



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA OVEJA PALMERA CON MICROSATÉLITES

GENETIC CHARACTERISATION OF THE PALMERA SHEEP WITH MICROSATELLITES

Martínez, A.M.¹, J.L. Vega-Pla⁴, M.J. Bravo², C. Barba³, J. Caraballo² y J.V. Delgado¹

¹Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Edificio Gregor Mendel. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba. España. E-mail: ib2mamaa@uco.es

²Asociación de Criadores de la Oveja Palmera. La Palma. España.

³Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS). Madrid. España.

⁴Laboratorio de Genética Molecular. Servicio de Cría Caballar. Carretera Madrid-Cádiz km 397. 14071 Córdoba. España. E-mail: jvegpla@oc.mde.es

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Marcadores moleculares. Conservación. Islas Canarias.

ADDITIONAL KEYWORDS

Molecular markers. Conservation. Canary Islands.

RESUMEN

Se estudian 178 animales pertenecientes a la raza ovina Palmera, lo que supone la totalidad de la población, mediante 24 marcadores microsatélites con objeto de caracterizar esta raza autóctona de la Isla de la Palma (Islas Canarias, España). Se han empleado microsatélites de ovino y de bovino recomendados por la FAO, por la ISAG (International Society of Animal Genetics) y por otros autores en la bibliografía para este tipo de estudios en ovinos. Los microsatélites se han amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos amplificados se han separado mediante electroforesis en un secuenciador automático ABI 377XL. Todos los microsatélites utilizados han resultado polimórficos y se han encontrado entre 2 alelos para el ETH10 y 15 para el CSSM66, con un número medio de alelos de 7,04. La heterocigosidad media esperada ha sido 0,6039 y la observada 0,5504. Se ha llevado a cabo también la comprobación de paternidades y maternida-

des con estos microsatélites, lo que ha servido para establecer una batería de 10-12 microsatélites con una probabilidad de exclusión *a priori* superior al 99,9 p.100 que puede resultar muy útil para realizar controles de filiación en esta raza ovina en serio peligro de extinción.

SUMMARY

It have been studied 178 animals (the whole population) of the Palmera sheep with 24 microsatellites in order to characterise this autochthonous breed from La Palma Island (Canary Islands, Spain). Ovine and bovine microsatellites recommended by FAO, ISAG (International Society of Animal Genetics) and other authors in the bibliography for ovine biodiversity studies have been used. These markers were amplified by mean of the polymerase chain reaction (PCR) technique and to get the size

Arch. Zootec. 54: 363-367. 2005.



separation of the obtained fragments we have developed electrophoresis in polyacrylamide gel in an automatic sequencer ABI377XL. All the microsatellites have been polymorphic and between 2 (ETH10) and 15 (CSSM66) alleles have been found with an average value of 7.04. The expected heterozygosity has been 0,6039 and the observed heterozygosity 0.5504. The paternity and maternity have been checked with these microsatellites and this has been used to make a paternity panel with 10-12 markers and an *a priori* exclusion probability higher than 99,9 percent. This panel is useful to check paternity in this threatened breed.

INTRODUCCIÓN

La oveja Palmera es originaria de la isla de La Palma del archipiélago Canario (España), y ha sido muy importante para la economía doméstica hasta finales de los años 60 del siglo XX por la producción de lana, siendo también muy apreciada por la calidad de su carne. A partir de entonces ha disminuido considerablemente su presencia, debido a la llegada de fibras sintéticas y a la importación de otras razas ovinas más productivas de leche procedentes de otras islas. Actualmente, junto con el cerdo Negro Canario, es la raza de animales domésticos más amenazada de las Islas Canarias: se halla en situación crítica, estando en grave peligro de extinción pues, según Álvarez *et al.* (2000), en 1996 quedaban unos 150 ejemplares de esta raza.

Estos mismos autores presentan los resultados de la caracterización morfológica de la raza, y en el presente trabajo se muestran los resultados de la caracterización genética con marcadores microsatélites del ADN, como

pasos dados para intentar recuperar y conservar la raza. También se ha realizado la comprobación de paternidades y maternidades con estos microsatélites, lo que ha servido para establecer una batería de 10-12 microsatélites con una probabilidad de exclusión *a priori* superior al 99,9 p.100 que puede resultar muy útil para la gestión de esta raza ovina en serio peligro de extinción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 178 animales (lo que constituye la totalidad de la población en la actualidad) de la raza ovina Palmera pertenecientes, a varios ganaderos de la Asociación de Ganaderos de Oveja Palmera y al Excmo. Cabildo Insular de La Palma.

Se ha extraído sangre de todos los animales en tubos con EDTA K₃ como anticoagulante y utilizando el sistema Vacutainer® para realizar las extracciones. El ADN de las muestras se ha extraído mediante el Kit BLOOD-CLEAN de purificación de ADN (BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Madrid, España) siguiendo las indicaciones del fabricante para este kit.

Se han estudiado los 24 microsatélites siguientes: BM8125, BM1818, BM1824, CSSM66, ILSTS011, INRA63, SPS115, BM6506, ETH225, ETH10, INRA35, TGLA122, TGLA126, TGLA53, BM6526, RM006, CSRD247, MAF65, MAF209, OarFCB11, OarFCB48, OarFCB304, OarCP20 y OarCP34. Los microsatélites se amplifican mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según

la metodología de Martínez *et al.* (2000). Se diseñan varias reacciones múltiplex con el objeto de reducir el número de reacciones y los costes de los experimentos. Para realizar la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos mediante la PCR se someten éstos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador automático ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realiza mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente.

Con objeto de conocer el perfil genético de la raza se han calculado las frecuencias alélicas y las heterocigosidades mediante el programa informático Genetix versión 4.01 (Belkhir, 1999). Se ha realizado una prueba de equilibrio según Guo y Thompson (1992) con el algoritmo en cadena de Monte Carlo Markov mediante el programa informático GENEPOP versión 3.1c (Raymond & Rousset, 1995). Para el cálculo del contenido de información polimórfica (PIC) ha sido empleada la fórmula que propusieron Botstein *et al.* (1980).

El control de filiación se ha realizado comparando los genotipos del hijo con los genotipos de sus progenitores. Para evaluar la utilidad de estos microsatélites para realizar controles de filiación en esta raza, se ha calculado la probabilidad de exclusión *a priori* (PE) de cada uno de ellos mediante la fórmula de Jamieson (1994), y la probabilidad de exclusión combinada *a priori* (PEC) para un conjunto de sistemas mediante la fórmula de Huguet (1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los microsatélites empleados, excepto uno, han resultado polimórficos, encontrándose entre 4 alelos para tres de ellos y 15 para el CSSM66 (**tabla I**), con un número medio de alelos de 7,04. Aunque el ETH10 muestra dos alelos, lo cierto es que este marcador debe considerarse monomórfico puesto que uno de ellos se presenta con una frecuencia superior al 95 p.100.

En la **tabla I** se reflejan los valores de PIC que indican 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). Exceptuando el ETH10, el resto de los marcadores son informativos y por tanto son útiles para valorar la variabilidad genética de la oveja Palmera.

La heterocigosidad media observada alcanza un valor de 0,5504 y la esperada, calculada a partir de las frecuencias alélicas, de 0,6039. Estos valores son inferiores a los encontrados por Arranz *et al.* (2001) en otras razas ovinas españolas y por Diez-Tascón *et al.* (2000) en el Merino español y 5 razas derivadas del mismo, sin embargo indican una diversidad genética aceptable en la oveja Palmera a pesar de tratarse de una raza en proceso de recuperación.

La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para la totalidad de la población dio como resultado un desequilibrio, pero cuando se realiza esta misma prueba por ganaderías, el resultado es que sólo una de ellas se desvía del equilibrio, debido probablemente al

Tabla I. Microsatélites analizados, número de alelos obtenido, valores de PIC (contenido de información polimórfica) y de PE (probabilidad de exclusión a priori) de cada uno de ellos. (Microsatellites analysed, alleles obtained number (NA), PIC values (polymorphic information content) and a priori exclusion probability (PE) of each microsatellite).

Locus	Número alelos	PIC	PE	Locus	Número alelos	PIC	PE
BM1818	12	0,78	0,62	INRA35	4	0,58	0,37
CSSM66	15	0,71	0,55	TGLA122	6	0,56	0,36
BM6526	6	0,71	0,53	OarFCB11	6	0,56	0,36
CRSD247	8	0,69	0,52	OarCP34	7	0,53	0,35
TGLA126	5	0,71	0,52	OarFCB304	8	0,50	0,30
RM006	7	0,68	0,48	MAF65	4	0,45	0,28
ILSTS011	8	0,65	0,46	OarCP20	9	0,43	0,27
BM8125	6	0,64	0,45	TGLA53	10	0,42	0,27
INRA63	10	0,65	0,45	ETH225	5	0,45	0,26
MAF209	7	0,63	0,42	BM1824	4	0,43	0,25
OarFCB48	5	0,60	0,39	SPS115	7	0,39	0,23
BM6506	8	0,57	0,38	ETH10	2	0,01	0,01

sistema de intercambio de reproductores por productos que se lleva a cabo en esta ganadería y que está encuadrado dentro del plan de recuperación de la raza.

En la **tabla I** se detallan los valores de PE para cada marcador. A partir de estos datos se ha diseñado un panel básico de 12 microsatélites cuya probabilidad de exclusión combinada *a priori* (PEC) es 0,9984. Se prepara otro panel adicional de otros 6 microsatélites para casos de control de filiación que no puedan resolverse con el panel básico. La PEC de los dos paneles es 0,9999.

Se han realizado 48 controles de

filiación entre los cuales, ha habido 5 casos de incompatibilidad con la madre, 2 de incompatibilidad con el padre y uno de incompatibilidad con el padre y con la madre.

Esto constituye una poderosa herramienta para controlar la genealogía de los animales, que a su vez es fundamental para organizar un esquema rotatorio de apareamientos que conlleve la menor consanguinidad posible dentro del plan de recuperación y conservación de la raza. Una vez recuperada la raza, se podría afrontar el proceso de mejora genética, para lo cual también el control de la genealogía es fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, S., M. Fresno, J. Capote, J.V. Delgado y C. Barba. 2000. Estudio para la caracterización de la raza ovina Palmera. *Arch.*

Zootec., 49: 217-222.

Arranz, J.J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 2001. Genetic variation at microsatellite loci in

Archivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 366.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA OVEJA PALMERA CON MICROSATÉLITES

- Spanish sheep. *Small Ruminant Research*, 39: 3-10.
- Belkhir, K. 1999. Genetix: Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060.
- Botstein, D., R.L. White, H. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Díez-Tascón, C., R.P. Littlejohn, P.A.R. Almeida and A.M. Crawford. 2000. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 243-251.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Huguet, E., A. Carracedo y M. Gené. 1988. Capítulo 14. Valoración médico-legal de la paternidad. En: Introducción a la investigación biológica de la paternidad. Ed. Huguet, E., Carracedo, A. y Gené, M. y Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A. Barcelona.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*, 25: 37-44.
- Martínez, A.M., J.V. Delgado, A. Rodero and J.L. Vega-Pla. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 295-301.
- Raymond, M. and F. Rousset 1995. Genepop: populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86: 248-249.

