

# ANÁLISIS GENÉTICO DE LA RAZA OVINA ARANESA CON MARCADORES MICROSATÉLITE

GENETIC ANALYSIS OF ARANESA SHEEP BREED USING MICROSATELLITE MARKERS

Marmi, J., P.M. Parés y J. Jordana\*

Unitat de Ciència Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona. España. \*Correspondencia: jordi.jordana@uab.cat

## PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Variabilidad genética. Conservación.

## ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic variability. Conservation.

## RESUMEN

Dentro del programa de conservación de la raza ovina Aranesa, iniciado el año 2004 por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya y la Universitat Autònoma de Barcelona, se está analizando su variabilidad genética con 13 marcadores microsatélite. Se han genotipado 170 animales pertenecientes a 12 localidades distribuidas en la comarca de la Val d'Aran. Los valores de heterocigosidad encontrados fueron elevados ( $H_o = 0,684 \pm 0,046$ ;  $H_e = 0,740 \pm 0,031$ ). El déficit de heterocigotos (estimación aproximada de la consanguinidad) obtenido para toda la raza fue de aproximadamente el 7% ( $F_{IT} = 0,071 \pm 0,038$ ). Estos resultados sugieren que, a pesar de su reducido censo poblacional, la raza Aranesa aún conserva niveles relativamente altos de variabilidad genética y, en su conjunto, presenta una baja consanguinidad.

## SUMMARY

The conservation program of the Aranesa sheep breed, which is carried out by the Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of

the Generalitat de Catalunya and the Universitat Autònoma de Barcelona, started in the 2004. Within this program, we analysed the genetic diversity of the breed using 13 microsatellite markers. We genotyped 170 animals belonging to 12 localities around the Val d'Aran region. The obtained values of heterozygosity were high ( $H_o = 0.684 \pm 0.046$ ;  $H_e = 0.740 \pm 0.031$ ). The deficit of heterozygotes (approximated inbreeding estimation), obtained for the entire breed was approximately 7% ( $F_{IT} = 0.071 \pm 0.038$ ). These results suggest that, the Aranesa sheep breed still conserves relatively high levels of genetic variability and, as a whole, it shows low consanguinity, although its endangered status.

## INTRODUCCIÓN

La oveja Aranesa es una raza autóctona catalana, localizada en la comarca de la Val d'Aran, que se encuentra en grave peligro de extinción. Actualmente quedan unos 1700 ejemplares repartidos en 64 explotaciones. A principios de 2004 se creó la asocia-

ción de la raza (ACORA) y ese mismo año se inició un programa para su conservación, financiado por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya y el Conselh Generau d'Aran, en colaboración con la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del cuál se está realizando el presente trabajo.

Los microsatélites son marcadores genéticos altamente polimórficos que se caracterizan por ser secuencias cortas de ADN formadas por repeticiones en tándem de uno a seis nucleótidos (Goldstein y Schlötterer, 1999). Los elevados niveles de variabilidad genética que suelen presentar dichos marcadores los convierten en una óptima herramienta para trabajos de caracterización genética a nivel racial o poblacional. En el presente trabajo se analizan los niveles de variabilidad genética de la raza Aranese, utilizando 13 marcadores microsatélite.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de 170 animales procedentes de 12 localidades de la comarca de la Val d'Aran: Bausen, Betlan, Bossost, Canejan, Era Bordeta, Garós, Gessa, Lès, Salardú, Sant Joan de Torau, Vielha y Vilamós. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de Ausubel *et al.* (1989). El genotipado se realizó mediante 13 marcadores microsatélite (McM42, INRA49, TGLA53, McM527, MAF65, HSC, OarCP49, OarAE119, OarFCB11, OarCP34, McM218, OarCP20, MAF214). Los

productos de PCR se analizaron en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems, CA, USA) utilizando el marcador interno estándar de tamaño ROX 70-500. La lectura de los alelos se llevó a cabo con el programa GENEMAPPER v3.7 (Applied Biosystems).

Las frecuencias alélicas y los valores de diversidad genética se obtuvieron con el programa GENETIX v4.05 (Belkhir *et al.*, 2001). Se utilizó el programa FSTAT v1.2 (Goudet, 1995) para detectar posibles déficit de heterocigotos para cada *locus* a partir del cálculo del valor F-estadístico (análogo a  $F_{IT}$  de Wright).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los *loci* analizados fueron polimórficos, mostrando un mínimo de 7 alelos en INRA49 y OarCP34 y un máximo de 17 alelos en OarCP49 (**tabla I**). El número medio de alelos por *locus* fue 10,2 ( $\pm 0,9$ ). Los valores medios de heterocigosis fueron relativamente elevados ( $H_o = 0,684 \pm 0,046$ ;  $H_e = 0,740 \pm 0,031$ ) y comparables a los obtenidos en otras razas españolas (Arranz *et al.*, 1998). En un reciente estudio realizado en la raza ovina Xisqueta, geográficamente muy próxima a la Aranese, con los mismos marcadores (Avellanet, 2006), se encontraron valores medios de heterocigosis ( $H_o = 0,707 \pm 0,027$ ,  $H_e = 0,760 \pm 0,027$ ) muy parecidos a los que presenta la raza Aranese. No obstante, el número de alelos encontrados en la Xisqueta fue ligeramente menor [entre 6 (INRA49, OarAE119 y MAF214) y 10 alelos (TGLA53)]. En este caso se

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA OVEJA ARANESA

**Tabla I.** Valores de variabilidad genética en los 13 marcadores microsatélite analizados en la raza Aranesa.  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada (estimador no sesgado),  $F_{IT} \approx F$  = estimación de la consanguinidad total. (Genetic variability values in the Aranesa sheep breed).

Locus	Rango (pb)	Número de alelos	$H_o$	$H_e$	$F_{IT}$
McM42	81-107	8	0,6135	0,6772	0,091**
INRA49	139-163	7	0,6234	0,6109	- 0,024
TGLA53	118-136	10	0,8528	0,8589	0,004
McM527	160-178	9	0,7425	0,7840	0,050**
MAF65	124-140	8	0,7041	0,7151	0,012
HSC	263-297	16	0,8526	0,9171	0,067***
MAF214	178-256	10	0,5298	0,5440	0,023
OarCP49	78-128	17	0,7829	0,8583	0,085***
OarAE119	146-182	8	0,2344	0,5964	0,606***
OarFCB11	116-140	10	0,8267	0,7556	- 0,098
OarCP34	108-120	7	0,7308	0,8152	0,101***
McM218	134-160	11	0,6369	0,6858	0,069***
OarCP20	63-87	10	0,7679	0,7966	0,033*
Media		10,2±0,9	0,684±0,046	0,740±0,031	0,071±0,038***

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

analizaron 622 individuos. Estos resultados demuestran que, a pesar de tener un censo poblacional aproximadamente nueve veces inferior y un área de distribución mucho más restringida que la oveja Xisqueta, la raza Aranesa posee altos niveles de variabilidad genética y un mayor polimorfismo. En la **tabla II** se muestran las frecuencias alélicas observadas en la oveja Aranesa. La distribución de las frecuencias de los alelos comunes en las dos razas es muy parecida, especialmente en lo que respecta a los alelos mayoritarios. La mayoría de los 37 alelos que presenta además la raza Aranesa aparecen en frecuencias relativamente bajas o muy bajas, lo que implica que muchos de ellos podrían perderse por efectos asociados a la

deriva genética.

Ocho *loci* mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg, presentando todos ellos cierto déficit de heterocigotos, el cual fue especialmente pronunciado en OarAE119 (**tabla I**). Este déficit, obtenido para el global de la raza (estimación aproximada de la consanguinidad), fue de aproximadamente el 7% [ $F_{IT} = 0,071 \pm 0,038$  ( $p < 0,001$ )], lo que sugiere, que la raza Aranesa en su conjunto, presenta una consanguinidad relativamente baja. Sin embargo, el elevado número de *loci* en desequilibrio nos puede hacer pensar en una cierta subestructuración reproductiva en el seno de la misma, la cual deberá ser analizada y/o corroborada en estudios futuros.

MARMI, PARÉS Y JORDANA

**Tabla II.** Frecuencias alélicas (tamaño en pares de bases) para los 13 marcadores analizados en la raza ovina Aranesa. En cursiva se marca el alelo que presentó mayor frecuencia para cada locus. N indica el número de individuos analizados por locus. Los asteriscos marcan alelos descritos en la raza Aranesa que no han sido descritos en la raza Xisqueta. (Allele sizes and allele frequencies for 13 microsatellite loci in Aranesa sheep breed).

Locus	Alelo	Frecuencia	Locus	Alelo	Frecuencia	Locus	Alelo	Frecuencia
McM42 (N=163)	81	0,068	HSC (N=156)	263	0,080	OarAE119 (N=128)	146	0,016
	85*	0,037		265*	0,003		152	0,609
	87	0,479		267*	0,032		154*	0,039
	89	0,089		269	0,077		158	0,078
	95	0,285		271	0,103		174	0,137
	97	0,012		273	0,128		178*	0,004
	99	0,021		275	0,112		180	0,082
	107	0,009		277	0,067		182	0,035
			279*	0,013				
INRA49 (N=154)	139	0,565	MAF214 (N=168)	283	0,074	OarFCB11 (N=150)	116	0,003
	141	0,006		285*	0,058		118	0,121
	145	0,218		287*	0,035		120	0,174
	149	0,019		289*	0,006		122	0,248
	159*	0,029		293*	0,074		124	0,003
	161	0,153		295	0,109		126*	0,007
	163*	0,010		297*	0,029		130	0,042
				132	0,376			
TGLA53 (N=163)	118	0,132	OarCP34 (N=156)	178	0,027	134	0,023	
	120	0,156		180*	0,003	140*	0,003	
	122	0,187		182*	0,006			
	124	0,024		184	0,607	108	0,231	
	126	0,003		186	0,294	110	0,205	
	128	0,071		200*	0,006	112	0,125	
	130	0,037		216	0,015	114	0,070	
	132	0,095		218	0,033	116	0,244	
	134	0,209		252	0,006	118	0,109	
	136	0,086		256*	0,003	120	0,016	
McM527 (N=167)	160	0,006	OarCP49 (N=152)	78*	0,016	McM218 (N=168)	134	0,074
	162*	0,045		80	0,197		136	0,030
	166	0,165		82*	0,020		138	0,152
	168	0,287		86*	0,033		140	0,074
	170	0,308		90	0,220		142	0,071
	172	0,081		92	0,069		144*	0,009
	174	0,063		94*	0,020		146*	0,018
	176	0,021		96	0,066		152*	0,009
	178	0,024		98	0,020		154	0,524
		100	0,046	156	0,036			

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA OVEJA ARANESA

**Tabla II.** Continuación (Continuation). Frecuencias alélicas (tamaño en pares de bases) para los 13 marcadores analizados en la raza ovina Aranesa. En cursiva se marca el alelo que presentó mayor frecuencia para cada locus. *N* indica el número de individuos analizados por locus. Los asteriscos marcan alelos descritos en la raza Aranesa que no han sido descritos en la raza Xisqueta. (Allele sizes and allele frequencies for 13 microsatellite loci in Aranesa sheep breed).

Locus	Alelo	Frecuencia	Locus	Alelo	Frecuencia	Locus	Alelo	Frecuencia
MAF65 (N=169)	124	0,012	102*		0,204	OarCP20 (N=168)	160*	0,003
	126	0,322	104		0,007		63*	0,039
	128	0,396	106*		0,020		65	0,310
	130	0,145	108*		0,003		67	0,092
	132	0,024	118*		0,020		69	0,187
	136	0,039	124*		0,016		71	0,003
	138	0,050	128*		0,023		73*	0,009
	140*	0,012					75	0,241
					77	0,009		
					81	0,071		
					87	0,039		

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. También agradecemos a

los criadores de oveja Aranesa y a su asociación ACORA, la ayuda y colaboración recibida durante el periodo de muestreo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Arranz, J.J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim. Genet.*, 89: 435-440.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Avellanet, R. 2006. Conservación de recursos genéticos ovinos en la raza Xisqueta: Caracterización estructural, racial y gestión de la diversidad en programas *in situ*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Belkhir K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Arrufaste and F. Bonhomme. 2001. GENETIX 4.02, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Goldstein, D.B. and C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, 86: 385-386.