

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA OVINA GUIRRA MEDIANTE 8 MARCADORES MICROSATÉLITES.

Viudes de Castro, M.P.¹, Grimal, A.¹, Vicente, J.S.², Moce, E.¹ y Gómez, E.A.¹

¹Centro de Tecnología Animal (CITA), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Polígono La Esperanza, 100. 12400 Segorbe. Castellón.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera s/n. 46071 Valencia.
e-mail: viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

La raza Guirra, también denominada Roja Levantina o “Sudat”, es la única raza ovina autóctona de la Comunidad Valenciana. Con un censo de 3.640 hembras y 174 machos (Peris et al., 2002), hay que destacar que más de la mitad de la población actual se halla concentrada en sólo 6 rebaños (1.534 animales). En la actualidad está incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como raza pura de protección especial, según la Orden APA/661/2006. El control de la filiación en los pequeños rumiantes, es cada vez más utilizado por las Asociaciones de Ganaderos como complemento indispensable para verificar las inscripciones en el Libro Genealógico y para el correcto funcionamiento de los programas de Mejora Genética. (Lozano et al., 2002). De ahí que el objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética preliminar de la raza ovina Guirra mediante el uso de una batería inicial de 8 microsatélites aplicados por primera vez en esta raza; que pueda facilitar la correcta identificación individual y el control de filiación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un muestreo de 96 machos de 16 explotaciones. Se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena yugular utilizando tubos de vacío Vacutainer™ con EDTAK3 como anticoagulante. Seguidamente las muestras de sangre fueron congeladas a -20 °C hasta su posterior procesamiento para la extracción de ADN. Se emplearon 8 microsatélites estructurados en dos reacciones multiplex (OarCP0049, OarFCB0304, INRA0063, HSC, INRA0005, MAF0065, McM0527 y D5S2), que se encuentran dentro del panel de marcadores ovinos recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, 2002).

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un secuenciador *CEQ™ 8000 Beckman Coulter* por electroforesis capilar con marcaje fluorescente.

EL número de alelos (k), la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) se estimaron con el programa GENETIX 4.03 (Belkhir et al., 2004). El contenido informativo del polimorfismo (PIC) así como las diferentes probabilidades de exclusión de la paternidad se estimaron con CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2006). Para el cálculo de los valores de FIS así como los diferentes test de equilibrio Hardy-Weinberg se empleó el programa GENEPOP 4.0.6 (Raymond y Rousset, 1995), los test se realizaron con cadenas de Markov con un periodo de quemado de 10.000, con 100 tandas y 10.000 iteraciones por tanda. Los Análisis Factoriales de Correspondencia se realizaron con GENETIX 4.03 y la distancia DAS (Alele Shared Distance) entre individuos se calculó con POPULATIONS 1.2.03 (Langella, 2002), los árboles se visualizaron con TREEVIEW.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de variabilidad genética se muestran en la Tabla 1. Se han detectado un total de 77 alelos en los 92 individuos para los 8 microsatélites con 9,63 alelos por locus de promedio, variando entre 7 y 13 alelos por locus, este valor se encuentra por encima de la media del encontrado por Arranz et al. (1998) en razas ovinas españolas donde sólo la raza Merino supera a la Guirra con 9,9 alelos por locus, no obstante el panel de marcadores utilizado en nuestro trabajo es distinto al empleado por estos autores. En otro estudio realizado con parte de estos marcadores en la oveja Palmera se encontraron valores

inferiores para k (Martínez et al., 2005). La He alcanzó un valor de 0,762 y la Ho fue 0,705. Todos estos valores son de la misma magnitud a los encontrados en la bibliografía para otras razas ovinas, por lo que la raza Guirra, a pesar de estar catalogada como una raza de protección especial, parece conservar valores altos de variabilidad genética para estos marcadores.

Los test de equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 2) mostraron que hay dos loci con déficit de heterocigotos y uno con exceso. Para el test global, la población mostró un déficit de heterocigotos, por lo que no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

El valor promedio del PIC fue de 0,725 mostrándose todos los loci muy informativos ($PIC > 0,5$) siendo las probabilidades de exclusión del parentesco para esta batería de microsatélites elevadas. Así, la probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado si se desconoce el genotipo del otro parental (PE_1) es de 0,9817, lo que se podría utilizar para identificar la correcta asignación de madres. La probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado si se conoce el genotipo del otro parental (PE_2) es de 0,9989 y la probabilidad de exclusión de un par de parentales no emparentados (PE_{pp}) es de 0,999991. Por ello el panel de microsatélites estudiado se muestra eficaz para realizar pruebas de paternidad dentro de esta raza.

Tabla 1. Número de alelos (k), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), contenido informativo de polimorfismo (PIC), FIS , probabilidad de exclusión de un parental no emparentado cuando se conoce el genotipo del otro parental (PE_2) y Rango del tamaño alélico.

Locus	k	Ho	He	PIC	FIS	PE ₂	Rango
OarCP49	8	0,600	0,744	0,701	0,196	0,531	84-142
OarFCB304	11	0,750	0,737	0,701	-0,018	0,531	142-188
INRA63	9	0,804	0,727	0,676	-0,106	0,490	171-188
HSC	13	0,797	0,885	0,865	0,100	0,754	261-289
INRA5	13	0,620	0,794	0,761	0,221	0,604	126-152
MAF65	8	0,756	0,824	0,787	0,083	0,629	127-143
McM527	8	0,607	0,672	0,633	0,098	0,451	165-179
D5S2	7	0,709	0,715	0,672	0,008	0,466	184-198
Resumen	9,63	0,705	0,762	0,725	0,063	0,9989	

Tabla 2: Test de equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los 8 loci.

Locus	Déficit de Heterocigotos. (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Test Exacto (P-value)
OarCP49	0,007	0,993	0,089
OarFCB304	0,245	0,739	0,587
INRA63	0,954	0,047	0,643
HSC	0,021	0,976	0,261
INRA5	0,003	0,995	0,007
MAF65	0,098	0,903	0,167
McM527	0,334	0,695	0,015
D5S2	0,092	0,917	0,397
Global	0,006	0,9996	0,007

El análisis factorial de correspondencia (AFC, Leroy, 2008) aplicado a la población de moruecos estudiada muestran una estructura de la misma en tres grupos diferenciados (Figura 1a). Algo similar ocurre al calcular la distancia DAS entre individuos (Figura 1b). Al analizar cómo se distribuyen las distintas explotaciones en los grupos, 5 tienen individuos en los tres grupos (A, B y C), 4 en los grupos A y B, 2 en los B y C, 1 sólo en el B, y 4 sólo en el C. Este estudio preliminar que recoge casi el 50% de los moruecos adultos de esta población permite concluir que aún conserva una elevada variabilidad genética y que los

marcadores ensayados en las dos multiplex permiten llevar a cabo un test de filiación de utilidad en un posible programa de conservación y selección genética de esta raza. No obstante, es necesario incrementar el número de marcadores y el número de animales analizados y sería interesante analizar el ADN mitocondrial para definir genéticamente los orígenes de la raza Guirra.

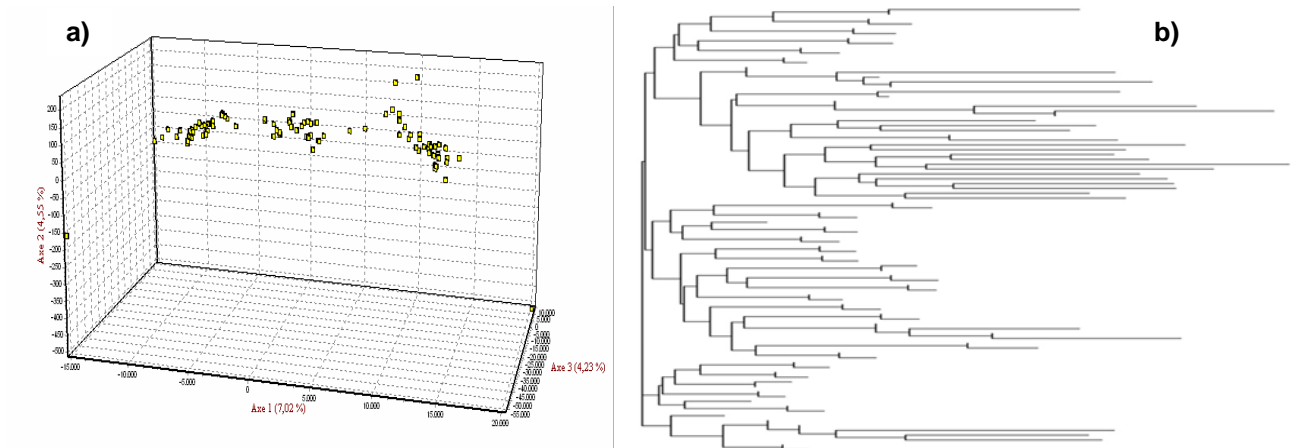


Figura 1. Análisis Factoriales de Correspondencia (a) y distancia DAS entre individuos (b) en la raza ovina Guirra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arranz, J.J., Bayón, Y. & San Primitivo, F. 1998. *Animal Genetics*, 29: 435-440.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. 1996-2004. <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2006. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099-1106.
- Langella, O. 2002. *Populations 1.2.30*. <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Leroy, G. 2008. *Diverité génétique et gestion génétique des races canines*. Thèse Doctorale. Agroparistech-INRA.
- Lozano, J.M., Bouzada, J.A., Pérez, E.M., Oliver, F., Tormo, B., Canals, A. & Montoro, V.(2002). XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Martínez, A.M., Vega-Pla, J.L., Bravo, M.J., Barba, C., Caraballo, J. & Delgado, J.V. 2005. *Arch. Zootec.*, 54: 363-267.
- Peris, B., Corpa, J.M., Rodríguez, M., Ibor, I. & Lainez, M. 2002. XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. *J. Heredity*, 86:248-249 At <http://genepop.curtin.edu.au/> (26/06/2008).
- Treeview 1.6.6. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

GENETIC CHARACTERIZATION OF GUIRRA SHEEP USING EIGHTH MICROSATELLITE MARKERS.

ABSTRACT: Ninety two rams from Guirra Sheep were genotyped for 8 microsatellite markers. Average number of alleles was 9.63. Average theoretical and observed heterozygosity were 0.762 and 0.705, respectively. The probabilities of paternity exclusion with 1 and 2 unconfirmed parents were 0.9817 and 0.99999, respectively. Genetic diversity level in this sheep breed is reasonably high and comparable with other Spanish sheep breeds. Correspondence factorial analysis showed a genetic structure of the population in three clusters. Genetic markers used in this study could be a valuable tool for both genetic resource banking and animal breeding programs in this breed.

Key words: genetic variability, microsatellite, Guirra Sheep