



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



# **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA PRELIMINAR Y PRUEBAS DE PARENTESCO EN LA RAZA OVINA GUIRRA**

María Pilar Andreu Plaza

**Tesis de Máster en Producción Animal**



**Director:** Dra. María Pilar Viudes de Castro  
Valencia, diciembre 2007

---

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Control de la filiación .....	2
1.2. Marcadores moleculares .....	3
1.3. Técnicas de biología molecular .....	4
1.3.1. Aislamiento del ADN .....	5
1.3.2. Cuantificación de ADN .....	5
1.3.2.1. Electroforesis horizontal en gel de Azarosa .....	5
1.3.2.2. Espectrofotometría .....	8
1.3.3. Amplificación del ADN mediante PCR .....	8
1.3.4. Secuenciación de los productos de PCR .....	10
1.4. Parámetros de variabilidad genética: .....	11
1.5. Pruebas de paternidad .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. Toma de muestras: .....	16
3.2. Extracción de ADN .....	17
3.3. Electroforesis horizontal en gel de Agarosa .....	18
3.4. Determinación de la concentración de ADN .....	19
3.5. Estandarización de la concentración de ADN .....	19
3.6. Genotipado de los microsatélites .....	19
3.7. Condiciones de la PCR .....	21
3.8. Secuenciación de los microsatélites .....	23
3.9. Parámetros de variabilidad genética .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>41</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>45</b>
7.1. Perfiles de los microsatélites amplificados .....	45

## 1. INTRODUCCIÓN

La raza Guirra, también denominada Roja Levantina o “Sudat”, es la única especie ovina autóctona de la Comunidad Valenciana. Está ubicada mayoritariamente en las comarcas de la Vall d'Albaida, Valle de Ayora y Camp del Túria, en Valencia; la Marina Alta, en Alicante y la Plana, en Castellón.

El origen de la raza es confuso, pero según Sánchez (1976), pudo originarse a través de cruces entre las razas del Norte de África (Algeria Arab y Beni Ashen) y la raza española Manchega.

Morfológicamente, la oveja Guirra (Figura 1) se caracteriza por el color rojo oscuro de la piel, posee un perfil claramente convexo en las hembras e incluso ultraconvexo en los machos. El vellón cubre el tronco, el cuello y parte de los miembros, dejando libre tanto la cabeza como el borde inferior del cuello y vientre. La lana se recubre de abundante suarda, confiriéndole cierta untuosidad, esta última característica justifica el nombre valenciano de "sudat" .Tiene una constitución fuerte y se adapta muy bien a terrenos secos y áridos. Las hembras tienen un buen comportamiento maternal y esto es aprovechado en su doble uso: producción de carne y producción de leche. (Marco, 2007).



Figura 1: Guirras del CITA

No existe un registro individualizado de estos animales hasta 1996, por ello su evolución censal solo puede estudiarse a través de las estimaciones realizadas por varios autores (Figura 2).

En 1997 fue creada la Asociación Nacional de Criadores de la Raza Guirra (ANGUIRRA) y en 1999 se creó el libro genealógico. A partir de ese momento existe un mayor control de la población. El censo oficial más reciente es del año 2003, en el que se indica una población total de 3.824 animales, de los cuales 3.640 son hembras y 174 machos, distribuidos en 34 rebaños (26 en Valencia, 4 en Castellón y 4 en Alicante (Peris *et al.*, 2002).

La poca tradición ganadera de la Comunidad Valenciana, la elevada edad media de los ganaderos en activo y la falta de aliciente oficial para mantener viva la raza, son sólo algunas de las causas que están provocando el retroceso a pasos agigantados del sector ovino. La raza Guirra está incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como raza pura de protección especial, según la Orden APA/661/2006 de 3 de marzo que recientemente ha sustituido al RD de 1.682/1997; por ello, es muy importante la aplicación de medidas específicas para su conservación.

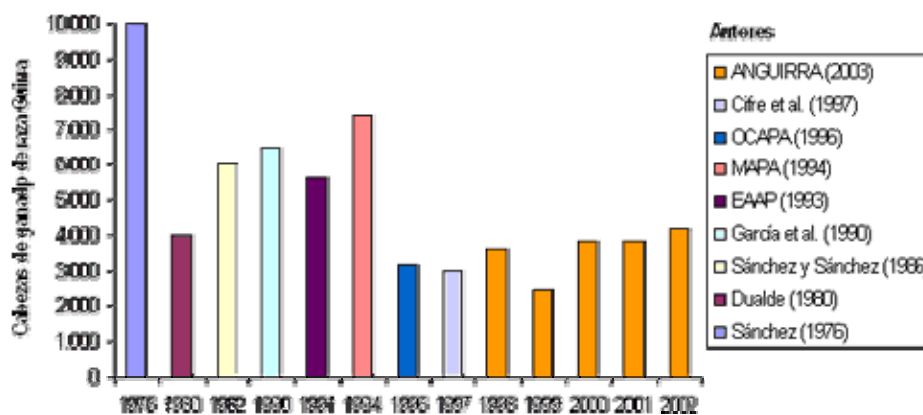


Figura 2. Evolución censal de la raza Guirra. (ANGUIRRA, 2003)

### 1.1. Control de la filiación

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 el correcto funcionamiento de los programas de Mejora Genética. (Lozano *et al.*, 2002). Si en una explotación el número de errores en la asignación de paternidades es alto, los planes de mejora genética se verán seriamente

amenazados. Es habitual que la asignación de paternidades se realice controlando el número de días entre la inseminación y el nacimiento del cordero, pero este método puede generar errores, por esta razón, es mejor el uso de técnicas moleculares para el correcto control de la filiación.

Los distintos tipos de polimorfismos de ADN se han mostrado como los marcadores más útiles para el control de parentesco en animales domésticos. (Pepin *et al.*,1995). La filiación de los animales puede verificarse mediante el análisis de las diferencias en marcadores genéticos, los cuales pueden analizarse de manera fácil y rápida a partir de una cantidad mínima de material biológico. Cada marcador posee una probabilidad de exclusión de paternidad que se incrementa mediante el uso de un panel de varios marcadores. Esta técnica permite estudiar la variabilidad genética de las poblaciones, la caracterización de distintas líneas o razas y la comprobación de las relaciones de parentesco.

## **1.2. Marcadores moleculares**

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad:

- Buena distribución a lo largo del genoma.
- Alto grado de polimorfismo.
- La técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica.
- Debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios.

Los marcadores moleculares más utilizados son los microsatélites que se describen como tramos de secuencias simples de ADN con un alto grado de hipervariabilidad (Tautz *et al.*,1989). Estas secuencias simples consisten en segmentos cortos de ADN con motivos repetidos de 2 a 6 pares de bases, normalmente dinucleótidos. El polimorfismo de los microsatélites viene dado por la variación en el número de repeticiones en un determinado locus, revelados como variación en la longitud de los fragmentos de los productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los microsatélites están precedidos por unas secuencias flanqueantes o *primers* que deben ser previamente determinadas para su amplificación mediante PCR.

Los microsatélites están bien distribuidos a lo largo del genoma de los eucariotas pero con baja frecuencia en las regiones codificantes. Se desconoce el significado

funcional de estas secuencias, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que están relacionados con el empaquetamiento y condensación del ADN en los cromosomas eucariotas (Vanhala *et al.*, 1998).

Otros marcadores que también poseen secuencias repetitivas son las secuencias satélites, con repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 5 y 100 bases y las secuencias minisatélites, con repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 15 y 70 bases.

Una de las ventajas de estos marcadores frente a otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, por la mayoría de autores, como la herramienta más poderosa para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994), ya que: son altamente polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), fáciles de analizar, cien por cien fiables, repetitivos y automatizables.

Los microsatélites, como hemos visto en este apartado, al ser muy polimórficos y poseer la ventaja de poder ser amplificados mediante PCR, son de gran utilidad en las pruebas de parentesco. Además gracias a la PCR multiplex, en un solo análisis, se pueden amplificar varios loci independientes de forma simultánea alcanzando un alto poder de resolución en genealogías dudosas (Heyen *et al.*, 1997).

### **1.3. Técnicas de biología molecular**

Para obtener los parámetros de variabilidad genética que nos proporcionan los microsatélites es necesario genotiparlos para determinar los diferentes alelos, para ello se han aplicado las siguientes técnicas moleculares:

- 1.3.1. Aislamiento de ADN a partir de sangre
- 1.3.2. Cuantificación de ADN:
  - 1.3.2.1. Electroforesis horizontal en gel de Agarosa
  - 1.3.2.2. Espectrofotometría
- 1.3.3. Amplificación del ADN mediante PCR
- 1.3.4. Secuenciación de los productos de PCR

### **1.3.1. Aislamiento del ADN**

A pesar de que las técnicas de aislamiento del ADN varían ligeramente dependiendo del organismo experimental, todos estos métodos comparten las siguientes características:

- Tratamiento para lisar las células y liberar el ADN.
  - Lisis de leucocitos (lisis nuclear).
- Tratamiento para separar el ADN de las proteínas y otras moléculas contaminantes.
  - Precipitación de proteínas
- Precipitación del ADN con isopropanol o etanol.
- Resuspensión en tampón de elución.

El método de extracción empleado utiliza SDS (Dodecil Sulfato Sódico), detergente aniónico que tiene la capacidad de desnaturalizar las proteínas y disolver las membranas celulares lisando así los núcleos y liberando el ADN. También utiliza Tritón X-100 surfactante no iónico, como tampón de lisis, que actúa permeabilizando las membranas celulares.

Los métodos clásicos de purificación de ADN se basan en el uso de disolventes orgánicos tóxicos, mediante extracción con fenol/cloroformo. En este trabajo se ha utilizado un procedimiento “salting out” en el que se emplean altas concentraciones salinas consiguiendo el mismo objetivo que los disolventes orgánicos: desproteinizar la muestra.

### **1.3.2. Cuantificación de ADN.**

#### **1.3.2.1. Electroforesis horizontal en gel de Agarosa.**

La electroforesis de ácidos nucleicos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN. Las moléculas se mueven, a través del gel de Agarosa, por la acción de un campo eléctrico entre dos electrodos sumergidos en un líquido. En los tampones habitualmente utilizados, los ácidos nucleicos están cargados negativamente y migran hacia el ánodo.

Al avanzar las moléculas de ADN, su velocidad de migración se ve reducida por la matriz del gel de Agarosa. Las moléculas menores se mueven más deprisa a través de los poros del gel que las de mayor tamaño. Como resultado, se produce una separación continua de los fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño, de modo que los fragmentos más pequeños avanzan la mayor distancia con referencia al origen o punto de aplicación de la muestra.

Los geles de Agarosa (en cubetas horizontales, figura 4) se emplean para fragmentos grandes de ADN (500pb-10Mb). Utilizando Agarosa de distintas concentraciones (distinto grado de reticulación) pueden separarse fragmentos de hasta 50kb aplicando un campo eléctrico constante.

Ya que el ADN es incoloro, para ver el recorrido de la muestra, se añade tampón de carga que actúa incrementando su densidad asegurando así que el ADN quede en el fondo del pocillo. El tampón de carga contiene colorantes como el azul de bromofenol, que posee carga negativa y una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos. Su función es ir por delante de la muestra para ir marcando el frente de electroforesis y así poder visualizar como se va realizando la carrera.

El Bromuro de Etidio añadido en la preparación del gel se intercala entre las bases de ADN y mediante un transiluminador se observa si han aparecido bandas fluorescentes, que indican la presencia de ADN en la muestra.

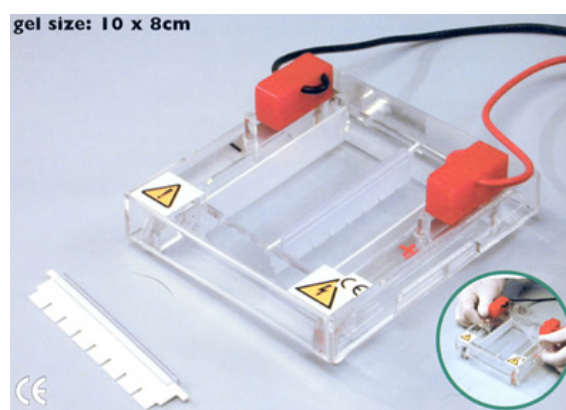


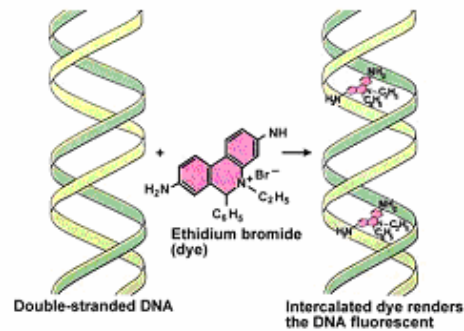
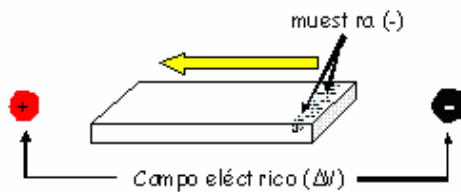
Figura 3. Esquema de la electroforesis horizontal en gel de Agarosa.



## ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

**Soporte:** (restrictivo) Agarosa

**Electroforesis horizontal**



1. Preparar el gel.
2. Aplicación de la muestra.
3. Electroforesis.
4. Detección por tinción con **Bromo de Etidio** (BrEt): se intercala en el DNA y al irradiarlo con luz UV emite fluorescencia.

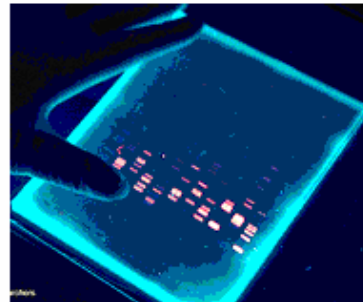


Figura 4. Cubeta de electroforesis horizontal

En tabla I se describen los distintos componentes del tampón de carga.

**Tabla I.** Características de los componentes del tampón de carga.

Componentes	Característica	Utilidad
Sacarosa o Glicerol	Densos e hidrófobos	Incrementan la densidad de la muestra, aseguran que el ADN baje en forma pareja dentro del pozo
Azul de bromofenol	Migra en un corrido electroforético, a una velocidad similar a un ADN helicoidal súper enrollada (300 pb aprox.)	Es una forma de evidenciar a simple vista el corrido electroforético de los fragmentos de ADN compactos
Xileno-cianol	Migra en un corrido electroforético, a una velocidad similar a un ADN doble de cadena lineal (4.000 pb aprox.)	Es una forma de evidenciar a simple vista el corrido electroforético de los fragmentos de ADN laxos.

### 1.3.2.2. Espectrofotometría

Con el método de extracción usado, el ADN obtenido es lo suficientemente puro para su cuantificación mediante espectrofotometría.

El espectrofotómetro proyecta un haz de luz monocromática de una longitud de onda determinada a través de la muestra y mide la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. La concentración de la muestra es proporcional a la absorbancia, según la Ley de Lambert-Beer: “la fracción de la luz incidente que es absorbida por una solución es proporcional a la concentración de soluto y al espesor de la sustancia atravesada por la luz.”

La técnica se basa en que el espectro de absorción de ADN presenta un máximo a una longitud de onda de 260 nm, de modo que la lectura a esa longitud permite calcular la cantidad de ADN presente en la muestra. A 260 nm una absorbancia de 1 corresponde aproximadamente a: 50 µg/mL en el caso de ADN de doble cadena, a 40 µg/mL para ADN de cadena sencilla y ARN y 20µg/mL para oligonucleótidos.

El biofotómetro calcula directamente la concentración de ADN a partir de la absorbancia a 230, 260, 280 y 320. Para estimar el grado de contaminación del ADN se utiliza como criterio de pureza la relación entre absorbancias:

- Abs 260 / Abs 280 mayor de 1.75: corresponde a un grado de pureza adecuado.
- Abs 260 / Abs 280 menor de 1.75: la preparación está contaminada con proteínas.

### 1.3.3. Amplificación del ADN mediante PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta muy útil en el desarrollo de la genética molecular. Puesto que en ocasiones la muestra de ADN de la que disponemos es demasiado pequeña, las técnicas de PCR permiten amplificar más de un millón de veces el ADN a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Fue descrita por K. Mullis en 1983, el cual obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho descubrimiento.

Esta técnica se basa en la utilización de una enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que replica fragmentos de ADN a partir de oligonucleótidos que sirven como cebadores (Mullis *et al.*, 1987).

La muestra de ADN original bicatenario es calentada para separar las dos cadenas. A continuación, los cebadores hibridan en lugares específicos de cadenas opuestas del ADN. Utilizando estos cebadores como inicio de replicación, la Taq polimerasa comienza a copiar el ADN de la muestra. Una vez completada la replicación del segmento delimitado por los dos cebadores (primer ciclo), las dos moléculas nuevas de la cadena doble se desnaturalizan por calor y comienza el segundo ciclo de replicación. La repetición de los procesos de síntesis y desnaturalización llevan a un aumento exponencial del número de segmentos replicados. Este proceso se realiza en un termociclador.

La reacción se desarrolla en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos (Figura 5):

**1. Desnaturalización:** Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95 °C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos.

**2. Hibridación:** Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado, se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60 °C para que se pueda producir la unión de los *primers* a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o *annealing* ( $T_m$ , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. Una fórmula simple para calcular la  $T_m$  es la siguiente:

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T).$$

No obstante, cada *primer* exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de *annealing* específica, ya que si la temperatura es

muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

**3. Extensión:** Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del *primer*, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72 °C, ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. La cantidad de ADN amplificado viene dado exponencialmente por  $2^n$ , siendo n el número de ciclos.

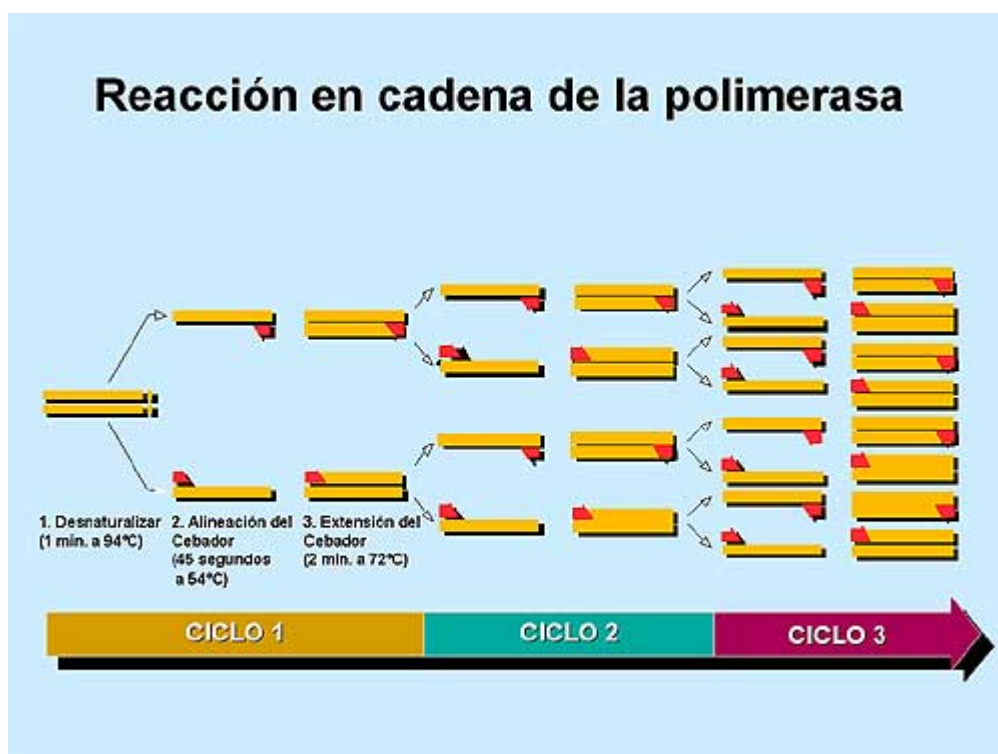


Figura 5. Esquema de la PCR

#### **1.3.4. Secuenciación de los productos de PCR**

Los productos obtenidos en la PCR son secuenciados mediante un equipo de electroforesis capilar con marcaje fluorescente (Figura 6). El principio de la electroforesis se basa en la utilización de una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar moléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. El capilar se rellena con un polímero de poliacrilamida, a través del cual se moverán los fragmentos de ADN al aplicarles una diferencia de potencial. La detección de los fragmentos se realiza con un láser, para ello es necesario que el producto amplificado esté marcado de

forma fluorescente, que se consigue marcando los *primers* previamente con fluorocromos (Prieto *et al.*, 2002).

Las muestras se procesan de una en una, por ello es imprescindible añadir a cada muestra un patrón interno (fragmentos de ADN de tamaño conocido). Como resultado se obtiene un electroferograma con picos característicos de cada compuesto separado.



Figura 6. Secuenciador automático Beckman Coulter.

#### 1.4. Parámetros de variabilidad genética:

Una de las primeras etapas en los programas de conservación de razas en peligro de extinción consiste en la evaluación de su variabilidad genética a nivel molecular. Para ello necesitamos poner a punto una técnica de amplificación de una amplia batería de microsatélites para identificar a cada individuo, intentando mantener la máxima diversidad genética con el mínimo incremento de consanguinidad por generación.

Para evaluar la variabilidad genética de una población debemos determinar varios parámetros fundamentales como son:

- **Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ):** la  $H_e$  de una población en la que hay  $n$  variantes alélicas en un determinado locus, fue definida por Nei (1973) como la heterocigosidad esperada bajo el equilibrio Hardy -Weinberg (H-W). Por lo tanto:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{i=n} p_i^2$$

Siendo  $p_i$  la frecuencia del alelo  $i$ .

Una población se dice que está en equilibrio H-W cuando las frecuencias genotípicas son producto de las frecuencias alélicas, es decir, para un locus con dos alelos A y B, con frecuencias  $p$  y  $q$  respectivamente en una determinada población, se cumple que:

- $f(AA) = p^2$
- $f(BB) = q^2$
- $f(AB) = 2 \cdot p \cdot q$

Esta ley se da en poblaciones grandes, donde no hay selección, ni mutación, ni migración y donde el apareamiento es al azar.

- **Heterocigosidad observada ( $H_o$ ):** definida como la proporción de heterocigotos que tiene la población. Varias poblaciones pueden tener la misma  $H_o$  pero distinta  $H_e$  y es una medida para comprobar en qué grado la población se encuentra o no en equilibrio H-W.
- **Contenido de información polimórfica (PIC):** se obtiene a partir de la  $H_e$  y da una medida del grado de información proporcionado por un microsatélite. Valores de PIC inferiores a 0,5 no son muy útiles en los test de parentesco.

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

Donde  $k$  es el número de alelos y  $x_i, x_j$  son las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$ .

## 1.5. Pruebas de paternidad

La eficacia de las pruebas de paternidad se mide en términos de la probabilidad de exclusión, definida de forma sencilla como la probabilidad de excluir a todos excepto al padre verdadero.

La eficacia de las pruebas de paternidad aumenta con el número de fenotipos distintos que pueden presentarse con una cierta probabilidad, y depende de: el número de loci, el número de alelos de cada locus y de la frecuencia de los alelos en cada locus. Por ejemplo: si en una población existen dos alelos para un locus, y uno de ellos tiene una frecuencia muy alta, dicha probabilidad será muy pequeña ya que casi todos los individuos tendrán el mismo fenotipo.

Mediante el programa informático CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007), calcularemos 3 tipos de probabilidad de exclusión:

- **Probabilidad de exclusión combinada ( $PE_2$ ):** es la probabilidad media, utilizando un set de loci, de excluir como progenitor a un candidato no emparentado cuando el genotipo del otro parental es conocido.
- **Probabilidad de exclusión combinada ( $PE_{PP}$ ):** es la probabilidad media, utilizando un set de loci, de excluir como progenitores a una pareja de candidatos no emparentados.
- **Probabilidad de exclusión combinada ( $PE_{Si}$  identity):** es la probabilidad media, utilizando un set de loci, de diferenciar entre hermanos completos.

Para determinar la confianza de las asignaciones, y conocer el candidato parental mas probable, el programa Cervus calcula dos valores estadísticos: el *LOD score* y el *Delta score*. El *LOD score* se obtiene aplicando el logaritmo natural del ratio de verosimilitudes. Cuando el *LOD score* es negativo significa que es muy poco probable que el parental candidato sea el verdadero progenitor. El *Delta score* se define como la diferencia entre el *LOD score* del candidato mas probable y del segundo mas probable. Solo se consideran valores *LOD score* superiores a cero cuando se calcula el *Delta score*. La ventaja de *Delta score*, frente a *LOD score*, es que éste previene las

asignaciones incorrectas cuando dos o mas candidatos tienen un *LOD score* positivo similar.

Otro parámetro usado en el análisis es el nivel de confianza, que puede definirse como la tolerancia de asignar un falso positivo. El programa permite elegir entre 2 niveles de confianza: el *relajado+* (al 80% de confianza) y el *estricto\** (al 95% de confianza). El CERVUS calcula el *LOD* y el *Delta score* para cada nivel de confianza.

Antes de iniciar el análisis de parentesco, se debe realizar una simulación previa, necesaria para examinar la viabilidad del análisis de parentesco usando un determinado set de loci y para calcular los valores críticos del ratio de verosimilitudes.



## **2. OBJETIVOS.**

Los objetivos principales del presente trabajo son: por un lado, la caracterización genética preliminar de la raza ovina Guirra mediante el uso de una batería inicial de 15 microsatélites recomendados por la ISAG (2002) y aplicados por primera vez en esta raza; y por otro lado, la puesta a punto de un panel de marcadores genéticos, preciso y eficaz, intentando agrupar el mayor número de microsatélites por multiplex, que facilitará la correcta identificación individual y el control de la filiación de los corderos recién nacidos.

De esta manera se podrán organizar esquemas de apareamientos que conlleven la menor consanguinidad posible dentro del plan de recuperación y conservación de la raza.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Toma de muestras:

Se tomaron muestras de sangre del grupo de Guirras del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe, compuesto por 21 animales (12 ovejas, 1 morueco y 8 corderos) (Figura 7). La sangre se extrajo mediante punción en la vena yugular utilizando tubos de vacío Vacutainer™ con EDTAK<sub>3</sub> como anticoagulante. Seguidamente las muestras de sangre fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.



Figura 7. Hembras (sup. izda.), macho (sup. dcha.) y corderos (inf.) del CITA

### 3.2. Extracción de ADN

Una etapa clave en cualquier proceso en el que haya que trabajar con ADN es el proceso de extracción del mismo a partir de las muestras tomadas. De ahí que al inicio de esta experiencia se estableciera como prioridad la elección y puesta a punto en nuestro laboratorio de un protocolo de obtención de ADN a partir muestras de sangre, que fuese sencillo y con un buen rendimiento como para poder disponer de la cantidad suficiente de ADN con la que poder trabajar al emplear una gran batería de microsatélites. Por ello, se probaron tres protocolos distintos: uno que empleaba proteinasa K (modificación de Miller *et al.*, 1998), un kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit de Quiagen®) y un método que usaba Tritón X-100 (citado en el estudio de Muñoz-Valle *et al.*, 2000). Finalmente, optamos por este último ya que era el que mayor rendimiento daba en el proceso de extracción.

Tras el aislamiento del ADN, se comprobaba la correcta extracción del mismo mediante electroforesis horizontal en gel de Agarosa y por último se medía su concentración mediante un Biofotómetro (Eppendorf®)

El protocolo de extracción de ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica empleado fue el siguiente:

- Introducir 3 ml de sangre en un tubo estéril de 10 ml y añadir 3 ml de TTS (Tris base 1M pH 7,6, Tritón X-100, Sacarosa 1M).
- Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
- Decantar el sobrenadante evitando la pérdida del pellet formado en el fondo.
- Agregar al pellet 1 ml de TTS, transferirlo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y homogeneizar con vortex hasta disolver el pellet.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y agregar 1 ml más de TTS y volver a disolver el pellet. (Repetir los últimos dos pasos hasta que el pellet quede completamente blanco).
- Una vez se haya decantado el sobrenadante, agregar al pellet 570 µl de NaCl 5mM y homogeneizar 2 minutos (en esta etapa no se decanta).

Añadir 40  $\mu$ l de SDS (Dodecil Sulfato Sódico al 10%) y homogeneizar 10 minutos. Añadir 200  $\mu$ l de NaCl saturado y homogeneizar 15 minutos.

- Centrifugar la mezcla a 12.000 rpm durante 25 minutos.
- Verter el sobrenadante en tubos estériles a los que previamente se les haya añadido 2 ml de etanol absoluto frío. (En esta etapa ya se observa la hebra de ADN).
- Almacenar el tubo que contiene el etanol y el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
- Al día siguiente eliminar con una pipeta pasteur estéril el etanol y se agregar 2 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar a 9000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$
- Eliminar el sobrenadante y colocar el tubo en una posición inclinada sobre papel absorbente para secar el pellet.
- Resuspender el pellet en 500 o 1  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 0,01M, EDTA 0,5M) y almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Electroforesis horizontal en gel de Agarosa

La electroforesis horizontal se llevó a cabo en un gel de Agarosa al 3% en TBE (Tris-Borato EDTA) por tinción con Bromuro de Etidio. Se cubrió el gel con TBE 1% y se introdujo en cada pocillo 5  $\mu$ l de muestra y 3  $\mu$ l de tampón de carga. Se aplicaron 100 V durante 45 minutos y seguidamente se observó el gel en el transiluminador (Figura 8) para comprobar que la extracción de ADN se había realizado correctamente.



Figura 8: Imagen de un transiluminador

### **3.4. Determinación de la concentración de ADN**

Debemos conocer la concentración de ADN de cada muestra para el desarrollo de las reacciones de PCR. Para ello empleamos un Biofotómetro Eppendorff®.

Con las muestras obtenidas resuspendidas en tampón de elución (TE), se preparó una dilución 1/100 (10 µl de la muestra en 990µl de TE) y se cuantificó la concentración de ADN en el biofotómetro.

El biofotómetro calcula directamente la concentración de ADN a partir de la absorbancia a 230, 260, 280, y 320nm como ya hemos visto en la introducción.

### **3.5. Estandarización de la concentración de ADN**

Las muestras de ADN se homogeneizaron a una concentración constante de 50 µg/ml para realizar las reacciones de PCR. Se hicieron alícuotas de trabajo de 100µl para evitar el deterioro de la muestra en los procesos de congelación-descongelación.

### **3.6. Genotipado de los microsatélites**

Partimos de una batería inicial de 15 microsatélites recomendados por la ISAG (2002). Para rentabilizar todo el proceso, se optimizó la amplificación de los marcadores en dos PCR múltiplex de 8 y 7 microsatélites cada una.

Como hemos visto anteriormente, gracias a la PCR multiplex podemos amplificar de manera conjunta varios microsatélites. Para obtener una lectura simultánea en el secuenciador, se utilizaron distintos tipos de fluorocromos para microsatélites cuyos rangos de tamaño de producto amplificado se solapaban. Para los marcadores de rangos de tamaños no solapados se utilizó el mismo fluorocromo.

En la Tabla II se muestran las secuencias, el rango de tamaños, la multiplex a la que pertenecen y el fluorocromo usado, de los marcadores microsatélites empleados en el genotipado.

Tabla II. Marcadores microsatélites recomendados por la ISAG (2002).

Marcador	Secuencia (Forward / Reverse)	Tamaño (pb)	Multiplex	Dye
<b>CSR0247</b>	GGA CTT GCC AGA ACT CTG CAA T CAC TGT GGT TTG TAT TAG TCA GG	209-261	1	D2
<b>HSC</b>	CTG CCA ATG CAG AGA CAC AAG A GTC TGT CTC CTG TCT TGT CAT	267-301	1	D3
<b>INRA0063</b>	GAC CAC AAA GGG ATT TGC ACA AGC AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G	169-207	1	D3
<b>MAF0214</b>	AAT GCA GGA GAT CTG AGG CAG GGA CG GGG TGA TCT TAG GGA GGT TTT GGA GG	181-265	1	D4
<b>OarAE0129</b>	AAT CCA GTG TGT GAA AGA CTA ATC CAG GTA GAT CAA GAT ATA GAA TAT TTT TCA ACA CC	135-165	1	D4
<b>OarCP0049</b>	CAG ACA CGG CTT AGC AAC TAA ACG C GTG GGG ATG AAT ATT CCT TCA TAA GG	82-140	1	D2
<b>OarFCB0011</b>	GCA AGC AGG TTC TTT ACC ACT AGC ACC GGC CTG AAC TCA CAA GTT GAT ATA TCT ATC AC	122-148	1	D3
<b>OarFCB0304</b>	CC TAG GAG CTT TCA ATA AAG AAT CGG C CGC TGC TGT CAA CTG GGT CAG GG	148-190	1	D2
<b>D5S2</b>	TAC TCG TAG GGC AGG CTG CCT G GAG ACC TCA GGG TTG GTG ATC AG	190-210	2	D2
<b>INRA0005</b>	TTC AGG CAT ACC CTA CAC CAC ATG AAA TAT TAG CCA ACT GAA AAC TGG G	120-180	2	D3
<b>INRA0023</b>	GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	201-219	2	D3
<b>MAF0065</b>	AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G CCA CTC CTC CTG AGA ATA TAA CAT G	121-159	2	D4
<b>McM0527</b>	GTC CAT TGC CTC AAA TCA ATT C AAA CCA CTT GAC TAC TCC CCA A	165-179	2	D2
<b>OarFCB0020</b>	GGA AAA CCC CCA TAT ATA CCT ATA C AAA TGT GTT TAA GAT TCC ATA CAT GTG	92-118	2	D2
<b>SPS0113</b>	AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG	130-158	2	D2

### 3.7. Condiciones de la PCR

Para las reacciones de amplificación se empleó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems (Figura 9). Se utilizó la Quiagen® Taq PCR Master Mix, que contiene la Taq DNA polimerasa, los dNTPs y el MgCl<sub>2</sub> necesarios par la reacción de PCR. En la tabla III se describe la composición de la reacción de PCR para un volumen final de 100µl.



Figura 9. Imagen del Termociclador y de la Taq Master MiX

**Tabla III.** Composición de la reacción usando la Taq Master Mix.

Componente	Volumen	Concentración final
Taq PCR Master Mix	50µl	2,5 unidades Taq polimerasa, 1x QUIAGEN PCR Buffer (contiene 1,5nM de MgCl <sub>2</sub> ), 200µM de cada dNTP
Mezcla de <i>primers</i> diluidos		
Primer A	Variable	0,1-0,5µM
Primer B	Variable	0,1-0,5µM
Agua destilada	Variable	---
Cadenas de ADN	Variable	≤ 1µg/reacción
Volumen total	100 µl	---

En nuestro caso el volumen final de reacción fue de 20µl, por lo que la composición de reactivos fue la siguiente:

Composición de reactivos PCR	
ADN	2µl → 100 ng
TAQ MASTER MIX	10µl
<b>PRIMERS (10µM):</b>	
	<b>Multiplex 1</b> Forward + Reverse
CSR0247	0,4 + 0.4 µl
HSC	0.3 + 0.3 µl
INRA0063	0.2 + 0.2 µl
MAF0214	0.5 + 0.5 µl
OarAE0129	0.2 + 0.2 µl
OarCP0049	0.05 + 0.05 µl
OarFCB0011	0.15 + 0.15 µl
OarFCB0304	0.3 + 0.3 µl
	<b>Multiplex 2</b> Forward + Reverse
D5S2	0.2 + 0.2 µl
INRA0005	0.3 + 0.3µl
INRA0023	1.0 + 1.0µl
MAF0065	0.4 + 0.4µl
McM0527	0.2 + 0.2µl
OarFCB0020	0.4 + 0.4µl
SPS0113	0.1 + 0.1µl

Las condiciones programadas en el termociclador para llevar a cabo las reacciones de PCR fueron las siguientes:

### **MULTIPLEX 1**

- Desnaturalización previa: 12 minutos a 95 °C
- 40 ciclos de amplificación:
  - Desnaturalización: 20 segundos a 95 °C
  - Hibridación: 1 minuto a 63 °C
  - Extensión de las cadenas: 1 minuto a 72 °C
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C
- Conservación en nevera a 4 °C

### **MULTIPLEX 2**

- Desnaturalización previa: 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos de amplificación:



- Desnaturalización: 30 segundos a 94 °C
  - Hibridación: 30 segundos a 55 °C
  - Extensión de las cadenas: 1 minuto a 72 °C
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C
  - Conservación en nevera a 4 °C

### **3.8. Secuenciación de los microsatélites**

Los productos de PCR se analizaron mediante un secuenciador CEQ™ 8000 Beckman Coulter para determinar los distintos alelos.

Las placas empleadas en el secuenciador son las mismas que se utilizan para las reacciones de PCR, con una capacidad de hasta 96 muestras (12 filas x 8 columnas).

En cada uno de los pocillos se introdujo:

- 10 µl de producto de PCR
- 30 µl de SLS (Sample Loading Solution)
- 0,3 µl de patrón de tamaños (Genome Lab™ DNA Size Standard Kit-400)
- 1 gota de aceite mineral para evitar que se evapore la muestra.

### **3.9. Parámetros de variabilidad genética**

Con el fin de conocer el perfil genético de la raza, para cada locus se calcularon: las frecuencias alélicas, la proporción de heterocigotos esperados ( $H_e$ ) asumiendo que la población se encuentra bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la proporción de heterocigotos observados ( $H_o$ ) y el contenido de información polimórfica (PIC) mediante el programa informático CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007).

El control de la filiación se realizó comparando los genotipos de los hijos con los genotipos de sus progenitores (Test de maternidad, padre conocido). Para evaluar la utilidad de estos microsatélites en los controles de filiación se calcularon las probabilidades de exclusión ( $PE_2$ ,  $PE_{PP}$ ,  $PE_{SI}$ ), descritas anteriormente, de cada locus y del conjunto de todos los loci.

Posteriormente se realizaron, usando el programa Genepop 4.0.6, varios test para comprobar si con las frecuencias alélicas obtenidas la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg. Bajo la hipótesis nula de unión aleatoria de gametos, se probó, para cada uno de los locus y para el conjunto de los loci: un test para observar la existencia de un déficit de heterocigotos, otro para observar la existencia de exceso de heterocigotos y finalmente, un test de probabilidades (Test exacto H-W).

Por diferentes métodos estadísticos se calcula el P-value:

- P- value  $> 0,05$  se acepta la hipótesis nula,  $H_0$ .
- P- value  $< 0,05$  se acepta la hipótesis alternativa,  $H_1$  (exceso o déficit de heterocigotos)

#### **4. RESULTADOS**

Una vez interpretadas las lecturas proporcionadas por el secuenciador (Electroferogramas), fueron analizadas con el programa Cervus. En la tabla IV podemos ver los parámetros de variabilidad obtenidos para cada marcador y en el capítulo de Anexos se muestran los electroferogramas con los picos característicos de cada microsatélite.

De los 15 microsatélites utilizados amplificaron correctamente 11. En la Multiplex 1, los marcadores Oar FCB0011 y CSR0247 amplificaron muy poco, siendo su lectura confusa, por lo que se decidió eliminarlos del análisis. Por otro lado, los marcadores Oar0129 y MAF 0214 interferían en la lectura de los otros microsatélites de modo que fueron analizados por separado.

En la multiplex 2 se eliminaron los marcadores INRA0023 y McM0527 por su baja amplificación. Los marcadores FCB0020 y SPS0113, siguiendo las condiciones iniciales de PCR, no amplificaban, por lo que se probó su análisis por separado usando una Taq polimerasa más específica: (Hot StarTaq Master Mix de Qiagen®), obteniéndose así buenos resultados.

El número medio de alelos observados es de 4,82 con un rango entre 3 - 8. La heterocigosidad esperada media ( $H_e$ ) es de 0,670 y el contenido medio de información polimórfica (PIC) es de 0,599.

La probabilidad de exclusión combinada  $PE_{PP}$  (Probabilidad de exclusión de una pareja de parentales no emparentados) se muestra elevada dando un valor de 0,9999 para el conjunto de los 11 loci y la probabilidad de exclusión  $PE_{2P}$  (Probabilidad de exclusión de un parental, cuando el genotipo del otro parental es conocido) da un valor de 0,9976.

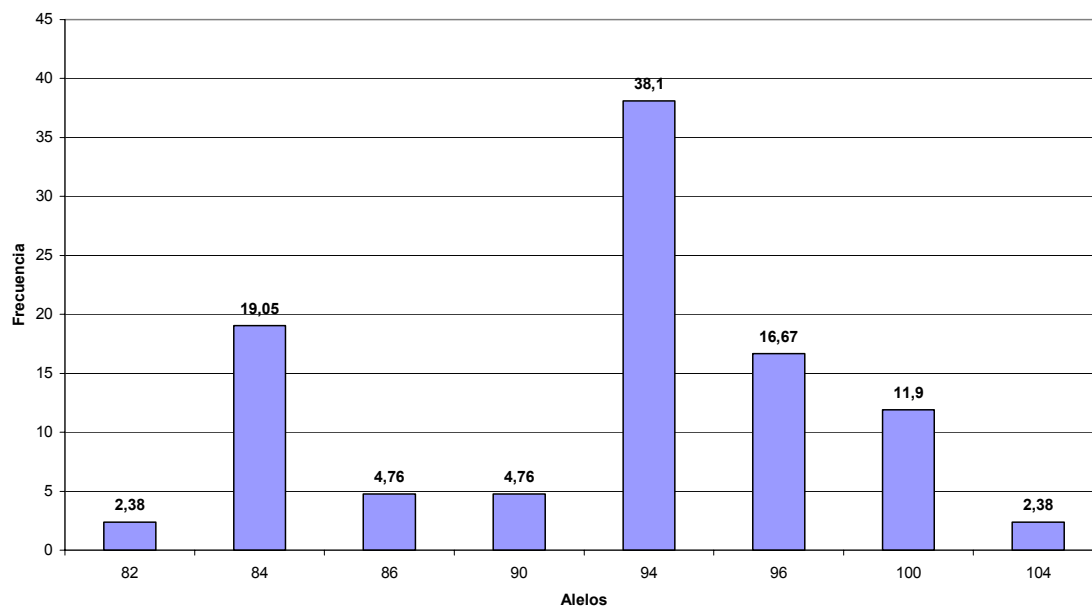
Tabla IV. Parámetros genéticos de la oveja Guirra.

Locus	K*	N*	Ho*	He*	PIC*	PE <sub>2</sub> *	PE <sub>pp</sub> *	PE <sub>si</sub> *	Alelos
OarCp0049	8	21	0,857	0,790	0,742	0,574	0,766	0,615	82,84,86,90,94,96, 100,104
OarAe0129	3	21	0,762	0,652	0,564	0,349	0,499	0,517	137,149,151
OarFCB304	4	21	0,571	0,587	0,519	0,327	0,494	0,477	164,170,186,188
INRA063	3	21	0,667	0,659	0,567	0,35	0,499	0,521	171,177,179
MAF0214	5	21	0,905	0,767	0,707	0,52	0,703	0,598	191,193,195,225, 229
HSC	7	21	0,857	0,813	0,765	0,601	0,786	0,629	261,263,269,271, 273,275,281
MAF0065	6	21	0,857	0,782	0,724	0,541	0,724	0,608	129,131,133,137, 139,143
INRA005	5	21	0,571	0,473	0,432	0,268	0,436	0,401	132,136,142,146, 152
D5S2	5	21	0,524	0,633	0,544	0,344	0,504	0,504	184,188,190,194, 196
OarFCB020	3	21	0,429	0,547	0,434	0,24	0,362	0,438	92,94,112
SPS0113	4	21	0,476	0,675	0,590	0,378	0,536	0,533	236,242,248,250
<b>Valores Medios</b>	<b>4,82</b>	<b>100%</b>		<b>0,670</b>	<b>0,599</b>	<b>0,997</b>	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	

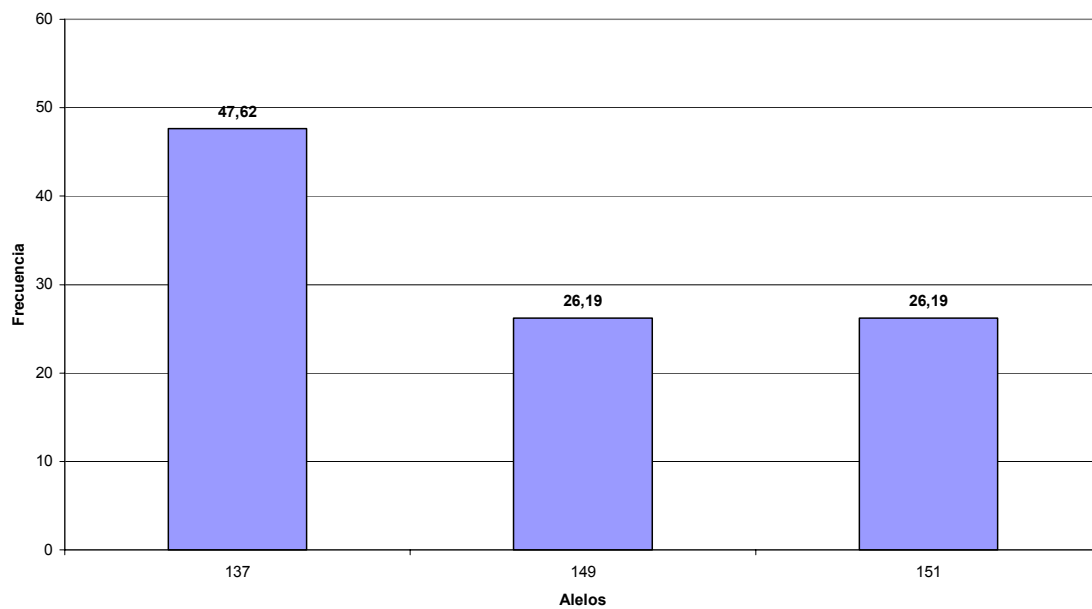
\* k: número de alelos. N: número de individuos genotipados. Ho: heterocigosidad observada. He: heterocigosidad esperada asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg. PIC: contenido de información polimórfica. PE<sub>2</sub>: probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado cuando se conoce el genotipo del otro parental. PE<sub>pp</sub>: probabilidad de excluir un par de parentales no emparentados. PE<sub>si</sub>: probabilidad de diferenciar entre hermanos completos.

Los alelos descritos para cada marcador, así como el valor de sus frecuencias alélicas, se encuentran resumidos en los siguientes histogramas:

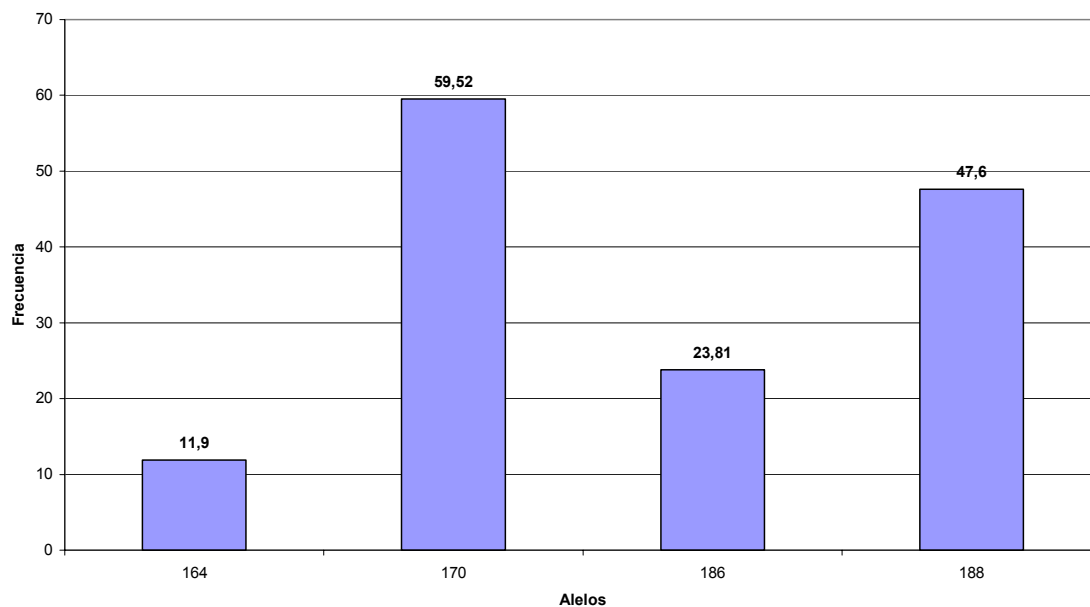
Frecuencias alélicas OarCP0049



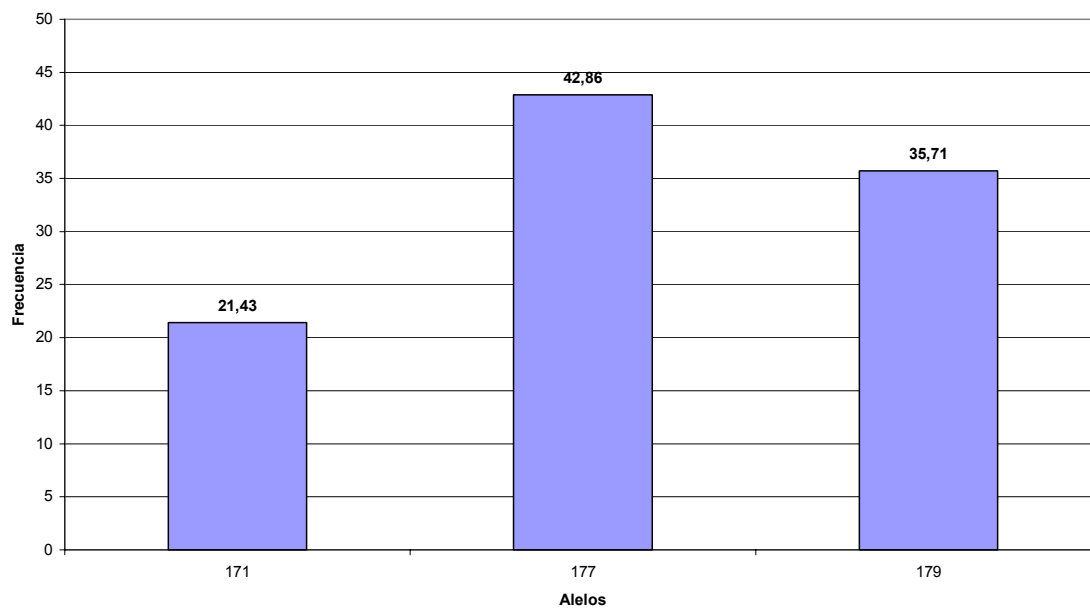
Frecuencias alélicas OarAE0129



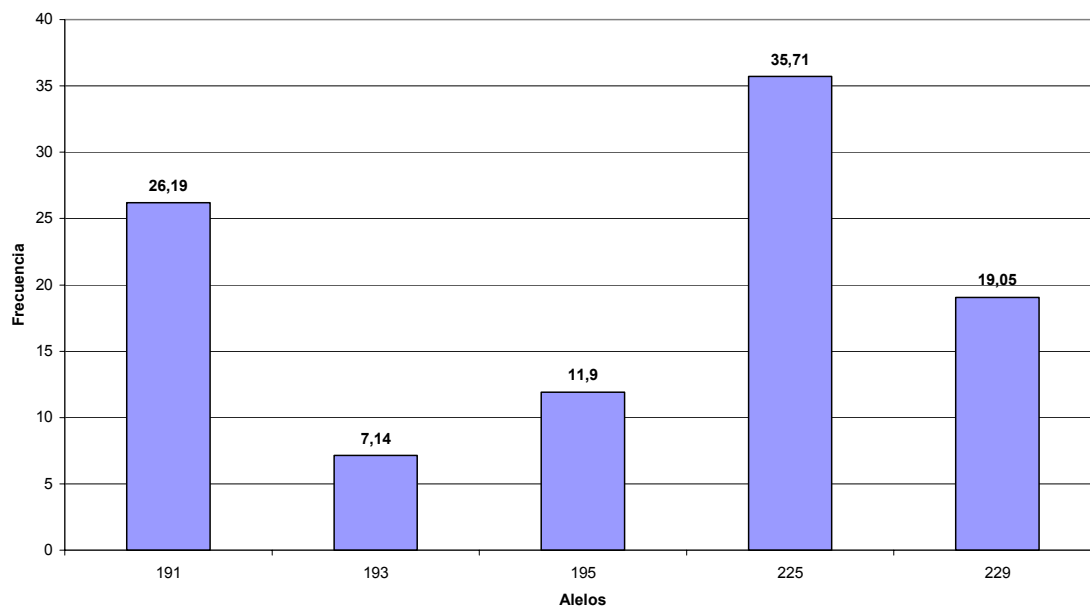
Frecuencias alélicas OarFCB304



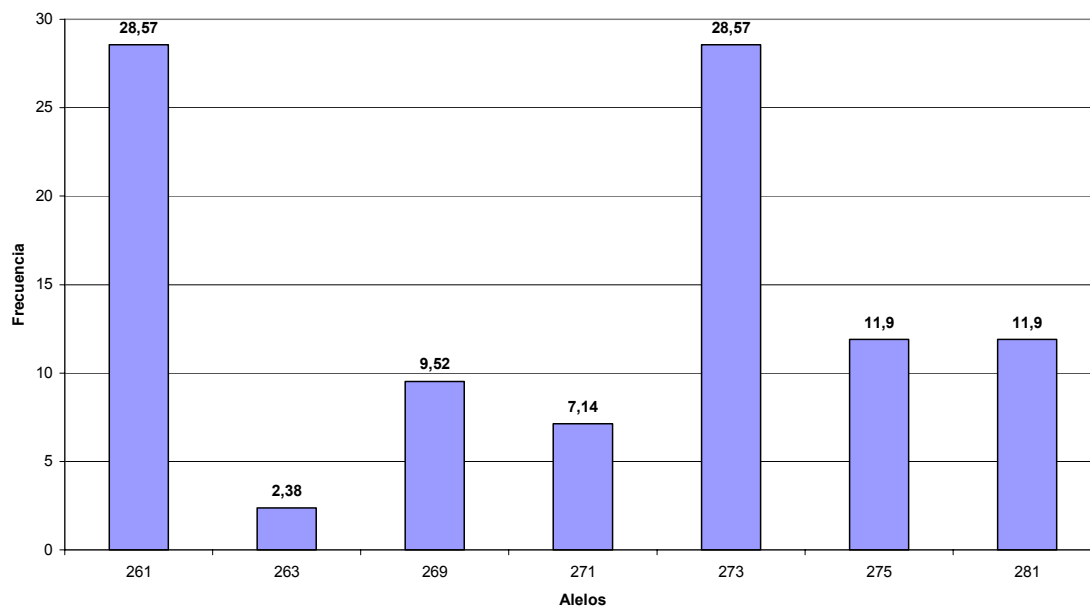
Frecuencias alélicas INRA0063



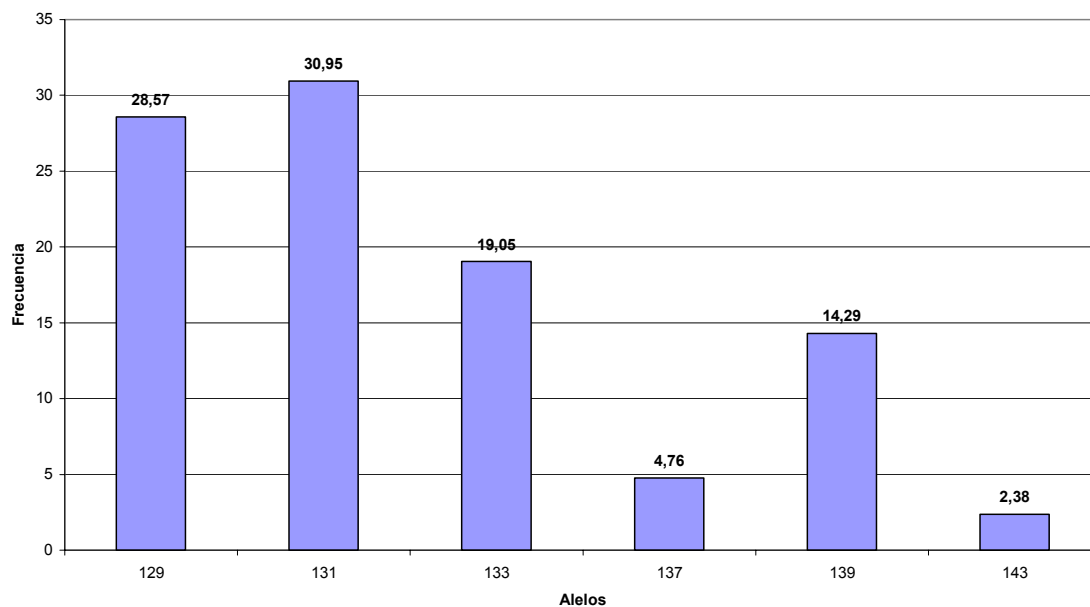
Frecuencias alélicas MAF0214



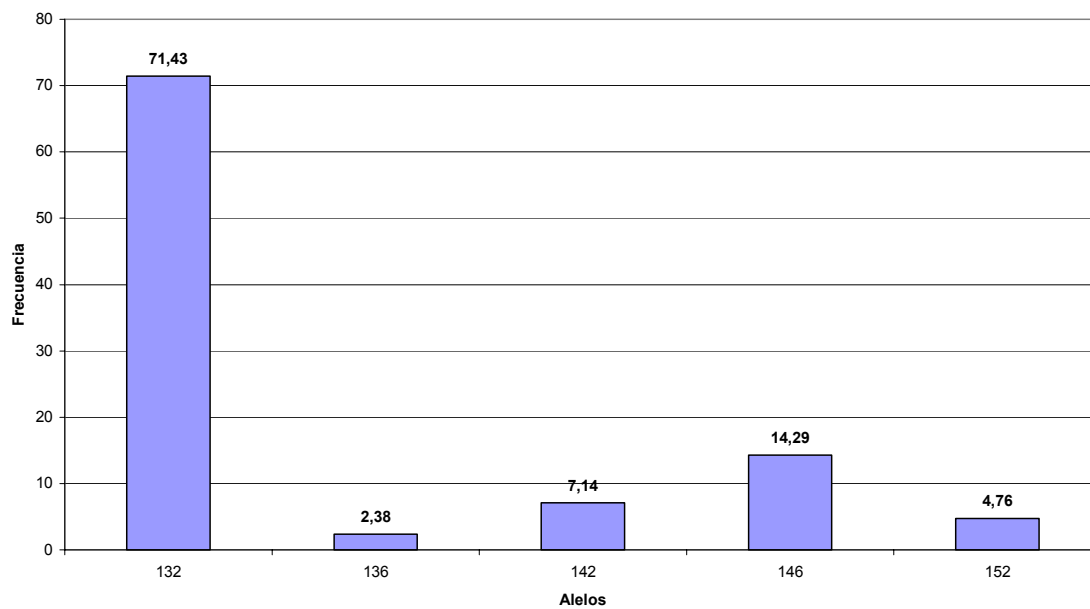
Frecuencias alélicas HSC



Frecuencias alélicas MAF0065

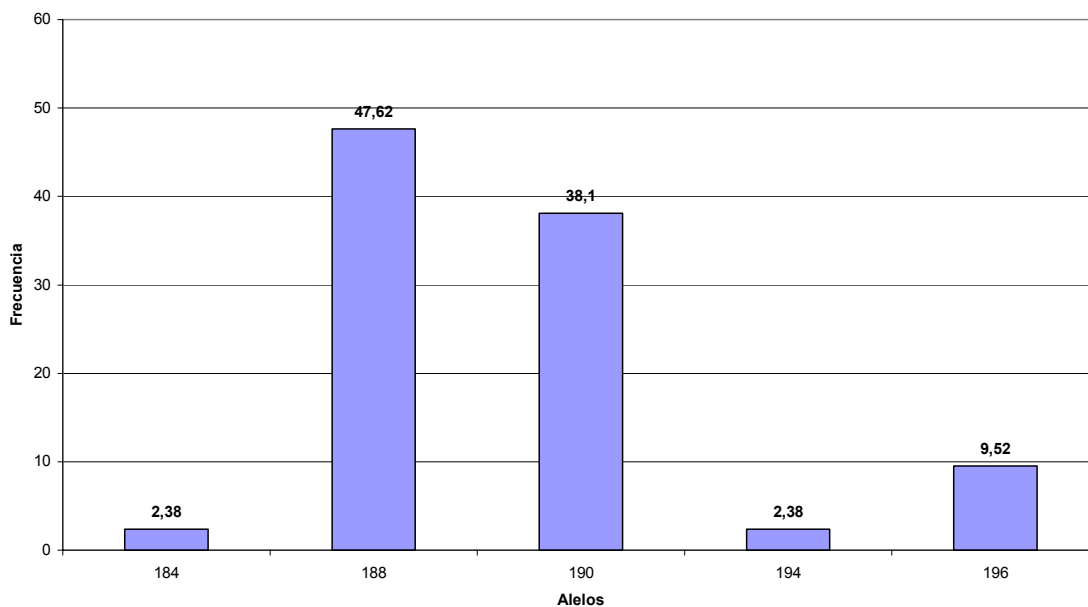


Frecuencias alélicas INRA005

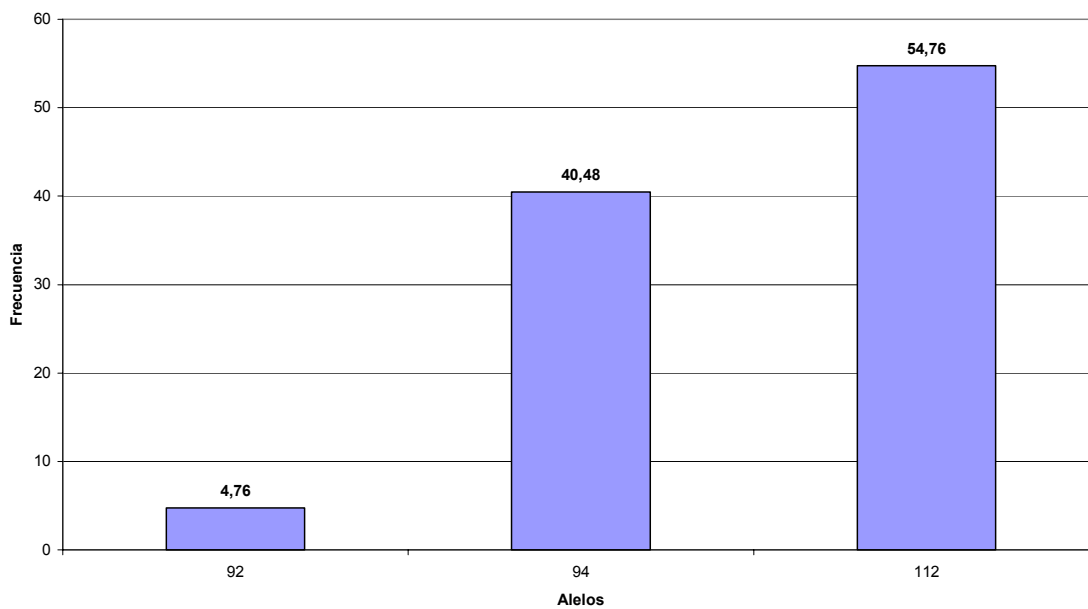




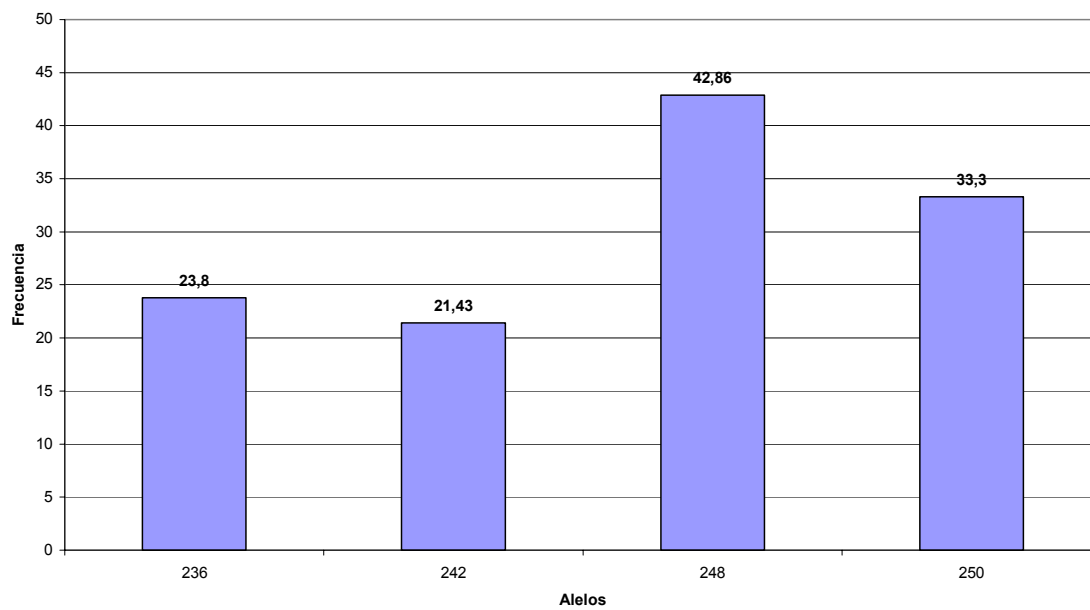
Frecuencias alélicas D5S2



Frecuencias alélicas OarFCB0020



Frecuencias alélicas SPS0113



En la tabla V podemos ver los resultados obtenidos en los test de equilibrio H-W para cada locus por separado, donde se observa que el marcador SPS113 no cumple el equilibrio H-W mostrando un déficit de heterocigotos. En el test de equilibrio Hady-Weinberg para el conjunto de todos los loci (Tabla VI) no se observa ni déficit ni exceso de heterocigotos, siendo el P-value = 0.248, por lo que se acepta la hipótesis nula.

**Tabla V.** Test de equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los loci.

Locus	Déficit de Heterocigotos (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Test Exacto (P-value)
OarCp0049	0,7941	0,2477	0,9754
OarAe0129	0,8543	0,1937	0,6683
OarFCB304	0,5865	0,5055	0,1092
INRA063	0,5537	0,5060	0,9394
MAF0214	0,9344	0,0801	0,4403
HSC	0,8254	0,3007	0,5992
MAF0065	0,8425	0,1882	0,2056
INRA005	1,0000	0,1034	1,0000
D5S2	0,2487	0,7977	0,2967
OarFCB020	0,1590	0,8972	0,3226
<b>SPS0113</b>	<b>0,0371</b>	0,9646	<b>0,0063</b>

**Tabla VI.** Test de Equilibrio Hady-Weinberg para el conjunto de todos los loci.

	P-value	S.E
Déficit de heterocigotos	0,8574	0,0065
Exceso de Heterocigotos	0,1429	0,0074
Equilibrio H-W	<b>0,2487</b>	

En la tabla VII se muestran los resultados obtenidos en la prueba de maternidad, consiguiendo la asignación de una madre candidata para cada hijo.

Tabla VII. Prueba de maternidad.

ID Hijos (1)	Loci tipados (2)	PE <sub>2P</sub> (3)	ID Padre (4)	Madre Candidata (5)	Asignación CERVUS (6)	Par LOD score (7)	Par Delta score (8)	N.C (9)	Trio LOD score (10)	Trio Delta (11)
5	11	0,999	84	73	66	4,92	2,15	*	8,73	8,73
7	11	0,997	84	43	43	2,06	2,06	*	5,80	5,80
8	11	0,998	84	88	88	4,39	4,39	*	5,91	5,91
11	11	0,999	84	100	100	3,87	3,87	*	8,38	7,92
12	11	0,999	84	50	50	3,15	3,15	*	7,74	7,74
13	11	0,999	84	52	52	3,21	3,21	*	7,95	7,95
15	11	0,999	84	66	73	2,32	1,50	*	6,63	6,63
91	11	0,997	84	81	81	2,72	2,72	*	5,34	5,34

(1) **ID**: Identificación de los hijos testados. (2) **Loci tipados**: número de loci tipados en la descendencia. (3) **PE<sub>2</sub>**: Probabilidad de excluir como progenitor a un candidato no emparentado cuando el genotipo del otro parental es conocido. (4) **ID padre**: Identificación del progenitor (conocido). (5) **Madre Candidata**: Madre asignada según hojas de granja. (6) **Asignación CERVUS**: madre asignada por el CERVUS comparando los 11 loci. (7) **Par LOD score**: logaritmo natural del ratio de verosimilitudes de relaciones parento-filiales entre la madre asignada y la descendencia. (8) **Par Delta score**: Diferencia de LOD score entre las 2 madres mas probables y la descendencia. (9) **N.C**: Nivel de confianza de la asignación al 95% (\*). (10) **Trio LOD score**: Logaritmo natural del ratio de verosimilitudes de relaciones parento-filiales entre la madre aginada por el CERVUS y la descendencia dado un padre conocido. (11) **Trio Delta**: Diferencia de LOD score entre las 2 madres mas probables y la descendencia dado un padre conocido.

Gracias a la prueba de maternidad realizada, observamos que hay dos asignaciones erróneas. Con un N.C del 95%, los valores de *Delta score* son todos mayores al valor *Delta score* crítico establecido en la simulación (valor 0).

## **5. DISCUSIÓN**

Como se ha visto en el apartado de resultados, de los 15 microsatélites probados, 4 presentaban una baja amplificación y gran número de amplificaciones secundarias que impedían la correcta interpretación de los verdaderos alelos, por lo que se eliminaron del análisis. Por otro lado, otros 4 microsatélites se analizaron por separado, 2 de ellos (MAF0214 y OarFCB0129) por interferir con los demás marcadores en la Multiplex y los otros dos (OarFCB0020 y SPS0113) por no adaptarse a las condiciones iniciales de la PCR.

Las PCR Multiplex quedaron finalmente organizadas de la siguiente manera: la Multiplex 1 incluyó los marcadores OarCP0049, OarFCB304, INRA0063 y HSC, analizándose por separado el OarAE0129 y el MAF 0214; mientras que la Multiplex 2 incluyó a los marcadores MAF0065, INRA 005 y D5S2, quedando excluidos los marcadores OarFCB0020 y SPS0113 que se analizan conjuntamente (Multiplex 3) usando la Taq polimerasa más específica.

Con los 11 marcadores microsatélites utilizados, se han detectado un total de 53 alelos en los 21 animales analizados, todos ellos polimórficos (> 2 alelos, Crawford et al., 1995). En otros trabajos llevados a cabo en ovino, como el de Ferrando et al., (2007) en el que se estudian relaciones genéticas entre razas ovinas del pirineo oriental, se obtiene un número superior de alelos (155 alelos en 311 animales) empleando una batería de 12 microsatélites. No obstante, si tenemos en cuenta el número de animales utilizados en nuestro caso (21 animales, 13 de ellos parentales), es muy probable que en posteriores trabajos sobre esta misma raza, ampliando el número de individuos analizados, el número de alelos sea superior.

El número promedio de alelos encontrados por marcador es de 4,82. (Tabla IV), este valor se sitúa por debajo de la media obtenida por Arranz *et al.* (1998) en razas ovinas españolas, así, en el caso de la raza Churra, obtienen hasta 8,5 alelos por locus, tal y como se muestra en la tabla VIII. No obstante, el panel de marcadores utilizado en nuestro trabajo es distinto al empleado por estos autores.

**Tabla VIII.** Parámetros de variabilidad genética de algunas razas ovinas españolas.

Raza	Alelos / locus	Ho*	He*	Fuente
Churra	8.5	0.734	0.779	Arranz et al. 1998
Latxa	7.5	0.713	0.773	Arranz et al. 1998
Manchega	8.8	0.753	0.783	Arranz et al. 1998
Rasa-Aragonesa	8.1	0.723	0.769	Arranz et al. 1998
Merino	9.9	0.771	0.814	Arranz et al. 1998
Awassi	5.8	0.750	0.656	Arranz et al. 1998
Guirra	4,8		0.559	Propia 2007

\*Ho: Heterocigosidad observada. He: Heterocigosidad esperada.

Si comparamos los resultados de los marcadores utilizados en el presente estudio en la raza Guirra con los obtenidos en otras razas, podemos observar que el número de alelos presentes por marcador es muy variable, así, en el trabajo realizado por Martínez *et al.* (2005) sobre la oveja Palmera, en el que se utilizan 3 de los microsatélites usados en la raza Guirra (Tabla IX), podemos observar que mientras que en los microsatélites Oar FCB304 e INRA0063 el número de alelos encontrados en la oveja Palmera es bastante superior a los obtenidos en la raza Guirra, en el marcador MAF0065 sucede lo contrario, ya que el número de alelos presentes en nuestra población es de 6, frente a los 4 presentes en la oveja Palmera.

**Tabla IX.** Número de alelos observados y contenido de información polimórfica para diversos marcadores empleados en la oveja Palmera y en la oveja Guirra.

Oveja Palmera			Oveja Guirra		
Locus	Nº alelos	PIC	Locus	Nº alelos	PIC
OarFCB304	8	0.50	OarFCB304	4	0,519
INRA0063	10	0.65	INRA0063	3	0,567
MAF0065	4	0.45	MAF0065	6	0,724

PIC: Contenido de información polimórfica. Fuente: Martínez et al., (2005)

Por otra parte, en el trabajo de Arora *et al.* (2004) sobre la oveja Muzzafarnagri, que emplean también el marcador OarAE129, encuentran 4 alelos para este locus y una heterocigosidad esperada de 0,710. Estos valores son muy similares a los

obtenidos en el presente trabajo en la raza Guirra, ya que encontramos 3 alelos para este locus y una heterocigosidad esperada de 0,652.

El valor del contenido de información polimórfica (PIC), nos indica qué marcadores son más informativos en esta raza (valores superiores a 0,5), cuales son medianamente informativos (valores entre 0,25 y 0,5), y cuales son poco informativos (valores inferiores a 0,25). Los valores obtenidos son bastante elevados en todos los marcadores analizados, especialmente para HSC, OarCp0049 y MAF0065. Este valor aumenta básicamente con el número de alelos descritos, y estos tres marcadores son los que presentan valores superiores. También las frecuencias alélicas influyen en el valor de PIC, de forma que el polimorfismo es menor cuando menos homogeneidad existe entre las frecuencias. Es el caso de INRA005 que se su PIC se ve disminuido porque uno de sus alelos acumula mas del 70% de las frecuencias.

Un índice de polimorfismo elevado es lo que nos va a garantizar el uso de los microsatélites como marcadores en las pruebas de parentesco y en la identificación individual, ya que la probabilidad de encontrar dos individuos con los mismos alelos para los 11 microsatélites es ínfima. Debido a esto, para realizar pruebas de parentesco no se debería incluir en el panel de marcadores ni el OarFCB0020 ni el INRA005 ya que no son muy informativos.

En otros estudios realizados en especies cercanas, como por ejemplo los realizados en caprino por Singh Gour *et al.*, (2006), por Martínez *et al.*, (2005) y por Luikart *et al.*, (1999) sobre la cabra Jamunapari, Canaria y Murciano-Granadina respectivamente, se obtuvieron valores superiores en casi todos los parámetros analizados para algunos de los microsatélites empleados en la raza Guirra.

La tabla X muestra el número de alelos observado, la heterocigosidad esperada, la observada y el contenido de información polimórfica de las distintas razas caprinas. En ella vemos que el marcador mas polimórfico utilizado en caprino es el MAF065, que también es uno de los más polimórficos en la raza Guirra, con 6 alelos observados y un PIC de 0,724.



**Tabla X.** Parámetros de variabilidad genética para varios marcadores empleados en caprino.

Locus	N ° alelos	He	Ho	PIC	Estudio
INRA 005	7	0.625	0.836	0.556	Martínez <i>et al.</i> , (2006)
INRA063	8	0.447	0.304	0.402	Martínez <i>et al.</i> , (2006)
	5	0,636		0,562	Luikart <i>et al.</i> , (1999)
OarFCB304	17	0.776	0.662	0.749	Martínez <i>et al.</i> , (2006)
	10	0,760	0,773	0,725	Singh Gour <i>et al.</i> , (2006)
MAF065	11	0,833		0,804	Luikart <i>et al.</i> , (1999)
OarFCB20	4	0,513		0,470	Luikart <i>et al.</i> , (1999)

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada, PIC: Contenido de información polimórfica.

El valor de heterocigosidad esperada obtenida es de 0,670. Este valor es similar al obtenido en otros estudios como el de Díez Tascón *et al.*, (2000) en el Merino (0,679), y en el estudio de Arora *et al.*, (2004) sobre la oveja Muzzafarnagri, (0,6973). Hay otros estudios en el que el valor obtenido (0,6039) es inferior al nuestro como ocurre en el realizado por Martínez *et al.*, (2005) sobre la oveja Palmera y otros como el de Calvo *et al.*, (2005) sobre la oveja Manchega en el que el valor de He es superior (0,716-0,787). El valor de He para la oveja Guirra indica una diversidad genética aceptable a pesar de tratarse de una raza en proceso de recuperación.

Respecto al test Hardy -Weinberg (H-W), solo uno de los microsatélites desvía el equilibrio H-W por un déficit de heterocigotos. Al realizar el test global para el conjunto de los 11 microsatélites, no aparece como significativo ni un déficit ni un exceso de heterocigotos, por lo que no puede decirse que la población no se encuentre en equilibrio H-W.

La probabilidad de exclusión combinada ( $PE_2$ ) o probabilidad de excluir de la paternidad a un candidato no emparentado conociendo el genotipo del otro parental, dio un valor conjunto de 0,998 para todo el panel de microsatélites estudiado. La probabilidad de excluir a los dos parentales no emparentados ( $PE_{pp}$ ) dio un valor de 0,999. Con esto vemos que con un número de marcadores relativamente pequeño, especialmente si presentan elevado polimorfismo, se tiene suficiente poder de resolución para analizar relaciones de parentesco e identificaciones individuales.

Por otra parte, gracias a la prueba de maternidad realizada se ha podido comprobar la fiabilidad de las asignaciones de las madres, observándose que dos de las asignaciones iniciales eran erróneas. Generalmente en las explotaciones de ovino, en un 20% de los casos se producen falsas asignaciones maternas, por eso es muy importante realizar controles de filiación, para evitar apareamientos entre individuos emparentados controlando así los niveles de consanguinidad.

La identificación de un animal concreto es de gran importancia tanto en programas de selección y conservación, como en trazabilidad alimentaria. La identificación y registro de animales permite realizar un mejor control de la cabaña ganadera y por lo tanto garantizar una mejor trazabilidad de los animales. Los sistemas de trazabilidad basados en la identificación convencional de animales no son infalibles, por ello actualmente se están desarrollando sistemas de respaldo basados en técnicas moleculares. En bovino por ejemplo ya se están empleando marcadores microsatélites que determinan los perfiles específicos de ADN (huellas genéticas) de cada animal (Chávez *et al.*, 2004, Folch *et al.*, 2004, Vázquez *et al.*, 2004.)

En el presente estudio se han mostrado los resultados preliminares de la caracterización genética con una batería de 11 marcadores microsatélites de la raza ovina Guirra, como paso previo a una mejor gestión de dicha raza. No obstante, es necesario hacer más estudios con un mayor número de animales con el fin de ampliar la información obtenida y establecer un panel de marcadores microsatélites más preciso. Por esta razón, se ha iniciado un nuevo estudio en el que además de los marcadores utilizados en este trabajo, se analizarán 25 microsatélites adicionales, para llevar a cabo una caracterización más completa de la población de la raza ovina Guirra de la Comunidad Valenciana.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se observa que con el panel de marcadores microsatélites usado se consigue una probabilidad de exclusión superior al 99,9 % en las pruebas de parentesco, por lo que podemos concluir que el sistema propuesto es de gran utilidad para los controles de filiación y genealogías, necesarios para la correcta gestión de la raza ovina Guirra.

---

## 6. **BIBLIOGRAFÍA**

Arora R., Bhatia S. (2004). Genetic structure of Muzzafarnagri sheep based on microsatellite analysis. *Small Ruminant Research* **54**: 227-230.

Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F.(1998). Genetic relationship among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genetics* **29**: 435-440.

Arruga M.V., Monteagudo L.V., Tejedor M.T., Barrao R., Ponz R. (2001). Análisis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. *Research in Veterinary Science* **70**: 271-273.

Bello N. (2001). Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

Bragança P., Arranz J.J., San Primitivo F. (1999). Diseño de un sistema "Multiplex" para el control de parentesco en rumiantes domésticos. *ITEA*, Vol. Extra **20**: N° 1:306-308.

Chávez R., Felmer R., Catrileo A., Sagrado B., Iraira S., Folch C. (2004). Evaluación de microsatélites bovinos para la implementación de un sistema de trazabilidad molecular de la carne bovina. En: *XXIX Reunión Anual de SOCHIPA*, Villarrica, Chile. Libro de resúmenes Pp 151-152.

Cheng H.H. and Crittenden L. B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* **73**: 539-546.

Delgado R., Torrento N., Trilla N., Collell E., Ballester J., Tibau J. (2005) Aplicación de microsatélites en la identificación genética de reproductores y en el estudio de parentesco en poblaciones porcinas de selección de las razas Pietrain y Duroc. [www.aida-itea.org](http://www.aida-itea.org)

Di Stasio L.(2002). Panels of markers for parentage verification tested at the 2001/02 ISAG Comparison test. [www.isag.org.uk/ISAG/all/02\\_PVpanels\\_LPCGH.doc](http://www.isag.org.uk/ISAG/all/02_PVpanels_LPCGH.doc) (enero 2007).

Díaz García J.L. (2002). Análisis de microsatélites en el cromosoma nueve en pacientes con cáncer de vejiga. Implicaciones pronósticas. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. Departamento de Cirugía, Oftalmología y Otorrinolaringología.

Díez-Tascón C., Littlejohn R.P., Almeida P.A.R., Crawford A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics*, **31**: 243-251.

Ferrando A., Parés P.M., Marmi J., Avellanet R., Jordana J. (2007). Estudio de la diversidad y relaciones genéticas entre cinco razas ovinas del Pirineo Oriental. ITEA 2007, [www.aida-itea.org](http://www.aida-itea.org).

Iamartino D., Bruzzone A., Lanza A., Blasi M., Pilla F. (2005). Genetic diversity of Southern Italian goat populations assessed by microsatellite markers. *Small Ruminant Research* **57**: 249-225.

Jiménez-Gamero I., Dorado G., Muñoz-Serrano A., Analla M., Alonso-Moraga A. (2006). DNA microsatellites to ascertain pedigree-recorded information in a selecting nucleus of Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* **65**: 266-273

Jiménez N., Folch J., Fernández-Arias A., Guiral J., Sánchez A.(1999). Estudio genético mediante marcadores microsatélites de las poblaciones de cabra montés. *ITEA*, Vol. Extra 20: 300-302.

Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C.(2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099-1106.

Lozano J.M., Bouzada J.A., Pérez E.M., Oliver F., Tormo B., Canals A., Montoro V.(2002) Aplicación del análisis mediante microsatélites de ADN al control de filiación del esquema de selección de la raza caprina Murciano-Granadina. *XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*.

---

Luikart G., Biju-Duval M-P., Ertugrul,O., Zagdsuren Y., Maudet C., Taberlet P.(1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*).*Animal Genetics* **30**: 431-438.

Marco Jiménez F. (2007). Aplicación de tecnologías reproductivas para la conservación de la raza ovina Guirra. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ciencia Animal.

Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M.(1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7(5)**:639-655.

Martínez A.M., Acosta J., Vega Pla J.L., Delgado J.V. (2006). Análisis of the genetic structure of the canary goat populations using microsatellites. *Livestock Science* **102**: 140-145.

Martínez A.M., Vega-Pla J.L., Bravo M.J., Barba C., Caraballo J.,Delgado J.V. (2005). Caracterización genética de la oveja Palmera con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* **54**: 363-367.

Miller S. A., Dykes D.D. Polesky H.F.(1988). A simple slting out procedure for extracting DNA from human cell. *Nucleic Acids Research* **16**: 1215.

Mullis KB, Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymologic* **155**: 335-350.

Muñoz-Valle J.F., Santos A., Vázquez- del Mercado M., Carrillo C., Bastidas B.E., Ruiz B., Pandero A. (2000). Genotipos del receptor B<sub>3</sub>- adrenérgico en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, **48**: 7-16.

Pepin L.,Amigues Y.,Lepingle A., Berthier J.L., Bensaid A., Vaiman D. (1995).*Heredity*, **74**: 53-61.

Peris B.,Corpa J.M., García A.,Rodríguez M., Ibor I., López S, Lainez M.(2002). Situación sociocultural de los rebaños de raza Guirra en la Comunidad Valenciana.

*XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*,897-901.

Peris B., Corpa J.M., Rodríguez M., Ibor I., Lainez M.(2002). Medidas de apoyo específicas para la conservación y fomento de la raza Guirra en la Comunidad Valenciana: Análisis retrospectivo. *XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*.

Sánchez Belda A., Sánchez Trujillano M., Razas ovinas Españolas: Raza Roja Levantina. <http://www.anguirra.com/html/marcos/marco.html> (octubre 2007).

Schelenk J., Swidl S., Braunchweiger G., Betz P. (2003). Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing. *International Journal of Legal Medicine* **118**: 55-61.

Singh Gour D., Geetu Malik, Ahlawat S.P.S., Pandey A.K., Rekha Sharma, Neelam Gupta, Gupta S.C., Bisen P.S., Dinesh Kumar.(2006). Análisis of genetic structure of Jamunapari goat by microsatellite markers. *Small Ruminant Reseach* **66**: 140-149.

Vanhala T., Tuiskula-Haavisto M., Elo K., Vilkki J., Mäki-Tanila A. (1998). Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*, **77**: 783-790.

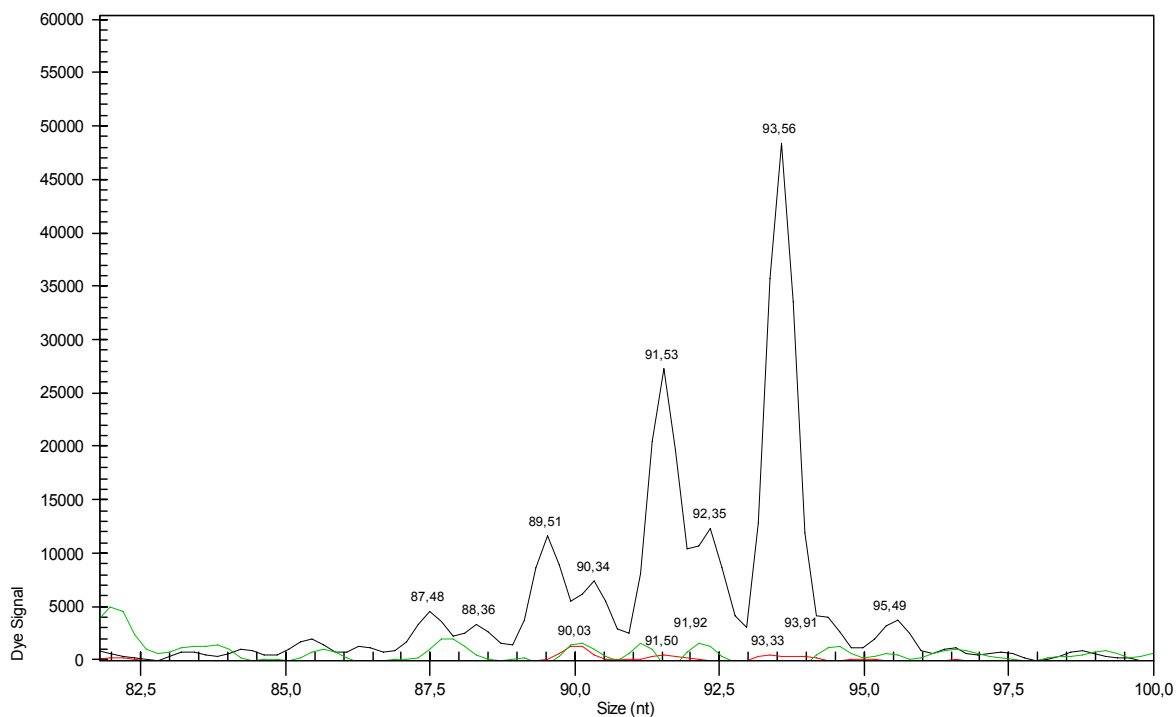
Vázquez J, T Pérez, F Urena, E Gudin, J Albornoz, A Domínguez. 2004. Practical application of DNA fingerprinting to trace beef. *Journal of Food Protection* **67**: 972-979.

## 7. ANEXOS

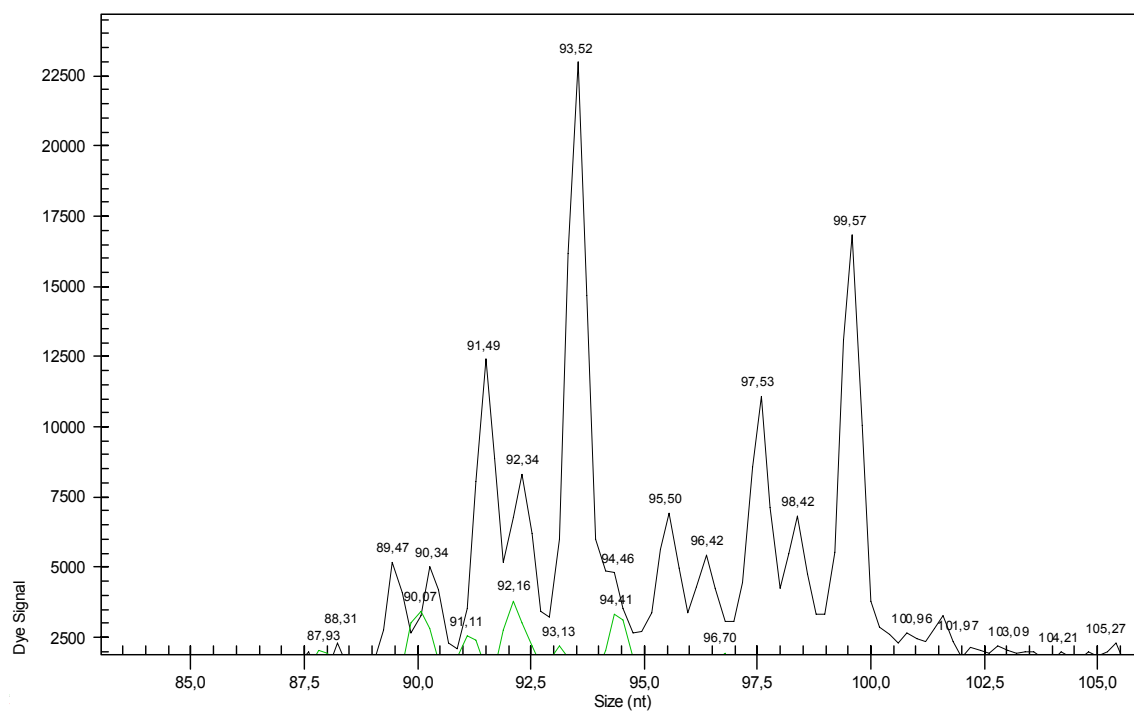
### 7.1. Perfiles de los microsatélites amplificados

1. **OarCP0049:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 82, 84, 86, 90, 94, 96, 100 y 104 para la raza ovina Guirra.

91.M1sinfinal.C06\_07110611G9

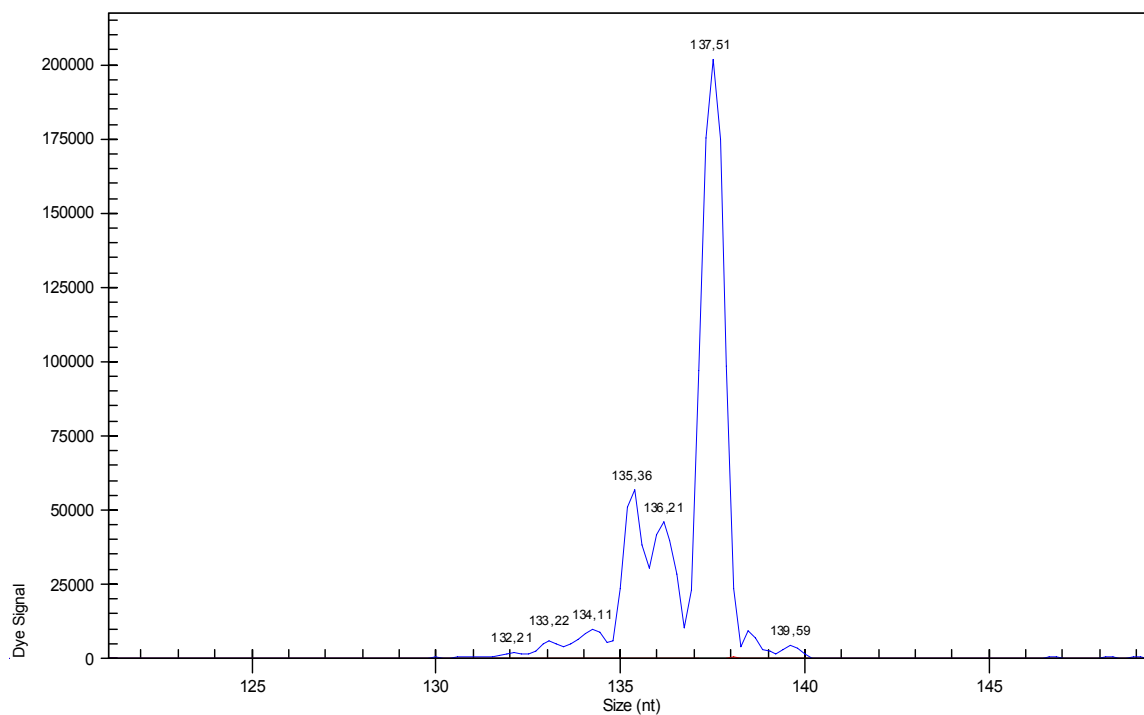


11.M1sin.D01\_0710301006

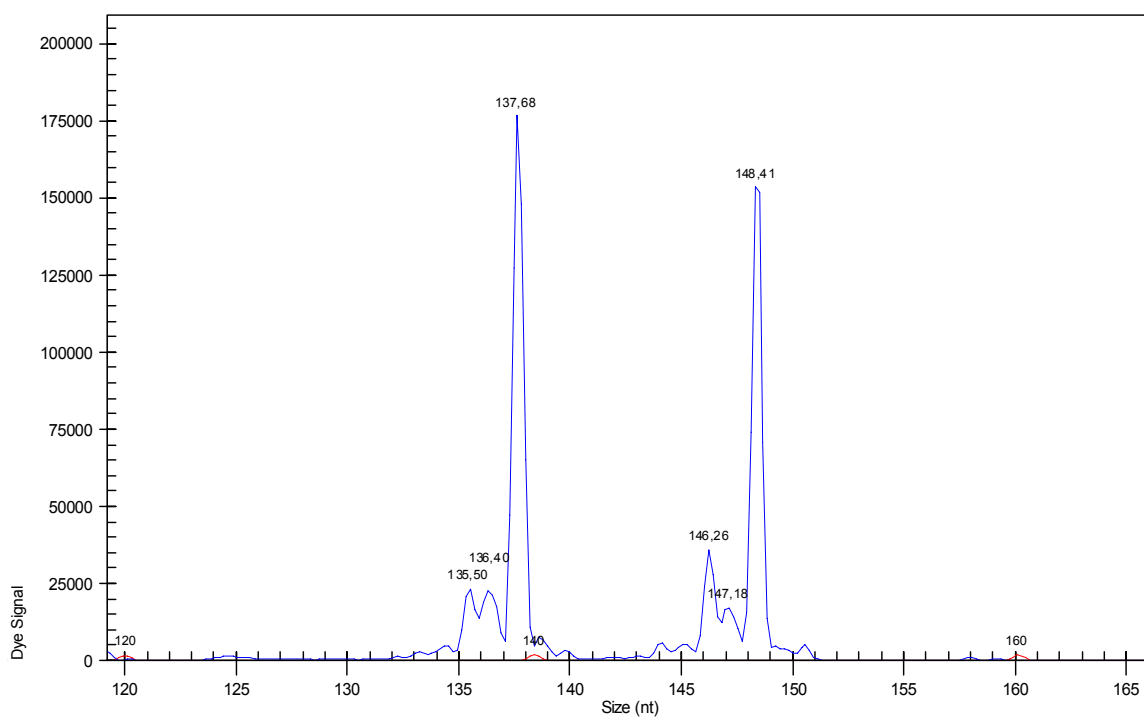


2. **OarAE0129:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 137, 149,151 para la raza Guirra.

48.Oar129.B08\_071106133O



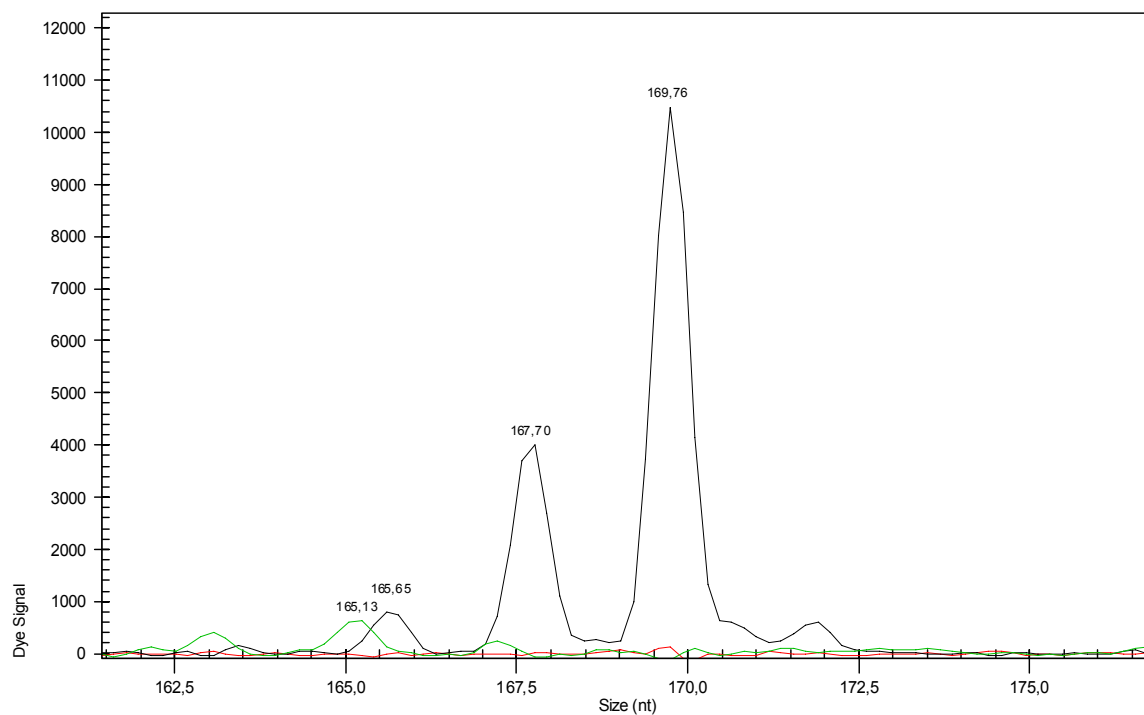
7OAR129.D03\_07110713BK



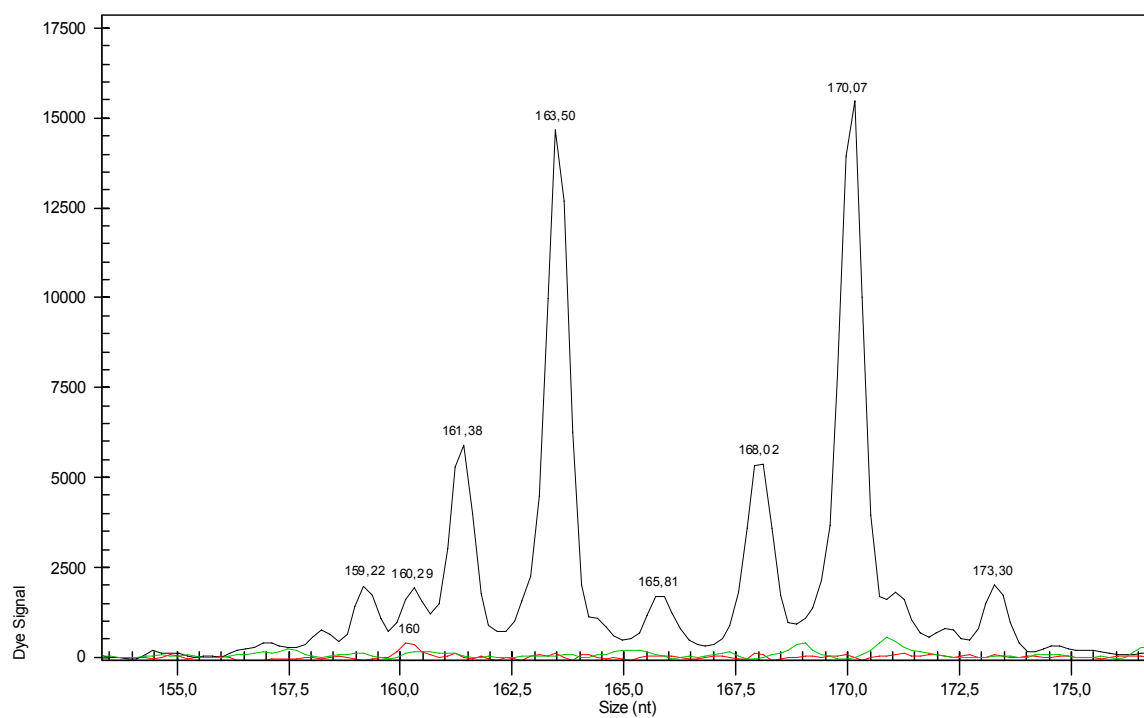


3. **OarFCB304**: Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 164, 170, 186 y 188 para la raza Guirra.

91ml.G03\_071019135M

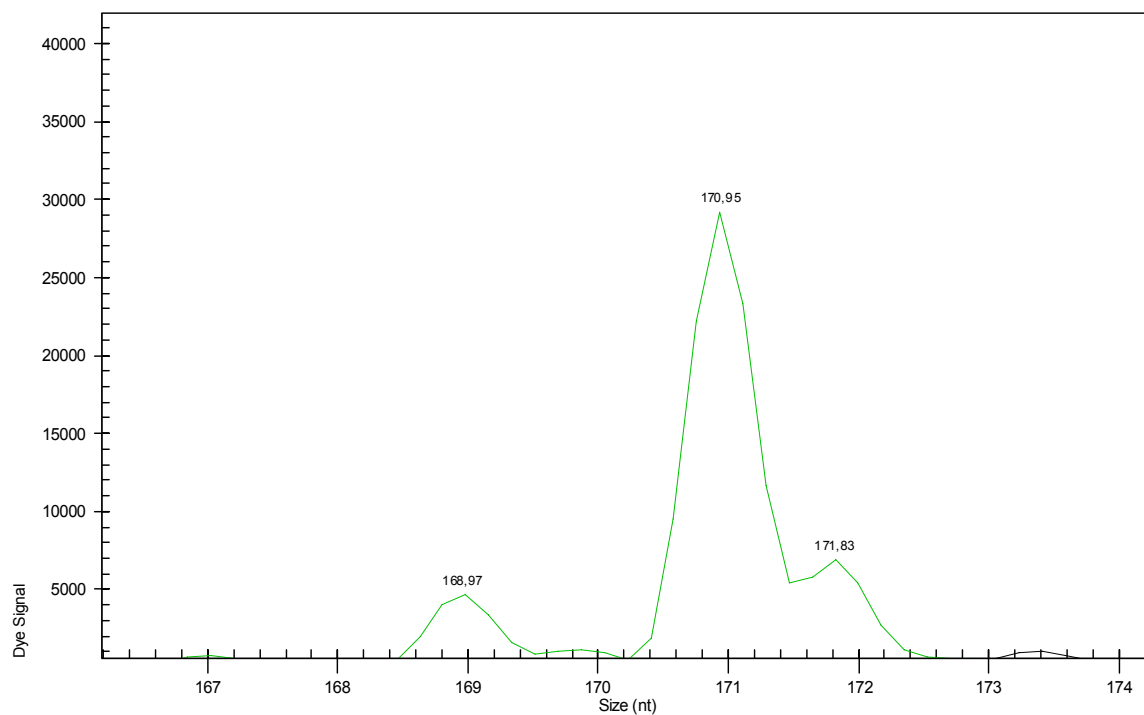


5ml.A02\_071015136W

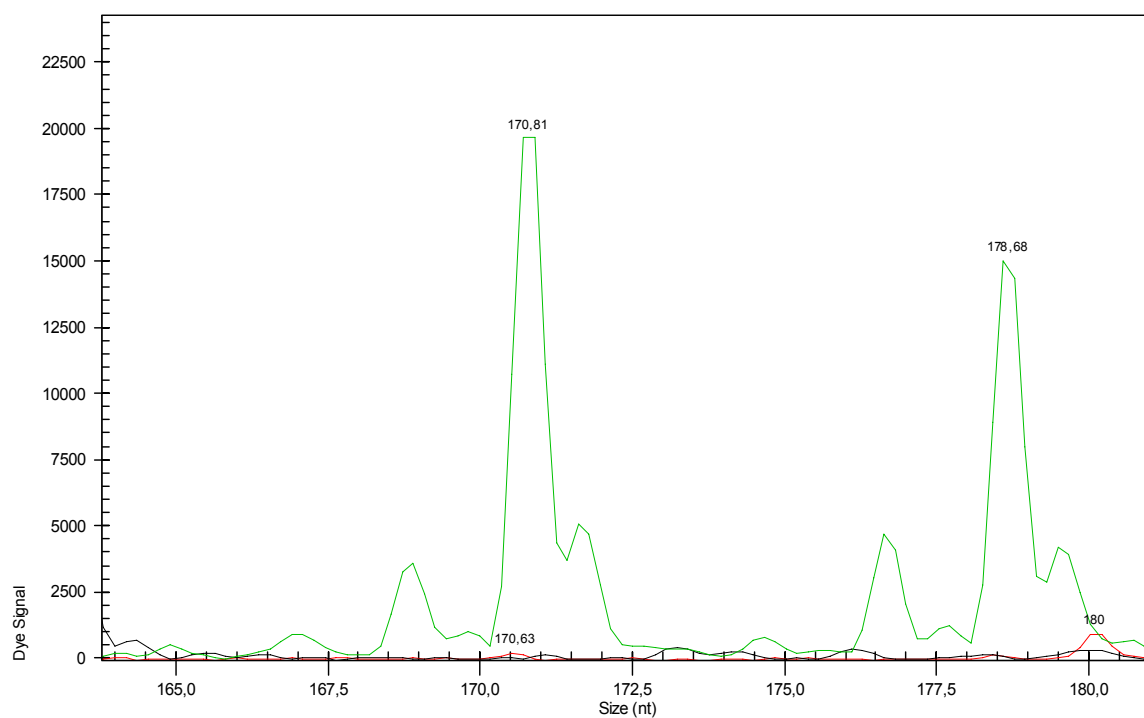


4. **INRA063:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 171,177 y 179 para la raza Guirra.

79.M1sinfinal.F06\_07110611G6

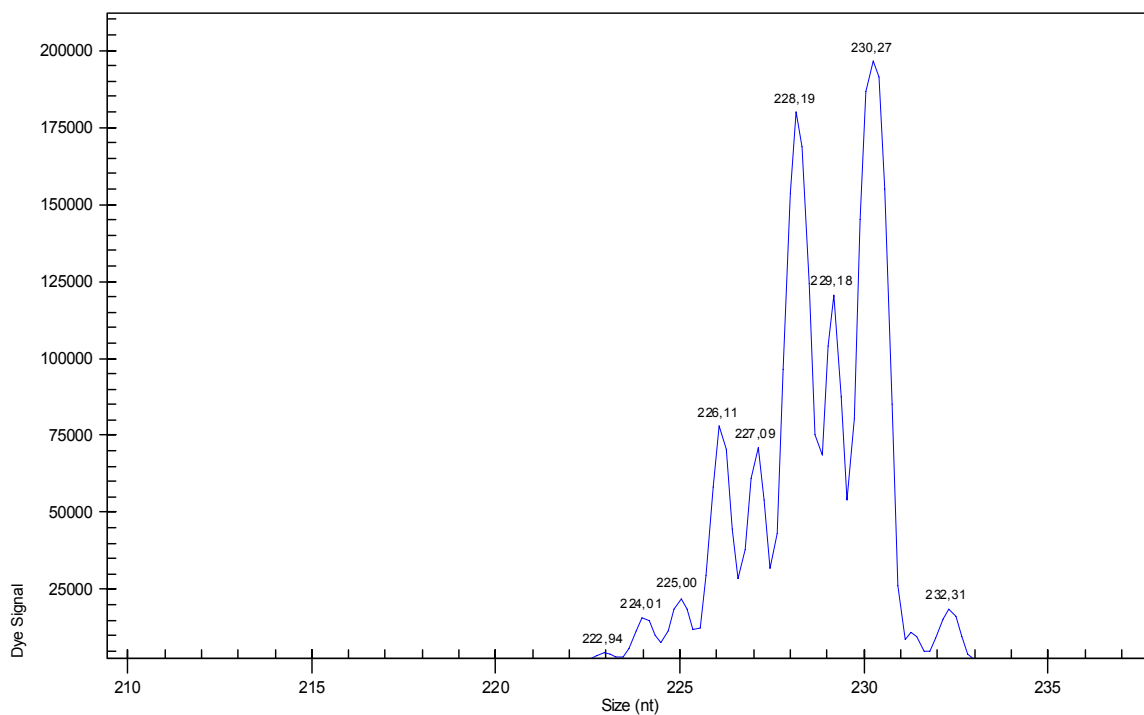


66M1FINAL2.C07\_07111213C8

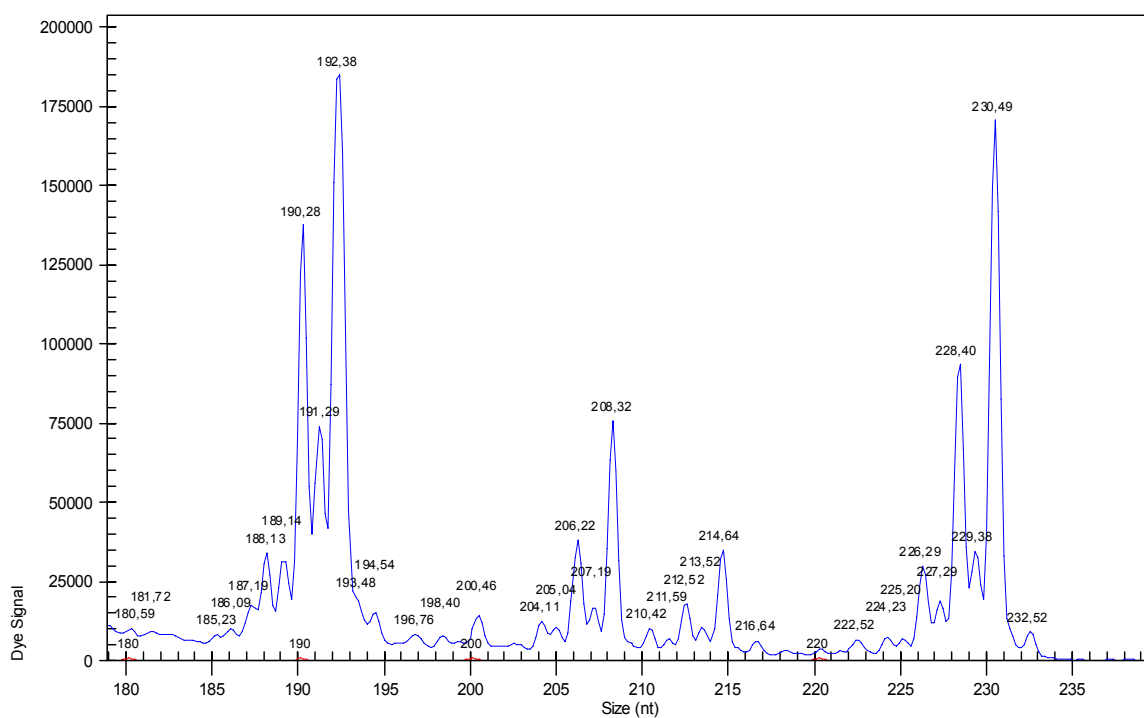


5. **MAF0214:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 191,193, 195, 225 y 229 para la raza Guirra.

77.M1b2.B04\_07102312XW

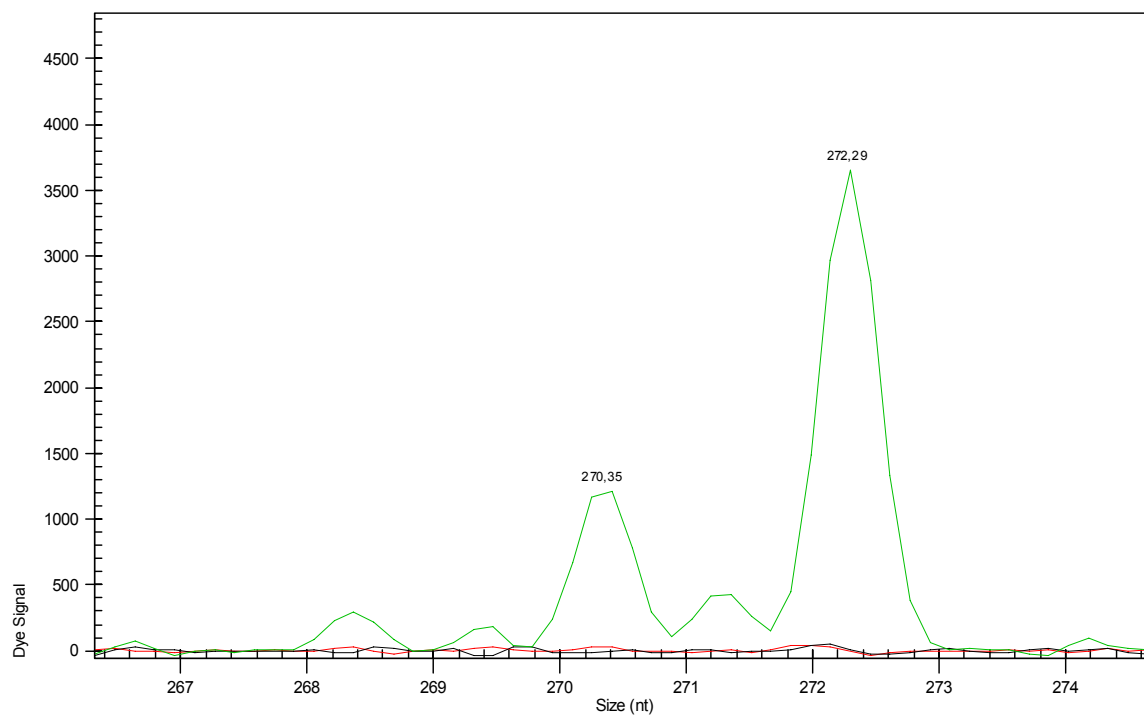


43.Maf214.C03\_071030120H

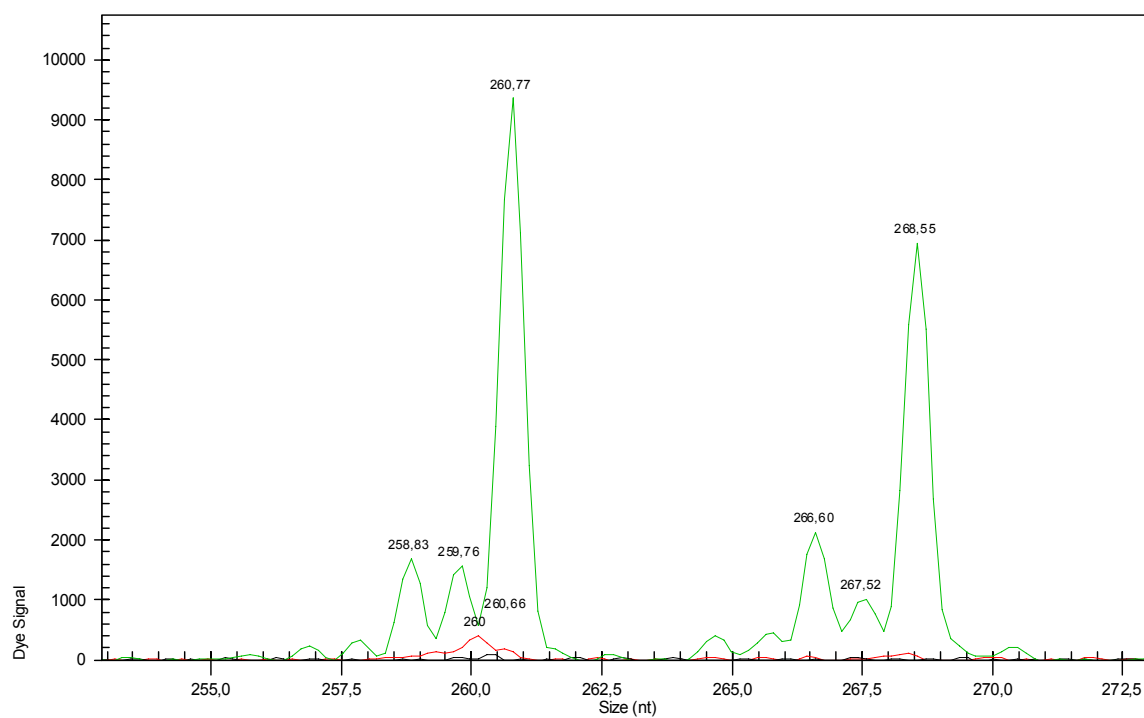


6. **HSC:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 261, 263, 269,271,273,275 y 281 para la raza Guirra.

84M1FINAL2.H06\_07111211GX

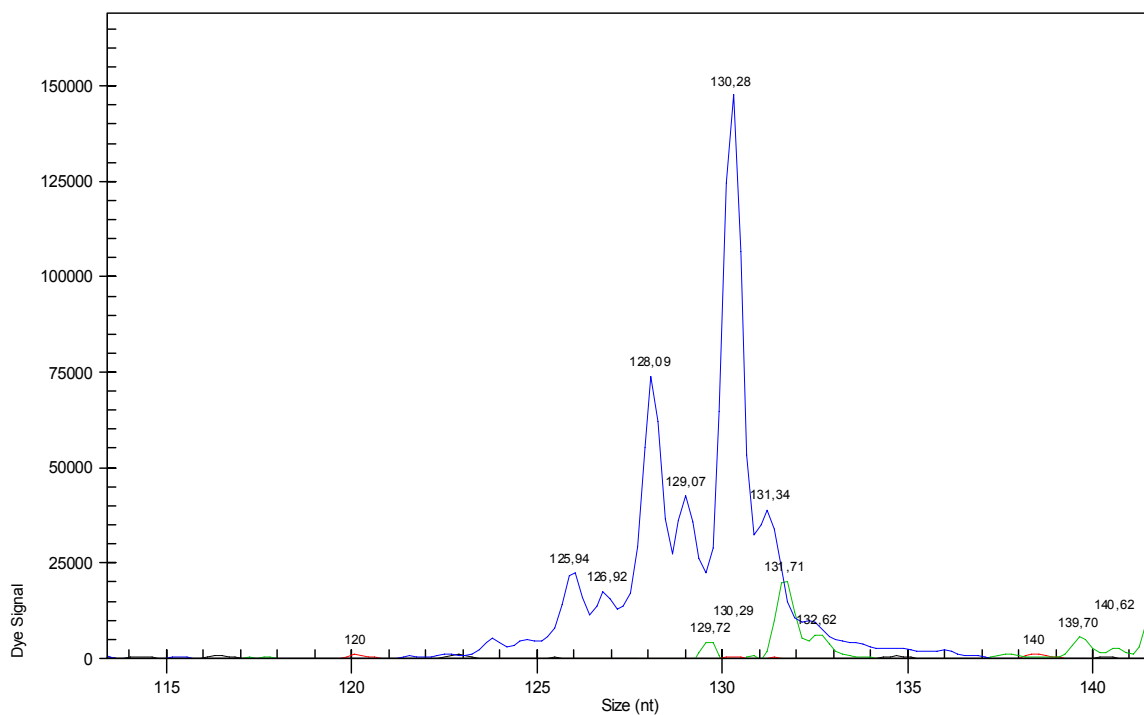


50.M1sin.B02\_071030115A

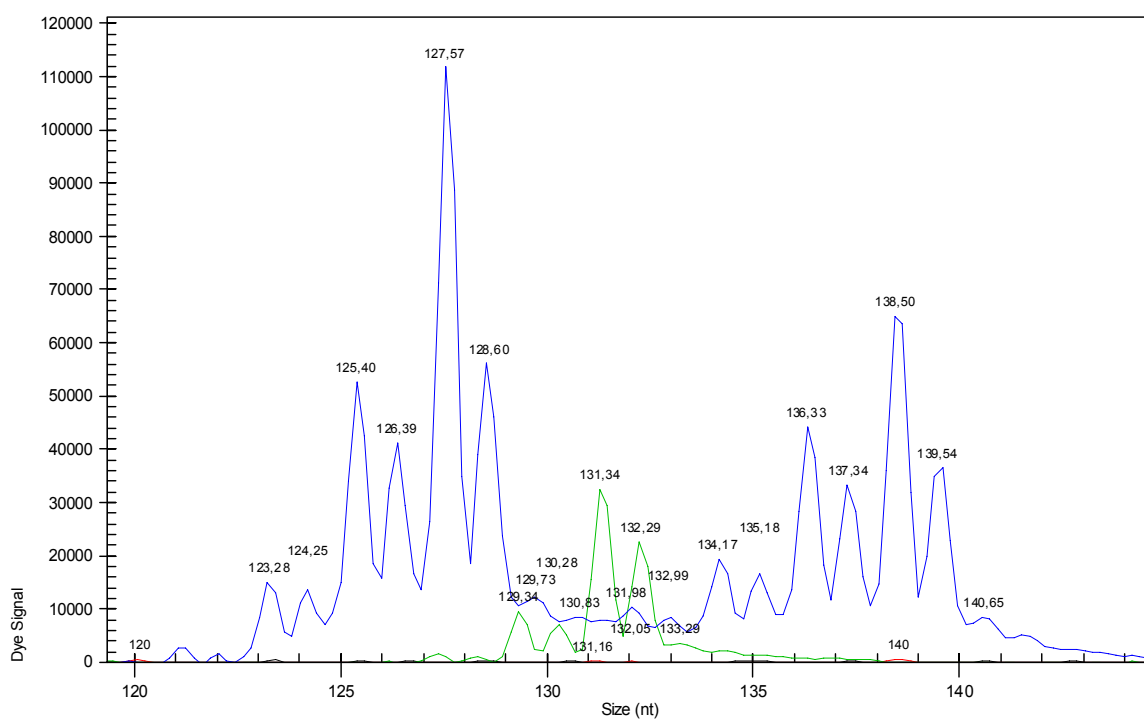


7. **MAF0065:** Pertenece a la multiplex 1 y presenta las variantes alélicas 129, 131, 133,137,139 y 143 para la raza Guirra.

5.M2TAQ.E01\_071115108S

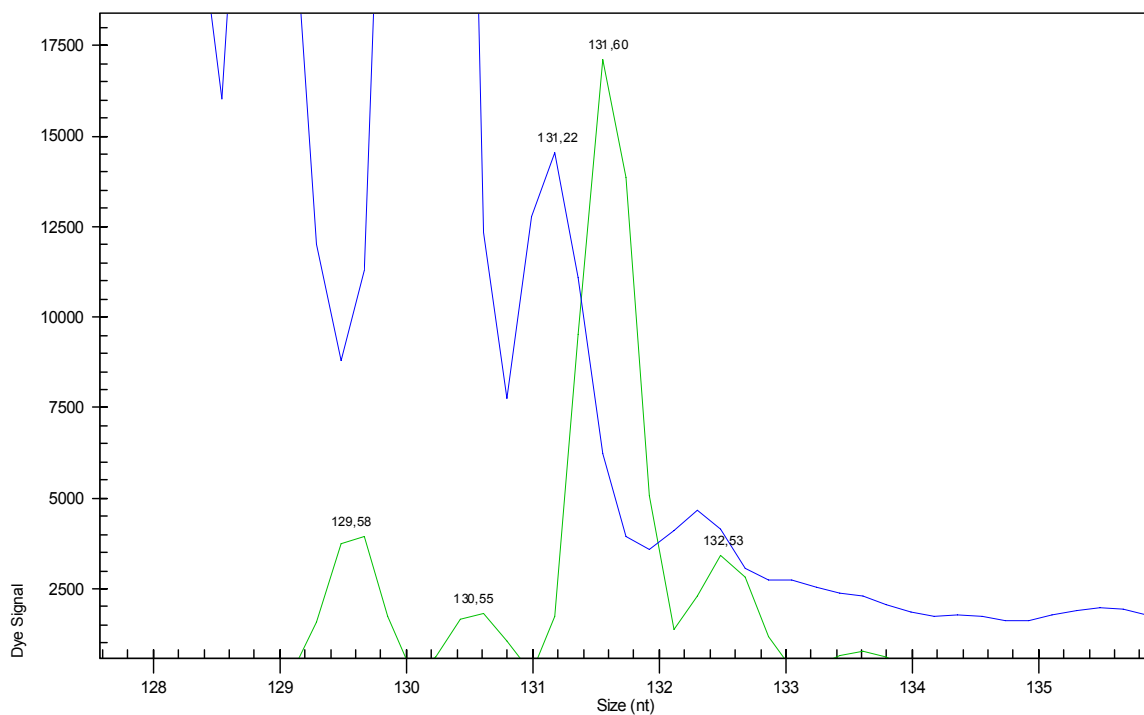


11m2sin.D01\_07102610B2

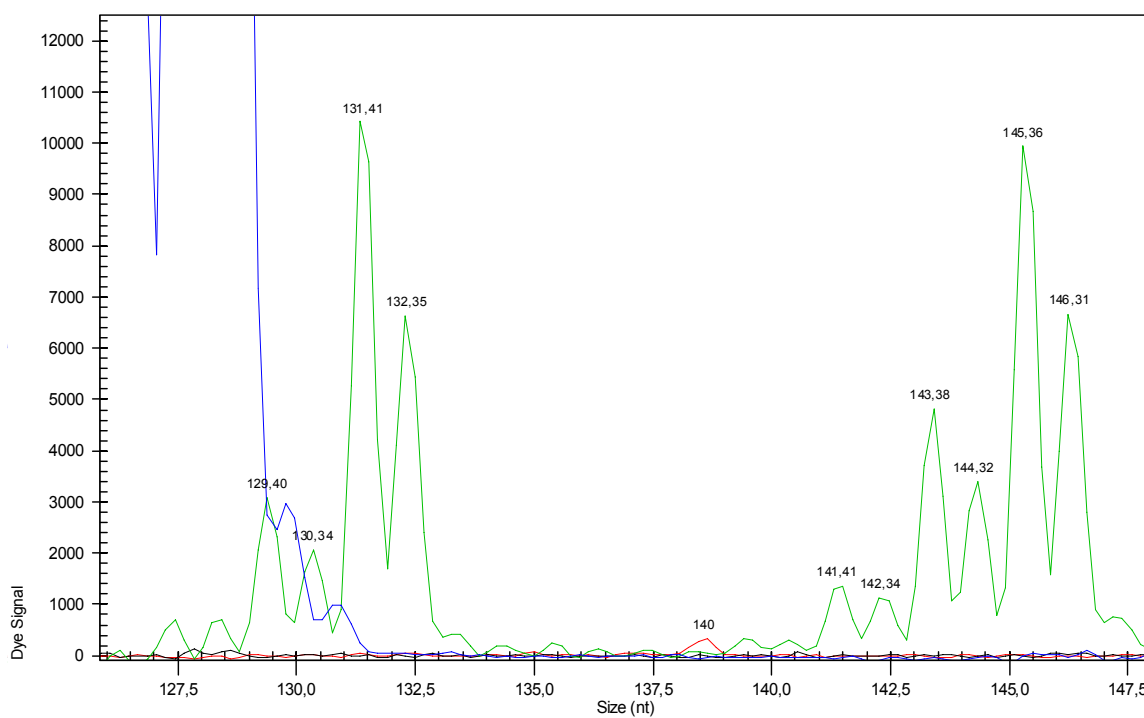


8. **INRA005:** Pertenece a la multiplex 2 y presenta las variantes alélicas 132, 136, 142, 146 y 152 para la raza Guirra.

15.M2TAQ.D01\_071115108T

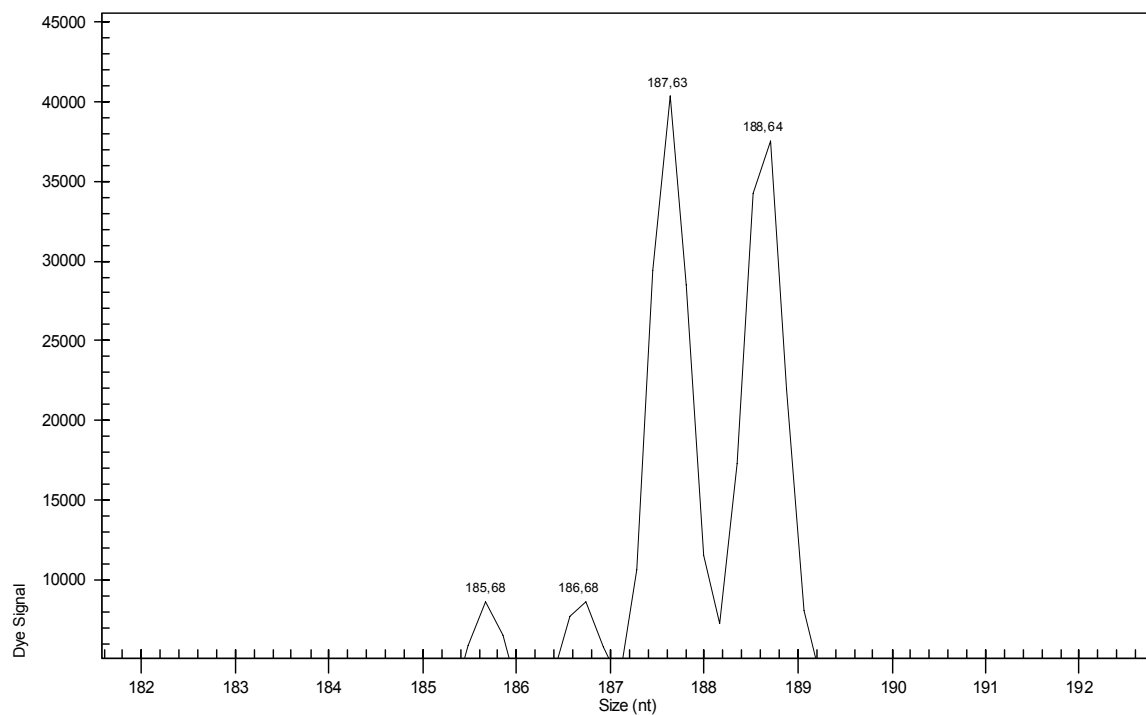


52.M2sindos.A09\_07110613UT

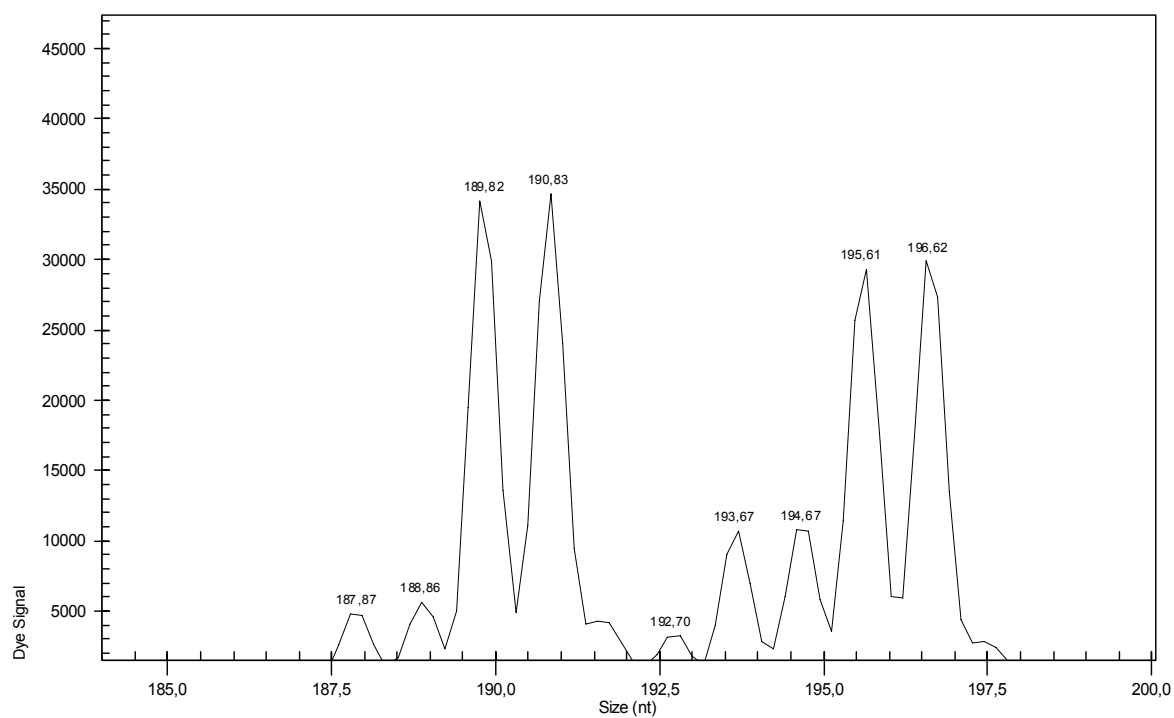


9. **D5S2:** Pertenece a la multiplex 2 y presenta las variantes alélicas 184, 188,190 y 194 para la raza Guirra.

7.M2sin.C04\_07103012QS

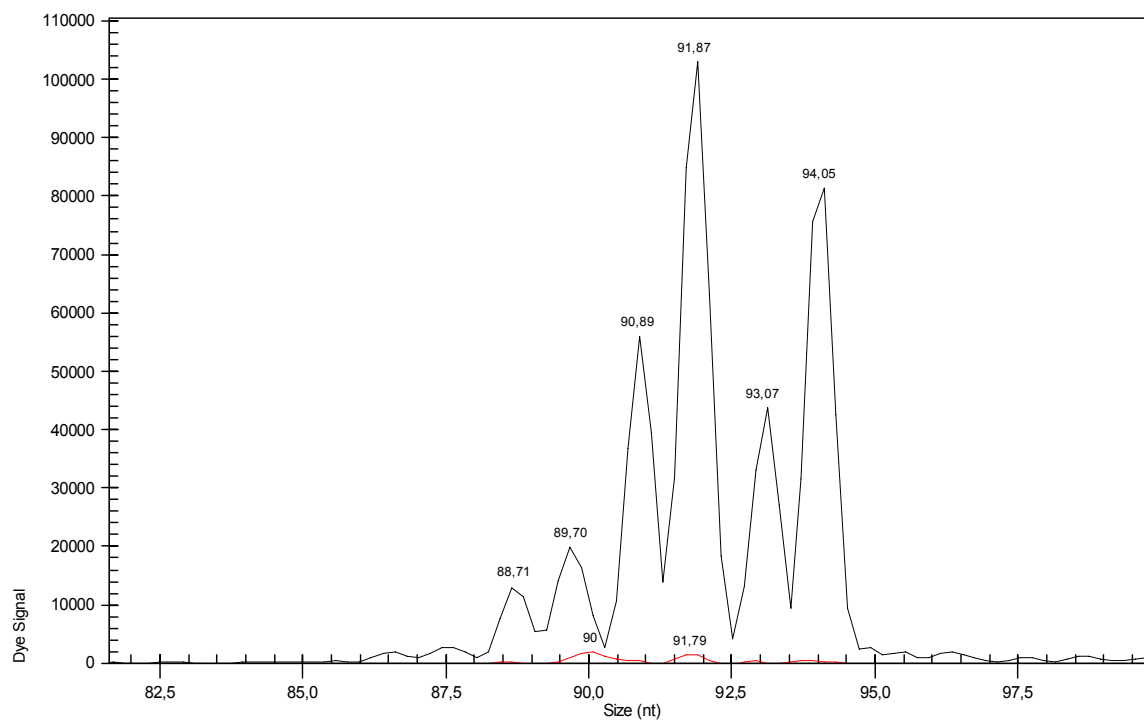


15.M2sin.F04\_07103012QQ

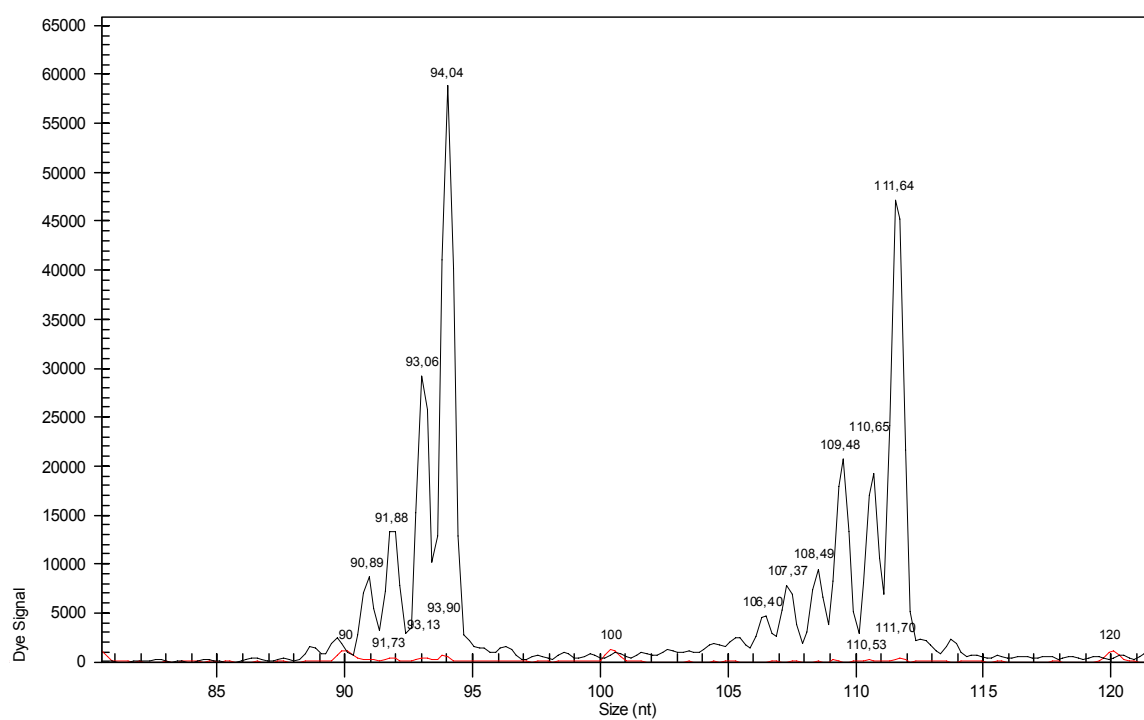


10. **OarFCB020**: Pertenece a la multiplex 2 y presenta las variantes alélicas 92,94 y 112 para la raza Guirra.

73.M2NEGROS.F05\_071115139S



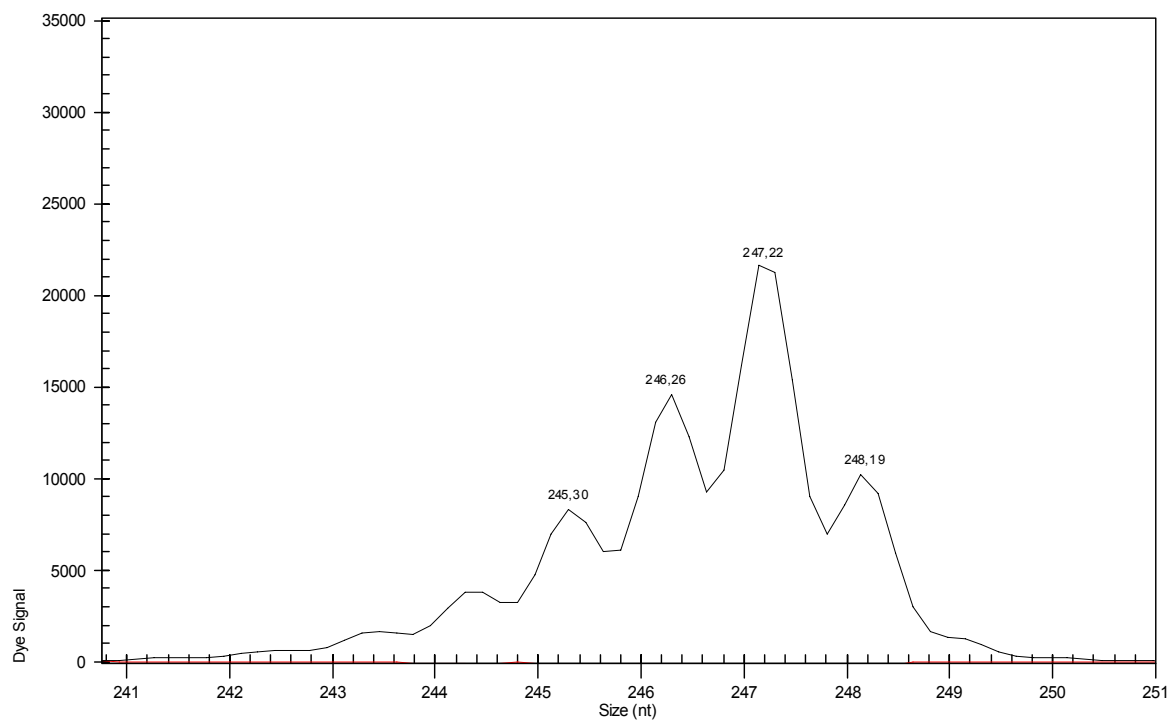
50.M2NEGROS.C05\_071115139U





11. **SPS0113**: Pertenece a la multiplex 2 y presenta las variantes alélicas 236, 242, 248 y 250 para la raza Guirra.

50.M2NEGROS.C05\_071115139U



66.M2NEGROS.E05\_071115139T

