativos. Nueve de ellos no eran sinónimos (T212C, G274A, G376A, T398AC, G409A, A427G, C637T, A644C e G646A, correspondiente a cambios en los aminoácidos Met72Thr, Glu92Lys, Val126Ile, Leu133GlnPro, Ala137Thr, Thr143Ala, Val216I, His y 2 eran sinónimos (C69T e C834T).

La investigación de Park et al. (2013) analizaron la asociación del color de las plumas y el polimorfismo de secuencia en el gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) utilizando pollos de raza nativa coreana y pollos comerciales "*Woorimatdag*". El objetivo de la investigación fue la correlación de la mutación genética con el color de la pluma de pollo nativa coreana mediante la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen *MC1R* estudiando la secuencia genética. Se utilizaron un total de 307 aves de dos razas diferentes, ya que la primera tiene un color de pluma negro-marrón y la segunda negra con

manchas marrones o marrón con manchas negras. El estudio encontró que hay 6SNPs en el gen *MC1R*, y son: T69C, C212T, A274G, G376A, G636A, T637C.

5. CONCLUSIONES

El estudio presentado permitió analizar las variaciones genéticas que ocurren en el gen *MC1R* en la gallina Murciana. A la luz de los resultados obtenidos y de la literatura científica ya presente sobre el tema, es posible indicar que no se han encontrado correlaciones entre los polimorfismos del gen estudiado y el color del plumaje de las gallinas. Sin embargo, aunque las alteraciones en la secuencia de este gen no parecen ser suficientes para justificar, de forma aislada, las variaciones de pigmentación de las plumas de las gallinas, el conocimiento del genotipo a nivel de este gen parece influir en el fenotipo final.

La investigación ciertamente presenta la limitación del número de muestras analizadas y será necesaria una mayor investigación para llegar a la confirmación de los resultados obtenidos, sin embargo, sienta las bases para el desarrollo de futuras investigaciones en este campo y la identificación de nuevos marcadores moleculares que puedan ser útiles en la discriminación entre razas de gallinas.

Analizando los resultados podemos decir que la 15708 podemos decir que fenotípicamente y genéticamente es de variedad trigueña. Respecto al resto de los animales se observa variabilidad en el genotipo, que en algún caso se puede corresponder con el gen trigueño recesivo de la variedad plateada. Estas gallinas son las más diferentes y hay que continuar los estudios para intentar averiguar el genotipo de la variedad plateada y ponerlos en una base de datos para poder seleccionar animales puros. Se esperan estudios futuros porque la selección fenotípica para elegir representantes de la raza Murciana tiene que ser acompañada con el estudio genotípico de los genes que regulan el color plumaje.

BIBLIOGRAFÍA

Agamur. Programa de conservación y mejora de la gallina murciana. 2016.

Ancans J., Tobin D.J., Hoogduijn M.J., Smit N.P., Wakamatsu K., Thody A.J. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* 2001;268:26-35.

Blum A., Hartmann K., Rutten A. Braunliche Verfärbung der linken Brustwarze bei einer 60-jährigen Patientin. *Der Hautarzt.* 2010;61: 64-68.

Campo J.L. Use of the sex-linked barring (B) gene for chick sexing on an eumelanotic Columbian background. *Poult. Sci.* 1991;70(7):1469- 1473.

Chang C.M., Coville J.L., Coquerelle G., Gourichon D., Oulmouden A., Tixier-Boichard M. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens. *BMC Genomics.* 2006;5:7-19.

Cott H.B. Adaptive Coloration in Animals. London, UK: Methuen & Co., Ltd, Oxford Univ. Press, 1940.

D'Alba L., Kieffer L., Shawkey M.D. Relative contributions of pigments and biophotonic nanostructures to natural color production: a case study in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) feathers. *J. Exp. Biol.* 2012;215:1272-1277.

Dávila SG, Gil MG, Resino-Talaván P, Campo JL. Association between polymorphism in the melanocortin 1 receptor gene and E locus plumage color phenotype. *Poult Sci.* 2014 May;93(5):1089-96.

Dorshorst B.J., Ashwell C.M. Genetic mapping of the sex-linked barring gene in the chicken. *Poult. Sci.* 2009;88(9):1811-1817.

Doucet S.M., Shawkey M.D., Rathburn M.K., Mays H.L., Montgomerie R. Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 2004; 271(1549):1663-1670.

Dupin E., Le Douarin N.M. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene.* 2003;22(20):3016-3023.

Fritsch R.J., Krause I. Electrophoresis. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 2003.

Galvan I., Garcia-Campa J., Negro J.J. Complex plumage patterns can be produced only with the contribution of melanins. *Physiol. Biochem. Zool.* 2017;90(5):600-604.

Garcia-Borron J.C., Sanchez-Laorden B.L., Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 2005;18(6):393-410.

Guernsey M.W., Ritscher L., Miller M.A., Smith D.A., Schoneberg T., Shapiro M.D. AVa185Met mutation in melanocortin-1 receptor is associated with reductions in eumelanic pigmentation and cell surface expression in domestic rock pigeons (*Columba livia*). *PLoS One.* 2013;8(8):e74475.

Hellström A.R., Sundström E., Gunnarsson U., Bed'Hom B., Tixier-Boichard M., Honaker C.F., Sahlqvist A.S., Jensen P., Kämpe O., Siegel P.B., Kerje S., Andersson L. Sex-linked barring in chickens is controlled by the CDKN2A/B tumour suppressor locus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(4):521-530.

Heo KN, Choo HJ, Seo BY, Park MN, Jung KC, Hwangbo J, Kim HK, Hong EC, Seo OS, Kang BS. Investigation of TYR and MC1R polymorphisms in Korean chickens and the commercial chickens. *CNU J Agric Sci.* 2011;38:465–471.

Hoque M.R., Jin S., Heo K.N., Kang B.S., Jo C., Lee J.H. Investigation of MC1R SNPs and their relationships with plumage colors in Korean native chicken. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2013;26(5):625- 629.

Hoque MR, Jin S, Heo KN, Kang BS, Jo C, Lee JH. Investigation of MC1R SNPs and Their Relationships with Plumage Colors in Korean Native Chicken. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2013 May;26(5):625-9. Jackson IJ. Review Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(10):1613-24.

Ibarrola-Villava M., Hu H.-H., Guedj M., Fernandez L.P., Descamps V., Basset-Seguín N., Bagot M., Bensussan A., Saiag P., Fagnoli M.C., Peris K., Aviles J.A., Lluch A., Ribas G., Soufir N. MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in Southern European populations: results from a meta-analysis. *Eur. J. Cancer.* 2012;48:2183-2191.

Ito S., Wakamatsu K., Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 2000;13(8):103-109.

Jerome F.N. Autosex linkage in Barred Plymouth Rock. *Poult Sci.* 1939;(18):437-440.

Kerje S, Lind J, Schütz K, Jensen P, Andersson L. Melanocortin 1-receptor (MC1R) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Anim Genet.* 2003 Aug; 34(4):241-8.

Kinoshita K., Akiyama T., Mizutani M., Shinomiya A., Ishikawa A., Younis H.H., Tsudzuki M., Namikawa T., Matsuda Y. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is responsible for the tyrosinase-independent recessive white (mow) and mottled (mo) plumage phenotypes in the chicken. *PLoS One.* 2014;9(1):e86361.

Kogan S.M. Features of the Exterior and Interior of Chickens. Novosibirsk, 1979.

Lerner A.B., Fitzpatrick T.B. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 1950;30(1):91-126.

Liu W.B., Chen S.R., Zheng J.X., Qu L.J., Xu G.Y., Yang N. Developmental phenotypic-genotypic associations of tyrosinase and melanocortin 1 receptor genes with changing profiles in chicken plumage pigmentation. *Poult. Sci.* 2010;89(6):1110-1114.

Lopes R.J., Johnson J.D., Toomey M.B., Ferreira M.S., Araujo P.M., Melo-Ferreira J., Andersson L., Hill G.E., Corbo J.C., Carneiro M. Genetic basis for red coloration in birds. *Curr. Biol.* 2016;26(11): 1427-1434.

Maia R., Rubenstein D.R., Shawkey M.D. Key ornamental innovations and diversification in an avian radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(26):10687-10692.

Makarova, A. & Mitrofanova, Olga & Vakhrameev, Anatoly & Dementieva, Nataliia. (2019). Molecular-genetic bases of plumage coloring in chicken. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 23. 343-354. 10.18699/VJ19.499.

McGraw K.J., Safra R.J., Evans M.R., Wakamatsu K. European barn swallows use melanin pigments to color their feathers brown. *Behav. Ecol.* 2004;15:889-891.

Mitrofanova O.V., Dementeva N.V., Krutikova A.A., Yurchenko O.P., Vakhrameev A.B., Terletskiy V.P. Association of polymorphic variants in MSTN, PRL, and DRD2 genes with intensity of young animal growth in pushkin breed chickens. *Cytol. Genet.* 2017;51(3):179- 184.

Moiseyeva I.G., Romanov M.N., Nikiforov A.A., Avrutskaya T.B. Studies in chicken genetics. Commemorating the 120th anniversary of the outstanding soviet geneticist A.S. Serebrovsky (1892–1948). *Russ. J. Genet.* 2012;48(9):869-885.

Mundy N.I. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 2005;272: 1633-1640.

Natt D., Kerje S., Andersson L., Jensen P. Plumage color and feather pecking – behavioral differences associated with PMEL17 genotypes in chicken (*Gallus gallus*). *Behav. Genet.* 2007;37(2):399-407.

Niwa T., Mochii M., Nakamura A., Shiojiri N. Plumage pigmentation and expression of its regulatory genes during quail development – histochemical analysis using Bh (black at hatch) mutants. *Mech. Dev.* 2002;118(1-2):139-146.

Orozco F. 2001. La raza Murciana de gallinas. *Arte Avícola.* 44:17-21

Park, Mi Na & Kim, Tae-Hun & Lee, Hyun-Jeong & Choi, Jin & Heo, Kang-Nyeong & Kim, Chong-Dae & Choo, Hyo-Jun & Han, Jae Yong & Lee, Taeheon & Lee, Jun-Heon & Lee, Kyung-Tai. (2013). Genetic Variations of Chicken TYR Gene and Associations with Feather Color of Korean Native Chicken (KNC). *Korean Journal of Poultry Science.* 40. 10.5536/KJPS.2013.40.2.139.

Roulin A. The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biol. Rev.* 2004;79:815-848.

Rzepka Z., Buszman E., Beberok A., Wrześniok D. From tyrosine to melanin: signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016;70:695-708.

Schiaffino M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010;42(7):1094-1104.

Schwochow Thalmann D., Ring H., Sundstrom E., Cao X., Larsson M., Kerje S., Höglund A., Fogelholm J., Wright D., Jemth P., Hallböök F., Bed'Hom B., Dorshorst B., Tixier-Boichard M., Andersson L. The evolution of Sex-linked barring alleles in chickens involves both regulatory and coding changes in CDKN2A. *PLoS Genet.* 2017;13(4):1006665.

Schwochow-Thalmann D. *Molecular Identification of Colour Pattern Genes in Birds.* Uppsala: Swed. Univ. Agric. Sci., 2018;9:1652-6880.

Shan X., Zhang Y., Peng W., Wang Z., Xie D. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2009;60:3849-3860.

Smyth J.R. Genetics of Plumage, Skin and Eye Pigmentation in Chickens. In: Crawford R.D. (Ed.). *Poultry Breeding and Genetics. Ser.: Developments in Animal and Veterinary Sciences; 22.* Elsevier, 1990;109-168.

Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, Takahashi S. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Aug 14; 1308(2):164-8.

Takeuchi S., Suzuki H., Yabuuchi M. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta*.1996;14(1308(2)):164-168.

Tang X.-F., Zhang Z., Hu D.-Y., Xu A.-E., Zhou H.-S., Sun L.-D., Gao M., Gao T.-W., Gao X.-H., Chen H.-D. Association analyses identify three susceptibility loci for vitiligo in the Chinese Han population. *J. Invest. Dermatol*. 2012;133:403-410.

Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev*. 2012;26:1131-1155.

Vaez M., Follett S.A., Bed'hom B., Gourichon D., Tixier-Boichard M., Burke T. A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the chicken. *BMC Genet*. 2008;9:7.

Xu J.G., Xie M.G., Zou S.Y., Liu X.F., Li X.H., Xie J.F., Zhang X.Q. Interactions of allele E of the MC1R gene with FM and mutations in the MLPH gene cause the five-gray phenotype in the Anyi tilelike gray chicken. *Genet. Mol. Res*. 2016;15(2).

Yu S., Liao J., Tang M., Wang Y., Wei X., Mao L., Zeng C. A functional single nucleotide polymorphism in the tyrosinase gene promoter affects skin color and transcription activity in the black-boned chicken. *Poult. Sci*. 2017;96(11):4061-4067.

Yurchenko O.P., Vakhrameev A.B., Makarova A.V. Additive interactions of genes in the formation of plumage colors in chickens. *Genetika i Razvedenie Zhivotnykh = Genetics and Animal Breeding*. 2015;4:41-45.

Zhang Y., Gou W., Ma J., Zhang H., Zhang Y., Zhang H. Genome methylation and regulatory functions for hypoxic adaptation in Tibetan chicken embryos. *Peer J*. 2017;5:e3891.

Zhang P, Fernandes H. Other Post-PCR Detection Technologies. In *Pathobiology of Human Disease*, 2014.

Zucca F.A., Basso E., Cupaioli F.A., Ferrari E., Sulzer D., Casella L., Zecca L. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox Res*. 2014;25(1):13-23.

SITOGRAFIA

<http://kippenjungle.nl/kruising.html>

https://www.upct.es/destacados/cdestacados.php?c=6&ubicacion=general&id_buscar=11526