

SELECCIÓN DE MACHOS CON MARCADORES MOLECULARES PARA LA CREACIÓN DE UN BANCO DE SEMEN DE LAS RAZAS OVINAS ARANESA Y XISQUETA Y DE LA CAPRINA BLANCA DE RASQUERA

Ferrando, A.¹, Casas, M.¹, Palomo, M. J.², Terré, M.³ y Jordana, J.¹

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V, 08193-Bellaterra (Barcelona). Jordi.Jordana@uab.es.

²Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V, 08193-Bellaterra (Barcelona). ³ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Torre Marimon, 08140, Caldes de Montbui.

INTRODUCCIÓN

Este estudio se engloba en un proyecto de colaboración más amplio para la creación de un banco de semen de razas autóctonas de ovino y caprino en peligro de extinción (oveja Aranesa, oveja Xisqueta y cabra Blanca de Rasquera). El objetivo de este estudio es la selección de diez machos jóvenes de cada una de las tres razas mediante marcadores moleculares, de los que se conservará material seminal mediante crío-conservación. Se han seguido dos criterios principales: 1) en las razas ovinas, favorecer la presencia de machos con genotipos de elevada resistencia a Scrapie y descartar los de elevada sensibilidad, y 2) crear un grupo con una baja coascendencia molecular y una elevada riqueza alélica para establecer una reserva genética representativa de la raza.

Para ello, se ha utilizado información sobre las coascendencias moleculares entre las diferentes subpoblaciones de las razas (Ferrando et al., 2010a, b) para dirigir el muestreo de los machos candidatos para el programa. Posteriormente, se ha comparado los perfiles genéticos de los machos candidatos para el programa con las bases de datos genéticas de las tres razas (Avellanet, 2006; Ferrando et al., 2007; Jordana et al., 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ganaderos que aceptaron entrar en el proyecto facilitaron una serie de muestras de machos nacidos en sus explotaciones de unas pocas semanas de vida que debían cumplir con el estándar de la raza y tener a sus padres inscritos los Libros Genealógicos de las razas. En total, se obtuvieron muestras de sangre de 50 machos de la raza Aranesa (5 explotaciones) y de 40 machos de la raza Xisqueta (12 explotaciones) y 36 muestras de pelo de la raza Blanca de Rasquera (5 explotaciones). El ADN de las muestras de sangre fue extraído siguiendo un protocolo estándar con fenol-cloroformo, y el de las muestras de pelo fue extraído con el kit comercial "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen, Valencia, CA, USA).

En las razas ovinas, se obtuvo el genotipo de los machos para los 13 marcadores microsatélite siguientes: MCM42, INRA49, MCM527, TGLA53, MAF65, HSC, OarCP20, OarCP34, OarCP49, OarAE119, OarFCB11, MCM218 y MAF214. En la raza caprina se utilizó un panel de 12 marcadores: MCM527, MAF65, SRCRSP05, SRCRSP06, SRCRSP08, SRCRSP23, HSC, OarCP34, OarFBC11, MCM218, MAF214 y OarAE119. Los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando un marcador interno del tamaño de los fragmentos. Además, en las razas ovinas, también se determinó el genotipo del grado de sensibilidad/resistencia a Scrapie (R1-R5). Los parámetros de diversidad genética así como los valores de coascendencia molecular media de los machos con el conjunto de la raza y entre machos fueron calculados con el programa Molkin V.3.0 (Gutiérrez et al., 2005).

Los criterios de selección de los machos fueron los siguientes: 1) sensibilidad/resistencia a Scrapie: en los ovinos se descartaron todos los individuos con los perfiles R4 y R5 y se favoreció la presencia de individuos con los perfiles R1 y R2, 2) coeficiente de coascendencia media de cada macho con el conjunto de la raza (f) y de auto-coascendencia (s), 3) coeficiente de coascendencia media entre machos del mismo rebaño (f_w): se evitó elegir dos machos con coeficientes elevados entre sí, especialmente si procedían de la misma explotación, 4) rebaño de procedencia: se favoreció la presencia de machos de un mayor número de explotaciones diferentes y 5) coeficiente de coascendencia media entre machos de distintos rebaños. Algunos individuos inicialmente seleccionados causaron baja

por diferentes motivos y fueron reemplazados por otros siguiendo la lista de priorización. Una vez definidos todos los machos seleccionados para el programa de conservación, se calcularon los parámetros de diversidad genética de estos grupos. Las bases de datos de referencia incluyeron 227 cabras Blanca de Rasquera (6 municipios), 615 ovejas Xisqueta (4 comarcas) y 232 ovejas Aranesas (6 zonas estivales de pasto).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los diez machos de la raza ovina Aranesa que fueron finalmente seleccionados para el proyecto procedían de cinco explotaciones diferentes. Cuatro individuos presentaban el genotipo R1 de resistencia a Scrapie, uno era R2 y los cinco últimos fueron R3. Por lo tanto, la mitad de ellos presentaban un genotipo resistente o muy resistente a Scrapie. La coascendencia media de la raza fue de $f = 0.257$ y la auto-coascendencia media de $s_i = 0.642$. Estos valores sirvieron de referencia para elegir a los diez machos para el proyecto. Los diez machos presentaron un valor medio de coascendencia bajo con toda la raza $f = 0.232$ y entre ellos $f_w = 0.263$, con una auto-coascendencia media de $s_i = 0.623$. El valor de coascendencia dentro de grupo aumenta debido al peso de la auto-coascendencia, especialmente cuando el número de individuos es reducido, por ello el valor dentro del grupo de machos es más elevado que el valor con el conjunto de la raza. La diversidad genética de este grupo fue elevada ($H_E = 0.74$), con un media de 7.1 alelos por locus.

Se seleccionaron diez machos de la raza ovina Xisqueta procedentes de ocho explotaciones distintas. Dos de ellos causaron baja a última hora y no pudieron ser reemplazados por lo que el grupo final se compuso de ocho animales de siete explotaciones. Entre ellos, uno presentó un genotipo R2 de resistencia a Scrapie y el resto fueron todos R3. El coeficiente medio de coascendencia de la raza fue de 0.234, y de auto-coascendencia fue de 0.638. La diversidad genética del grupo de machos seleccionados también fue elevada ($H_E = 0.77$), con una media de 6.4 alelos por locus. El valor medio de coascendencia molecular del grupo con toda la raza fue de $f = 0.199$, y dentro del grupo fue de $f_w = 0.233$, con una auto-coascendencia media de $s_i = 0.611$.

El coeficiente de coascendencia molecular medio de la raza caprina Blanca de Rasquera fue de 0.271, con un valor medio de auto-coascendencia de 0.652. La diversidad genética del grupo de diez machos seleccionados fue de $H_E = 0.74$, con una media de 5.8 alelos por locus. El coeficiente medio de coascendencia del grupo con toda la raza fue de $f = 0.248$, y dentro del grupo fue de $f_w = 0.261$, con una auto-coascendencia media de $s_i = 0.580$.

Los grupos de machos seleccionados presentaron un bajo coeficiente de coascendencia media con el conjunto de su raza y dentro de su grupo. Dado el número limitado de machos seleccionados para cada raza, el número medio de alelos por locus de estos grupos fue menor al total de la raza, y a menudo también al de las diferentes poblaciones analizadas por separado. No obstante, la riqueza alélica de estos grupos para un mismo número de individuos fue superior al de las diferentes subpoblaciones (ver Tabla 1). Por lo tanto, estos grupos de machos retienen, comparativamente, una diversidad genética y alélica relativamente elevada. Estos individuos fueron posteriormente trasladados a las instalaciones del IRTA para su entrenamiento como sementales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avellanet, R. 2006. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Ferrando, A., Avellanet, R., Casas, M. & Jordana, J. 2010a. XI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, João Pessoa (Brasil). *Memorias*, pp. 125-128.
- Ferrando, A., Marmi, J., Parés, P.M., Carné, S., Vidilla, M., Avellanet, R. & Jordana, J. 2010b. VII Congreso Ibérico sobre los Recursos Genéticos Animales, Gijón (España). Libro de Comunicaciones, p. 82.
- Ferrando, A., Parés, P. M., Marmi, J. & Jordana, J. 2007. *Memorias: VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos*, Quevedo (Ecuador). *Memorias*, pp. 329-334.
- Gutiérrez, J. P., Royo, L. J., Álvarez, I. & Goyache, F. 2005. *J. Hered.* 96: 718-721.
- Jordana, J., Marmi, J., Carné, S. & Ferrando, A. 2007. VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, Quevedo (Ecuador). *Memorias*.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con un proyecto INIA (Ref. RZ2009-00008, Ministerio de Ciencia e Innovación) y por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya*. También agradecemos a los ganaderos y a las asociaciones de las razas ACORA, ACOXI y *Associació de Ramaders de Cabra Blanca de Rasquera*.

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética de cada subpoblación de las tres razas.

Raza (subpoblación)	N	H_O	H_E	F_{IS}	f_w	NMA	R.A.
<i>Aranesa (zonas de pasto)</i>							
Saplan-Coma Palas	74	0.73	0.76	0.029	0.244	9.5	6.2 ¹
Montludè-Portet	30	0.69	0.72	0.033	0.284	8.3	6.1 ¹
Corilha-Salient	36	0.66	0.70	0.052	0.305	7.8	5.4 ¹
Boca Nord del Túnel	30	0.71	0.73	0.018	0.273	7.3	5.6 ¹
Pla de Beret	43	0.73	0.72	-0.007	0.275	8.2	5.9 ¹
Porcingles	19	0.72	0.72	0.013	0.288	6.9	5.8 ¹
Machos seleccionados	10	0.78	0.74	-0.043	0.257	7.1	7.1 ¹
<i>Xisqueta (comarcas)</i>							
Alta Ribagorça	123	0.71	0.76	0.063	0.239	11.7	5.9 ²
Pallars Jussà	270	0.72	0.76	0.059	0.239	12	5.9 ²
Pallars Sobirà	189	0.73	0.76	0.045	0.236	11.2	5.8 ²
Ribagorça	33	0.76	0.74	-0.022	0.260	7.9	5.5 ²
Machos seleccionados	8	0.78	0.77	-0.015	0.233	6.4	6.4 ²
<i>Blanca de Rasquera (municipios)</i>							
Rasquera	47	0.69	0.72	0.045	0.281	7.5	5.3 ¹
Tivenys	30	0.74	0.72	-0.018	0.276	6.1	5.1 ¹
Tivissa	50	0.71	0.73	0.025	0.269	6.5	5.0 ¹
Vandellòs	40	0.70	0.72	0.027	0.284	6.9	5.2 ¹
Horta de St. Joan	39	0.68	0.71	0.036	0.291	6.8	5.1 ¹
Bot – Prat de Comte	21	0.65	0.62	-0.043	0.377	5.3	4.5 ¹
Machos seleccionados	10	0.84	0.74	-0.137	0.261	5.8	5.7 ¹

N, número de individuos; heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E); F_{IS} , déficit/exceso de heterocigotos; f_w , coeficiente medio de coascendencia dentro de subpoblación; NMA, número medio de alelos por locus; R.A., riqueza alélica para (¹) diez o (²) ocho individuos.

SELECTION OF MALES BY USING MOLECULAR MARKERS FOR THE CREATION OF A SPERM BANK OF ENDANGERED ARANESA AND XISQUETA SHEEP BREEDS AND RASQUERA WHITE GOAT BREED

ABSTRACT: This study has been realized in the framework of a collaborative project for the creation of a sperm bank of three endangered breeds: Aranese and Xisqueta sheep breeds and Rasquera White goat breed. The aim of this study was to select ten males per breed according to two main criteria 1) in both sheep breeds, to favour the presence of individuals with genotype of resistance (R1-R2) to Scrapie and discard those susceptible to this disease (R4-R5) and 2) create a group of individuals with a low coefficient of molecular coancestry and a high level of allelic richness. Between eight to ten individuals were selected per breed according to these criteria and moved to specific installations for training as sperm donors.

Keywords: molecular coancestry, microsatellite, conservation programme.