

Departamento de Microbiología y Genética

Facultad de Biociencias

Universidad Autónoma de Barcelona

MEMORIA DE MÁSTER

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS DE

SEIS RAZAS OVINAS PIRENAICAS ORIENTALES

Memoria presentada por:

Carlos Alberto Carrión Bonilla

Para optar al grado de máster por la Universidad Autónoma de Barcelona,

Bellaterra, Julio de 2012

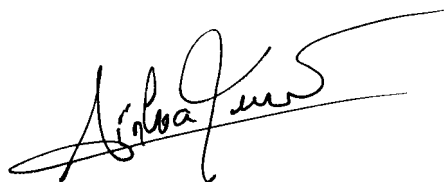
La Dra. Aïnhua Ferrando Lebraud, en calidad de investigadora y el Dr. Jordi Jordana Vidal, profesor titular del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN

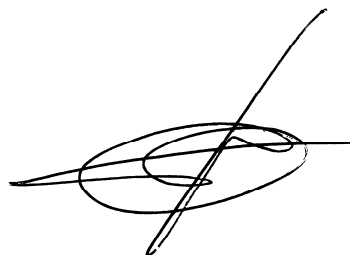
Que el trabajo de investigación titulado: “Estudio de la diversidad y relaciones genéticas de seis razas ovinas pirenaicas orientales”, presentado por el señor CARLOS ALBERTO CARRIÓN BONILLA para optar al grado de Máster en Genética Avanzada, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Autorizamos su presentación para que pueda ser evaluado por la comisión correspondiente.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Firmado el siguiente certificado, en Bellaterra, al 29 de Junio del 2012.



Dra. Aïnhua Ferrando Lebraud



Dr. Jordi Jordana Vidal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	8
1.2. Caracterización genética de las razas.....	9
1.3. Origen, descripción e importancia de las razas ovinas en estudio.....	10
1.3.1. Raza Xisqueta.....	10
1.3.2. Raza Aranesa.....	11
1.3.3. Raza Ripollesa.....	12
1.3.4. Roja del Rosellón.....	12
1.3.5. Raza Tarasconesa.....	13
1.3.6. Raza Castellonesa.....	13
1.3.7. Raza Guirra.....	13
1.3.8. Raza Lacaune.....	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Material biológico.....	16
3.2. Extracción del ADN.....	16
3.3. Marcadores microsatélite y genotipado.....	17
3.4. Análisis estadísticos.....	18
3.4.1. Variabilidad genética.....	18
3.4.2. Estructura poblacional.....	19
3.4.3. Estimación de la estructura poblacional basado en modelos bayesianos ...	19
3.4.4. Relaciones genéticas.....	20

3.4.5. <i>Análisis factorial de correspondencias</i>	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Variabilidad genética y polimorfismo	22
4.2. Diferenciación genética y estructura poblacional.....	22
4.3. Relaciones genéticas y análisis factorial de correspondencias.....	24
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES Y FUTURO	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Loci</i> microsatélites analizados y secuencias de los <i>primers</i> utilizados para su amplificación	35
Tabla 2. Parámetros de variabilidad genética a nivel de razas	36
Tabla 3. Parámetros de variabilidad genética para el conjunto de las razas.....	37
Tabla 4. Análisis de variancia molecular (AMOVA) jerárquico, dentro y entre razas.....	38
Tabla 5. Matriz de distancias genéticas entre pares de razas en base al estimador $F_{ST}(\theta)$	38
Tabla 6. Valores del parámetro f , estadístico análogo a la F_{IS} de Wright, calculado para cada raza ovina estudiada	39
Tabla 7. Valores promedios de la proporción de membresía (Q) del genoma de las razas ovinas originada en los tres grupos considerados, para los genotipos observados, utilizando el modelo Bayesiano. Los valores en negrita indican proporciones mayores al 50%.....	40
Tabla 8. Distancia genética de Nei <i>et al.</i> , 1983 (D_A) en la diagonal inferior y de Reynolds <i>et al.</i> , (1983) en la diagonal superior, para las razas ovinas estudiadas	40

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Valor de Delta K para la obtención del número de *clusters* más probable en que se estructuran las razas ovinas en estudio..... 41
- Figura 2.** Representación gráfica de las proporciones de membresía (Q) individuales en cada una de las razas ovinas predefinidas..... 41
- Figura 3.** Árbol filogenético enraizado que representa las relaciones genéticas entre las razas estudiadas con la distancia de Reynolds *et al.*, (1983) y con 1000 remuestreos del tipo *bootstrap*. La raza Lacaune ha sido utilizada como población *outgroup* 42
- Figura 4.** Árbol filogenético enraizado que representa las relaciones genéticas entre las razas estudiadas con la distancia de Nei *et al.*, (1983) y con 1000 remuestreos del tipo *bootstrap* sobre los *loci*. La raza Lacaune ha sido utilizada como *outgroup* 43
- Figura 5.** Análisis factorial de correspondencias para las razas ovinas estudiadas 44

RESUMEN

En esta investigación se han caracterizado genéticamente seis razas ovinas de los Pirineos orientales –todas ellas de aptitud cárnica y catalogadas en peligro de extinción, salvo la raza Tarasconesa– y analizado sus relaciones genéticas con un panel de 12 marcadores de tipo microsatélite. Las razas en estudio se encuentran distribuidas en los Pirineos orientales españoles (Aranesa, Xisqueta y Ripollesa) y Pirineos orientales franceses (Tarasconesa, Roja del Rosellón y Castellonesa). La raza española de capa roja Guirra se ha analizado a modo referencial y comparativo –por su color rojo de piel y procedencia norafricana, de forma similar a la Roja del Rosellón– para conocer así sus relaciones y variabilidad genética en relación a las razas pirenaicas. La raza francesa Lacaune, de aptitud básicamente lechera, altamente seleccionada y de amplia distribución geográfica y censal, se ha utilizado como población *outgroup*, es decir, como grupo externo de comparación.

Se observó un total de 153 alelos. La heterocigosis esperada osciló entre un rango de variación de 0,58 (Lacaune) a 0,76 (Xisqueta). El número efectivo de alelos presentó un rango de variación de 2,58 (Lacaune) a 5,16 (Xisqueta).

La diferenciación genética entre las razas estudiadas fue baja, aunque significativa ($F_{ST}= 4,5\%$). Los análisis filogenéticos y el modelo poblacional bayesiano demuestran que las razas Aranesa y Tarasconesa comparten un origen ancestral común. Los altos niveles de intercambios reproductivos en las diferentes poblaciones acaecidos en el pasado, han contribuido a la actual diversificación de razas en la región de los Pirineos orientales. La raza Guirra presenta un origen filogenético diferente, en comparación a las razas pirenaicas. La mayor cantidad de variabilidad genética, explicada a nivel intra-racial (95,85%; $p<0,0001$), tiene coherencia con el manejo de las explotaciones, en

el cual las ferias ganaderas y la trashumancia han promovido un gran flujo genético en la región.

Palabras claves: diversidad genética, microsatélites, razas ovinas, Pirineos orientales.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad genética en animales de granja se basa en el análisis de la variabilidad intra e inter-racial, y el mantenimiento de la misma es un objetivo para las estrategias utilizadas en las prácticas de manejo y en la crianza de estos animales (Lenstra *et al.*, 2012). Hoffmann (2010) justifica la importancia de realizar su investigación según las necesidades del ser humano; según su sistemática éstas pueden clasificarse en: necesidades impredecibles (ej., selección de razas resistentes al cambio climático, nuevos conocimientos sobre las necesidades nutricionales humanas, y condiciones cambiantes en el mercado) y predecibles (ej., demanda futura por nuevos requerimientos y tipos de alimentos).

Las razas locales o autóctonas representan importantes reservorios de diversidad genética, en comparación con las del tipo comercial (Giovambattista *et al.*, 2001). El resultado de esta mayor variabilidad genética, comportaría una serie de características adaptativas únicas, como una mejor supervivencia en diferentes sistemas de producción, a climas extremos y orografías locales; mayor resistencia a enfermedades e infecciones; mejor capacidad de pastoreo en zonas pobres; migración, y comportamiento gregario.

Esta variabilidad se ha ido perdiendo por la preferencia en la utilización de razas altamente especializadas, y la mala planificación de los cruzamientos de razas autóctonas con otras más productivas, lo que ha producido la erosión genética de estos recursos genéticos (Ajmone-Marzan y GLOBALDIV Consortium, 2010; Taberlet *et al.*, 2011). En el caso de las razas autóctonas ovinas de los Pirineos orientales españoles, el declive poblacional se ha venido dando por la intensificación de los sistemas de explotación, derrumbamiento del sistema trashumante, despoblamiento rural, el

envejecimiento demográfico y la ausencia de relevo generacional (Avellanet, 2002; Jordana *et al.*, 2010).

El manejo efectivo de los recursos genéticos requiere un conocimiento de las características de las razas, que incluye información sobre el tamaño y la estructura poblacional, distribución geográfica, el sistema de producción y la diversidad genética intra e inter-racial.

Según la FAO (1992), los planes de manejo y conservación de los recursos genéticos animales debe seguir un protocolo establecido. La primera fase incluye la caracterización de las razas, siendo la caracterización genética una etapa y herramienta fundamental para establecer los futuros planes de mejora genética. La información relacionada con la diversidad genética y la diferenciación es esencial como un primer paso hacia el establecimiento de programas de conservación y programas sostenibles de manejo, para evitar así la extinción y erosión de los recursos genéticos animales.

1.2. Caracterización genética de las razas

Los estudios con marcadores moleculares permiten estimar la diversidad genética intra e inter-racial y reconstruir la historia de las razas y de sus poblaciones ancestrales (Groeneveld *et al.*, 2010). Una de las primeras etapas en los programas de conservación consiste en la evaluación de la variabilidad genética, la distribución de esta variabilidad entre las poblaciones, y la detección de alelos raros como indicador de poblaciones con variantes únicas; siendo esenciales para un manejo efectivo de los recursos genéticos animales (González - Candelas y Montolio, 2000).

Los marcadores microsatélites han sido utilizados ampliamente en estudios sobre la caracterización genética de las razas de animales de granja, debido a sus interesantes propiedades, como son: presentar un elevado grado de polimorfismo, su gran abundancia y amplia distribución a lo largo del genoma, una evolución neutral, la

codominancia y la facilidad para la automatización de procesos analíticos, lo cual permite comparar la diversidad genética entre razas (Toro *et al.*, 2009; Lenstra *et al.*, 2012).

1.3. Origen, descripción e importancia de las razas ovinas en estudio

A continuación, se presenta una descripción sobre el origen de cada una de las razas utilizadas en este estudio: su distribución, características más importantes, censo poblacional y estado de conservación. Las razas Aranesa, Ripollesa y Xisqueta se distribuyen en los Pirineos orientales españoles y las razas Tarasconesa, Castellonesa y Roja del Rosellón en los Pirineos orientales franceses. A modo referencial y comparativo, se incluyó la raza Guirra o Roja Levantina (Comunidad Valenciana: España) –por su color rojo de piel y procedencia norafricana, de forma similar a la Roja del Rosellón–, para el estudio de las relaciones filogenéticas y variabilidad genética en relación a las razas ovinas pirenaicas. La raza Lacaune fue utilizada como un grupo externo de comparación (población *outgroup*); por su aptitud básicamente lechera, estar altamente seleccionada y ser de amplia distribución geográfica y censal. Esta raza es la más utilizada para la producción de leche en el sur de Francia (Babo, 2000).

1.3.1. Raza Xisqueta

Esta raza pertenece al Tronco Ibérico, originándose a partir del *Ovis aries ibericus*. Desciende del primitivo ovino originario de Asia Central. Su distribución geográfica ocupa las zonas comprendidas entre los ríos *Noguera Pallaresa* como límite oriental y *Éssera* como límite occidental en la Provincia de Huesca. Actualmente, *Pallars Jussà*, *Pallars Sobirà* y *Alta Ribagorça* son las comarcas donde se localizan la mayoría de ovinos de la raza. La capa es de color blanco con pigmentación centrífuga: manchas negras en las puntas de las orejas, alrededor de los ojos, labios y partes distales de las extremidades. La lana es de tipo entrefino, semicerrada, de baja densidad y de color

blanco uniforme, dejando libres extremidades posteriores, anteriores, cabeza y vientre. Su aptitud es principalmente cárnica (Avellanet, 2002; Jordana *et al.*, 2010). Está catalogada en peligro de extinción en el catálogo nacional de razas de ganado de España (Real Decreto 2129/2008, por el que se establece el programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas). En la actualidad, hay 66 ganaderías registradas en la Asociación de Criadores de la raza Xisqueta (ACOXI). El número de individuos registrados en el Registro Fundacional de la raza es de un total 16.981 reproductores: 16.649 hembras y 332 machos (Jordana *et al.*, 2010). El manejo de las explotaciones lo realizan ganaderos con una edad promedio de 51 años, y es menor al 20% el relevo generacional garantizado dentro de las familias dedicadas al manejo de la raza. (<http://www.fecot.cat> 20/06/2011).

1.3.2. Raza Aranesa

Está emparentada con la raza francesa Tarasconesa, propia de los Pirineos orientales franceses (Sierra, 2002, citado en Parés, 2008). Pertenece indirectamente al tronco Merino que participó en su creación (Esteban, 2003). Otras razas que han influenciado en su origen son las razas inglesas *Leicester*, *Southdown*, y los merinos franceses *Precoz* y *Rambouillet* (Parés, 2008). Se encuentra ubicada en el Valle de Arán, principalmente en *Les*, *Bossòst* y *Salardú*. Su aptitud es cárnica. Presenta proporciones longilíneas y un dimorfismo sexual bien definido. La lana es de color blanco y del tipo entrefino. Tiene un perfil frontal subconvexo y presencia de cuernos en ambos sexos (Parés, 2008). El censo poblacional es muy reducido, de unos 1.700 individuos, distribuidos en 64 explotaciones, y está catalogada en peligro de extinción (RD2129/2008). En el año 2004, se creó la Asociación de Criadores (ACORA) y se inició un programa de conservación de la raza (<http://www.fecoc.cat/> 20/06/2012).

1.3.3. Raza Ripollesa

Esta raza se originó a partir de cruces entre antiguos ovinos autóctonos que poblaban los Pirineos Centrales con individuos de tipología merina que llegaron a los Pirineos, como resultado de la trashumancia (MAPA,1980). Al igual que la raza Aranese, pertenece de forma indirecta al Tronco Merino. La mayoría de la producción se localiza en el noreste de Cataluña, en las comarcas de *Cerdanya, Berguedà, Ripollès, Osona, Garrotxa, Alt Empordà, Baix Empordà, Gironès, La Selva, Vallès Oriental y Vallès Occidental*. Su aptitud es cárnica. En el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España consta como una raza en peligro de extinción en base al censo de animales (RD 2129/2008). En el libro genealógico hay registrados 6.240 hembras y 260 machos repartidos en 15 explotaciones, aunque su censo estimado bordea aproximadamente los 40.000 animales (<http://www.fecoc.cat/> 20/06/2012).

1.3.4. Roja del Rosellón

Parece tener sus orígenes más ancestrales en las poblaciones procedentes del Norte de África (Pujol, 1974, citado en Parés *et al.*, 2011). En España, se la conoce con el nombre de Berberina (Parés *et al.*, 2011). Es de lana del tipo semifino y se localiza en las tierras pre-pirenaicas del sureste de Francia. Se encuentra distribuida entre *Narbonne* y *Perpignan*. La principal característica es el color rojo de su piel, que es visible en las partes de su cuerpo que no están cubiertas de lana. Las hembras y los machos carecen de cuernos. La cabeza y las extremidades son de color rojo-café. La lana es de color blanco y la orejas de tamaño medio largo casi horizontales (Babo, 2000). En el año 2001, se llegaron a registrar más de 2.570 individuos (<http://dad.fao.org/> 20/06/2012). (Babo, 2000).

1.3.5. Raza Tarasconesa

Esta raza parece originarse en animales provenientes de Siria durante la invasión árabe (Gayraud, 1938, citado en Parés, 2008). Se distribuye en los Pirineos Centrales franceses en el departamento de Languedoc-Rousillon. La cabeza es de color blanco y, tanto machos como hembras, poseen cuernos; los del macho tienen forma de espiral. El vellón tiene un espesor de 10 cm aproximadamente, lo que le permite adaptarse a climas extremos. Las extremidades son muy fuertes y adaptadas a desplazamientos a lo largo de grandes distancias en la época de trashumancia (Babo, 2000). En el año 2001, se llegaron a registrar más de 120.000 individuos (<http://dad.fao.org/> 20/06/2012).

1.3.6. Raza Castellonesa

Esta raza francesa se localiza en el Valle de Lez al suroeste de *Saint Gérons (Ariège)*. El origen de la raza se remonta al año 1850 (<http://dad.fao.org> 20/06/2012). La principal área de producción de esta raza se ubica en *Couserans* y *Bordes*. La capa es de color blanco; la cabeza, las extremidades y el vientre son de color rojizo y café. Ha recibido influencias de la raza inglesa *Southdown*. Su censo aproximado es de unos 1000 individuos, repartidos en unas pocas ganaderías de montaña de manejo extensivo tradicional (Babo, 2000).

1.3.7. Raza Guirra

Se ha planteado la hipótesis de que esta raza se originó a partir de una variante pigmentada de la raza Segureña o de una raza afín a la raza Manchega, ambas del Tronco Entrefino. La segunda hipótesis plantea su independencia étnica al haberse originado a partir de la raza *Beni Ahsen* proveniente de la costa atlántica de Marruecos (Sánchez Belda, 1976a y 1976b). Se la conoce también como Roja Levantina y se distribuye principalmente en la Comunidad Valenciana. Se caracteriza por una capa de

color rojo y una lana muy aceitosa. El vellón es de color rojo-café y amarillo-blanco. Los cuernos están ausentes en ambos sexos (Sánchez Belda, 1976a y 1976b). Su aptitud es cárnica y lechera. En el año 2009, se registraron 5267 individuos (<http://dad.fao.org> 20/06/2012) y está catalogada en peligro de extinción (RD 2129/2008).

1.3.8. Raza Lacaune

La raza Lacaune fue reconocida oficialmente en el año de 1905 y se estableció su libro genealógico en 1947 (Babo, 2000). Su nombre proviene de los montes Lacaune en el departamento del Tarn en Francia, y es el resultado de la mezcla de diferentes tipos de ovejas locales (*Larzac, Camarès, Causses* y de *Rodez*). Su cabeza es larga, fina, y está cubierta de pelos blancos muy finos con tonos plateados. Los cuernos están ausentes en ambos sexos y sus orejas son largas y horizontales. Su vellón es poco abundante y de color blanco. Es la raza comercial más utilizada para la producción de leche en el sur de Francia (Babo, 2000). En el año 2004, su población superaba el 1.214.700 individuos (<http://dad.fao.org> 20/06/2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

En este estudio se plantea realizar la caracterización genética de las razas ovinas de los Pirineos orientales y analizar sus relaciones genéticas mediante el uso de una batería de 12 marcadores de tipo microsatélite.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar los niveles de variabilidad genética de estas razas
- Determinar el grado de diferenciación genética entre ellas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se tomaron muestras de sangre de un total de 410 animales en pureza, que cumplían con el estándar de cada raza. La distribución de los individuos muestreados fue la siguiente: Aranesea ($n=94$), Tarasconesea ($n=44$), Xisqueta ($n=97$), Ripollesa ($n=53$), Roja del Rosellon ($n=52$), Castellonesa($n=24$), Guirra ($n=33$) y Lacaune ($n=13$).

3.2. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se siguió el protocolo establecido por Ausubel *et al.* (1989). La extracción fue realizada por lisis celular con detergente (TE) y proteinasa K, liberando así el ADN. Luego se desproteinizó con solvente orgánico (cloroformo:alcohol isoamílico) y se precipitó el ADN con etanol. El protocolo utilizado se detalla a continuación:

A partir de 400 μ l de sangre se realizaron 3 o 4 lavados con 500 μ l de tampón salino TE (Tris HCL 10 mM y 1 mM EDTA, pH = 8). El precipitado de leucocitos restante fue resuspendido en 100 μ l de tampón de digestión K (KCL 50 mM, Tris - HCL 10 mM, Tween 20 0,5 %), el cual contenía 99 μ l de detergente y 1 μ l de la enzima proteinasa K (10 mg/ml). El detergente permitió lisar la membrana de los glóbulos blancos y la proteinasa K evitó que las nucleasas citoplasmáticas degradasen el ADN. A continuación, las muestras fueron incubadas a 56°C durante cuatro horas. Posteriormente, se añadió una mezcla de 100 μ l de TE y 200 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1) para separar el ADN de las proteínas y de otros solventes orgánicos. La mezcla fue agitada y centrifugada durante 10 minutos a 13.000 rpm. De esta manera, el ADN quedó resuspendido en la fase acuosa y las proteínas y demás componentes en la fase orgánica. Se transfirieron 200 μ l de la fase acuosa a otro tubo

ependorf y se añadieron 20 μ l (1/10 volúmenes) de cloruro sódico 2 M y 500 μ l (2.5 volúmenes de etanol 70 %; siendo la finalidad de este último eliminar las sales del precipitado. Por último, se dejó las muestras en el congelador durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos y se eliminó el etanol. A continuación, se añadieron 500 μ l de etanol al 70 %, se centrifugó durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después, se pusieron a secar las muestras durante 30 minutos a 56°C. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 μ l de TE. Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

3.3. Marcadores microsatélites y genotipado

Se utilizó un panel de 12 marcadores microsatélites: HSC, INRA49, MAF65, MAF214, MCM42, MCM527, MCM218, OARCP49, OARCP20, OARCP34, OARFCB11 y TGLA53 (Tabla 1). Para evitar el posible solapamiento de los productos resultantes de la PCR, los 12 microsatélites analizados fueron agrupados en tres multiplex denominadas A1 (programa “xisq(a)”: MCM42, INRA49, MCM527, MAF65, TGL53 y HSC); B2 (programa “touchd”: MCM218 y MAF214); B1 (programa “xisq(a)”: OarCP49, OarFCB11 y OarCP49) y una singleplex llamada A2 (programa “touchd”: OarCP20).

El *primer forward* de cada marcador estuvo marcado en 5' con un fluorocromo 6-FAM, NED o HEX. La amplificación de los *loci* fue realizada en un volumen final de 15 μ l que contenía aproximadamente 50-100 ng de ADN genómico, 0,075-0,125 μ M de cada primer, 2 mM de MgCl₂, 0,27-0,50 mM de dNTPs, 0,3-1,5 U de polimerasa AmpliTaq Gold (*Life Technologies*) y 1 X de Gold Buffer. Las PCRs fueron llevadas a cabo con un termociclador 9700 (*GeneAmp PCR system, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) utilizando dos programas diferentes con la aplicación de los siguientes parámetros:

“**xisq(a)**”: 10 minutos a 95°C, seguido de 32 ciclos de 40s a 95°C; 40s a 54°C; 40s a 72°C y una extensión final a 72°C durante media hora.

“**touchd**”: 10 minutos a 95°C, seguido de 9 ciclos de 30s a 95°C; 30s a 63°C (disminuyendo un grado cada ciclo) y 30s a 72°C, más 27 ciclos 30s a 95°C, 30s a 52°C, 30s a 72°C y finalmente la extensión a 72°C durante media hora.

Se utilizaron muestras control ovinas, previamente genotipadas, para garantizar la correcta asignación del tamaño de los alelos. Los productos generados por PCR fueron analizados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 3730 (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Para realizar una medida adecuada de los fragmentos separados por electroforesis se utilizó el marcador interno estándar ROX70-500 (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Finalmente, se empleó el programa *GeneMapper v3.7 (Life Technologies)* para el correspondiente análisis y asignación de los alelos amplificados.

3.4. Análisis estadísticos

3.4.1. Variabilidad genética

Se utilizó el programa *POPGENE v.1.32 (Yeh et al., 1997)* para el cálculo del número observado y esperado de alelos (Kimura y Crow, 1964), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) por *locus* y por razas (Nei, 1974).

Para el cálculo de la riqueza alélica (R_t), se siguió la metodología de El Mousadik y Petit (1996), y para estimar la desviación global, para el conjunto de razas, del equilibrio de Hardy-Weinberg se usó el parámetro f de Weir y Cockerham (1984), análogo a la F_{IS} de Wright. Se implementó un análisis de remuestreo mediante 1920 permutaciones para probar la hipótesis nula de que no existe déficit de heterocigotos en las razas estudiadas. El nivel de significación ($p < 0,05$) fue ajustado utilizando la

corrección de *Bonferroni* para múltiples tests independientes. Para estos análisis, se utilizó el programa *FSTAT* v. 2.9.3.2. (Goudet, 2001). El índice de contenido polimórfico (PIC) fue calculado con el programa *Cervus* v.3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007).

3.4.2. Estructura poblacional

Se calcularon los estadísticos F de *Wright* utilizando la metodología de Weir y Cockerham (1984) con el programa *FSTAT* v.2.9.3.2. (Goudet, 2001). Se aplicó el procedimiento de remuestreo *jackknife* para el cálculo de los respectivos intervalos de confianza, en las poblaciones y *loci* estudiados. Para analizar la diferenciación genética inter e intra-razas, se obtuvo el estadístico G_{ST} (Nei, 1987), que permite medir la diferenciación genética promedio observada en todos los *loci* analizados. Se aplicó un Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) jerárquico para estimar la partición de la variabilidad genética entre razas y dentro de ellas. Se obtuvieron 1023 permutaciones para el análisis de significación estadística. Para este cálculo se utilizó el programa *Arlequin* ver 1.1 (Schneider *et al.*, 1997).

Se utilizó el estimador $F_{ST}(\theta)$ de Weir y Cockerham (1984) para calcular la diferenciación genética entre pares de razas. Para aceptar o rechazar la hipótesis nula, de que no existe diferenciación genética en las razas estudiadas, se estimaron los valores de probabilidad P mediante 560 permutaciones, utilizando el programa *FSTAT* v.2.9.3.2. (Goudet, 2001). El nivel de significación utilizado ($p < 0,05$) se ajustó utilizando la corrección de *Bonferroni* para múltiples tests independientes.

3.4.3. Estimación de la estructura poblacional basado en modelos bayesianos

Los patrones de estructura poblacional fueron investigados con el algoritmo bayesiano implementado en el programa *Structure* v.2.3.2. (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa

permite inferir estructuras poblacionales y asignar la parte del genoma de cada animal que pertenece a cada grupo poblacional (o *cluster*). Este programa asigna un valor de probabilidad de pertenencia a uno o varios *clusters* para un número predeterminado de K poblaciones, en base a los genotipos dados. Se utilizó el método de Evanno *et al.*, (2005) para estimar el número más probable de K poblaciones según el parámetro Delta K. Para ello, se utilizó el programa *Structure Harvester* (Earl y VonHoldt, 2012). Para cada valor de K, se realizaron 20 análisis independientes utilizando el modelo de *admixture* con las frecuencias genéticas correlacionadas. Se estableció un *burning period* (descarte) de 100.000 pasos, seguidos de 50.000 pasos adicionales con el algoritmo *Markov Chain Monte Carlo*. Este procedimiento agrupa a los individuos analizados en *clusters*, y estima la proporción de pertenencia a cada uno de ellos (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). Se utilizó un valor de membresía (Q) $\geq 50\%$ en base a estudios de diversidad genética realizados con otras razas ovinas en Europa (Peter *et al.*, 2007).

3.4.4. Relaciones genéticas

Para la construcción del árbol enraizado se utilizaron los programas estadísticos *seqboot*, *gendist*, *neighbor* y *consense* incluidos dentro del paquete *Phylip* v.3.69 (Felsenstein, 2009). El programa *seqboot* permitió generar un análisis de remuestreo de los datos originales con 1000 *bootstraps* para determinar la robustez de las ramas. Se utilizaron las frecuencias génicas para la obtención de las distancias genéticas en base al método propuesto por Reynolds *et al.*, (1983) con el programa *gendist*. LaVal *et al.*, (2002) sugieren el uso de este parámetro para el análisis a nivel de razas, en las que el tiempo de divergencia es bastante corto y la diversidad observada es debida, principalmente, a la deriva genética. *Neighbor* permitió construir el árbol enraizado con la metodología de *neighbor-joining* y el árbol más parsimónico se construyó en base al

método de *majority rule consensus* con el programa *consense*. En el árbol enraizado obtenido se indica el valor de *bootstrap* cuando éste presenta un porcentaje superior al 50%.

Adicionalmente, se calculó la matriz de distancias genéticas (D_A) de Nei *et al.* (1983) y se construyó el árbol enraizado con la metodología de *neighbor-joining*. Se generó un análisis de remuestreo con 1000 *bootstraps* sobre los *loci* para determinar la robustez de las ramas.

La metodología de Nei *et al.* (1983) permite estimar la correcta topología para poblaciones muy relacionadas genéticamente y que tienen un período de divergencia corto (Takesaki y Nei, 1996). El programa utilizado para este análisis fue *POPULATIONS* v.1.2.31 (Langella, 1999). En ambos análisis se utilizó a la raza Lacaune como grupo externo de comparación (población *outgroup*). Para la edición y visualización de los árboles de relaciones genéticas se utilizó el programa *Tree View* v.1.6.6 (Page, 1996).

3.4.5. Análisis factorial de correspondencias

Se realizó un análisis factorial de correspondencias utilizando el programa *Genetix* (Belkhir *et al.*, 2004). Se aplicó el análisis a las tablas de contingencia para el desarrollo de una matriz de correlaciones. Este programa condensa la información en pocas variables y permite una representación espacial de las poblaciones, y/o individuos, con respecto al eje definido.

4. RESULTADOS

4.1. Variabilidad genética y polimorfismo

Los 12 marcadores microsatélites amplificaron correctamente y resultaron ser altamente polimórficos, con un índice de contenido polimórfico medio (PIC) de 0,73 para el conjunto de las razas estudiadas. Se observaron un total de 153 alelos en los 12 *loci* estudiados. En la Tabla 2 se presentan los parámetros de variabilidad genética dentro de cada raza. En términos de heterocigosis esperada (H_e) o diversidad genética de Nei, la raza que presentó mayor variabilidad genética fue la Xisqueta ($0,76 \pm 0,10$) y la menos diversa fue la Lacaune ($0,58 \pm 0,11$). En términos de riqueza alélica (R_t), la raza Xisqueta presentó el valor más elevado para el número de alelos ($7,12 \pm 2,10$) y la Lacaune el número más bajo ($4,25 \pm 1,05$).

En la Tabla 3 se presentan los resultados de los parámetros de diversidad genética obtenidos para todas las razas conjuntamente. El número de alelos por *locus* (N_a) varió en un rango de 9 alelos en el marcador INRA49 y 24 alelos en el marcador OARCP49, con un valor promedio de $12,75 \pm 4,22$. El valor promedio de heterocigosis esperada presentó un rango de variación entre 0,58 en el marcador MAF214 y 0,90 en el marcador OARCP49, con un valor promedio de $0,76 \pm 0,09$.

4.2. Diferenciación genética y estructura poblacional

Las medias obtenidas de los valores de F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} fueron significativamente diferentes de 0. Se pudo observar un déficit promedio de heterocigotos F_{IS} del 2,7% en los *loci* estudiados. Para los valores de F_{ST} , se observó una diferenciación genética del 4,1%, entre las razas estudiadas, y el déficit promedio global de heterocigotos F_{IT} fue de 6,7%. El valor promedio de G_{ST} permitió detectar una diferenciación genética del 5,6%

entre las razas estudiadas. El resultado de este estadístico indica que, un 94,4% de la variabilidad genética es debida a las diferencias existentes entre individuos.

Según el Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) jerárquico, el global de la variabilidad genética se explica, básica y consistentemente, a nivel intra-racial (95,85%), en comparación al bajo porcentaje explicado entre razas (4,5%) ($p < 0,00001$) (Tabla 4)

No obstante, la matriz de valores F_{ST} reveló que las razas ovinas estudiadas son genéticamente diferentes, ya que existen diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$). Las razas que presentaron una menor diferenciación genética entre ellas, son los pares: Tarasconesa-Xisqueta (1,12%); Ripollesa-Xisqueta (1,19%), Tarasconesa-Aranesa (1,30%) y Xisqueta-Aranesa (1,31%). Las pares de razas que presentaron una mayor diferenciación genética son: Guirra-Lacaune (14,64%), Roja del Rosellón-Lacaune (11,42%). La raza Lacaune, como era de esperar, es la más diferenciada en relación al resto de razas estudiadas (Tabla 5).

El estadístico f , análogo a la F_{IS} de Wright, permitió observar un déficit altamente significativo de heterocigotos ($p < 0,01$) para las razas Aranesa y Xisqueta, y un déficit significativo ($p < 0,05$) para la raza Guirra (Tabla 6).

Utilizando el método de Evanno *et al.* (2005), el número estimado de grupos o poblaciones fue de $K = 3$ (Figura 1). Para cada raza, la Tabla 7 indica el porcentaje promedio del genoma que se originó de cada uno de los tres grupos, y la Figura 2 muestra la representación gráfica de la membresía de los genotipos estudiados a cada una de las poblaciones estimadas. La raza Guirra se encuentra en el grupo 1, con un porcentaje del 90,3%. Las razas Aranesa y Tarasconesa comparten el grupo 2, con un 76,9% y 78,0% respectivamente. En el grupo 3 se agrupan las razas Xisqueta (65,8%), Ripollesa (63,2%), Roja del Rosellón (87,7%) y Castellonesa (53,2%).

4.3. Relaciones genéticas y análisis factorial de correspondencias

El árbol enraizado, construido en base a las distancias de Reynolds *et al.*, (1983), indica que existe poca diferenciación genética entre las razas estudiadas (Figura 3). Se observan, sin embargo, dos grupos principales en los que la robustez de las ramas es superior al 50%. Las razas Aranesa y Tarasconesa se agrupan juntas en un 63,2% de los remuestreos y las razas pirenaicas, incluidas las de capa roja, se agrupan de forma separada de la Guirra y Lacaune en un 88,51% de los remuestreos realizados. El resto de ramas, entre las razas pirenaicas, tienen una robustez inferior al 50%, sin identificarse otras estrechas relaciones por grupos.

El árbol filogenético enraizado, construido en base a la distancia genética de (D_A) de Nei *et al.*, (1983) (Figura 4), permitió identificar las topologías más robustas para las razas Aranesa y Tarasconesa con un 95% de robustez. Las razas pirenaicas, incluidas las de capa roja, se agrupan de forma separada de la Guirra y Lacaune con una robustez de topología del 75%.

En la Tabla 8 se muestran los valores de las distancias genéticas (D_A) de Nei *et al.*, (1983) y de Reynolds *et al.*, (1983). Se observa que las razas Guirra y Lacaune son las más distantes, en relación a las razas ovinas pirenaicas.

El análisis factorial de correspondencias también mostró una limitada diferenciación genética entre las razas ovinas estudiadas (Figura 5). El factor 1 y 2 contribuyeron con un 2,48% y 1,90%, mientras que el factor 3 contribuyó con un 1.87% a la inercia total, respectivamente. Las razas ovinas pirenaicas se encuentran formando un grupo aparte de la Guirra, que se encuentra distante en el lado izquierdo de la representación espacial, en el gráfico.

5. DISCUSIÓN

El elevado índice promedio de contenido polimórfico (PIC=0,73), demuestra la utilidad de esta batería de marcadores moleculares para la caracterización de la biodiversidad ovina en la región. El valor promedio de diversidad genética, para el conjunto de razas pirenaicas ($H_e = 0,73$), indica un alto nivel de variabilidad genética en los Pirineos Orientales. Comparativamente, se han registrado valores similares de diversidad genética en otras razas ovinas españolas que, según Arranz *et al.*, (2001) y Alvarez *et al.*, (2004), presentan valores promedios de heterocigosis esperada de 0,77 y 0,66, respectivamente.

Los elevados valores de diversidad genética, podrían atribuirse a bajos niveles de consanguinidad, alto flujo génico entre las razas estudiadas, bajas tasas de selección y a una importante riqueza alélica (Tolone *et al.*, 2012). Una posible explicación de la elevada diversidad en la región, es la apuntada por Lawson-Handley *et al.*, (2007), que sostienen que las razas ovinas del sur de Europa poseen una diversidad, dentro de raza, superior a las del del norte, debido, básicamente, a que estas poblaciones más meridionales poseen mayores tamaños censales y han sido transportadas, durante siglos, por diferentes rutas comerciales con una mayor intensidad. Otra posible explicación, para esta mayor variabilidad, sur vs norte, sería la mayor proximidad de estas razas a los centros primarios de domesticación, que siempre retienen una mayor variación.

La mayor cantidad de variabilidad genética explicada dentro de razas, se ha observado también en otros estudios con ovinos y caprinos en Europa (Cañón *et al.*, 2006; Peter *et al.*, 2007; Tolone *et al.*, 2012). Las causas principales para estos resultados son el movimiento de las razas por diferentes rutas comerciales y la trashumancia, con el posible intercambio genético que eso conlleva. En el caso de la razas Aranesa y

Xisqueta se ha referenciado un gran flujo genético ancestral, con intercambio de reproductores entre las explotaciones, aprovechando la trashumancia y las ferias ganaderas (Avellanet, 2002; Parés, 2008).

Los análisis filogenéticos demuestran que existe poca diferenciación genética entre las razas estudiadas. Sin embargo, tanto con la distancia D_A de Nei (Nei *et al.*, 1983) como con la distancia de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983), el conjunto de razas pirenaicas conformarían una agrupación geográfica bien definida, con valores de significación de *bootstrap* relativamente elevados: 75% para D_A de Nei, y 88,5% para Reynolds.

Dentro de este *cluster* de razas pirenaicas, las razas Aranesa y Tarasconesa se agruparían, consistentemente, en un solo grupo (95% para D_A de Nei, y 63,2% para Reynolds), lo que confirma los resultados encontrados por Parés (2008), que sostiene que ambas razas comparten un origen en común. Estas razas pertenecen al grupo entrefino pirenaico, en el que se encuentran otras similares como las de Aura-Campan, Baregesa, Castellonesa y Lordesa (Parés, 2008). La mayor distancia genética de la raza Roja del Rosellón, en relación al resto de razas ovinas pirenaicas, se podría explicar por el origen africano de la misma (Parés *et al.*, 2011).

El análisis bayesiano permitió agrupar a las siete razas en estudio en tres grupos ancestrales. Por una parte, la raza levantina Guirra, que tiene un origen filogenético diferente al de las razas pirenaicas, al ser originaria de las costas atlánticas de Marruecos (Sánchez Belda, 1976a y 1976b). En el grupo 2, las razas Aranesa y Tarasconesa, que comparten, asimismo, un origen ancestral común, lo cual confirma los resultados del análisis filogenético. En el grupo 3, se evidencian los pretéritos niveles de intercambio en las poblaciones locales ancestrales, que se refleja en las actuales agrupaciones raciales de los Pirineos orientales. Las razas que pertenecen a este grupo

proviene de diferentes troncos ancestrales. Así, la raza Xisqueta, proviene del Tronco Ibérico; la Ripollesa, del Tronco Merino; la Roja del Rosellón, del Norte de África y la Castellonesa, del Tronco Entrefino. Estas razas se encuentran distribuidas en los grupos 2 y 3 con distintos porcentajes de membresía (8-87%), lo cual no permite identificar grupos genéticos independientes, explicando, por tanto, la poca diferenciación genética existente entre estas razas ovinas pirenaicas.

El análisis factorial de correspondencias tampoco permitió diferenciar genéticamente, y de forma clara, a las razas en estudio. De estos resultados únicamente se infiere que la raza Guirra, localizada en la Comunidad de Valenciana, presenta un origen ancestral diferente al de las razas de los Pirineos orientales, españoles y franceses.

6. CONCLUSIONES Y FUTURO

- El elevado índice de contenido polimórfico (PIC), encontrado en este estudio, justifica la utilidad de los 12 marcadores microsatélites para el análisis de la diversidad genética de las razas ovinas en el área de estudio.
- El mayor porcentaje de variabilidad genética explicada es a nivel intra-raza. Este patrón poblacional, observado en las seis razas de los Pirineos Orientales, es coherente con las prácticas de trashumancia y las ferias ganaderas que promovieron en el pasado un gran flujo genético en la región.
- Este importante flujo genético ha contribuido a la actual diversificación de razas en los Pirineos orientales.
- Genéticamente, las razas ubicadas en la región, forman un *cluster* bastante uniforme, diferenciado de las otras poblaciones ovinas tomadas como referencia. Las dos razas, genéticamente más similares, fueron la española Aranesa y la francesa Tarasconesa, por su contrastado origen común y por su mayor y referenciado intercambio de reproductores..
- Estos resultados son de importancia para los científicos y técnicos involucrados en actividades de conservación, así como, para las distintas asociaciones de criadores de las razas. Con ellos se podrá optimizar una mejor gestión en los controles de los tamaños efectivos de población, los flujos genéticos, el nivel de los valores de consanguinidad, y se podrá asegurar así, de forma más eficiente, el futuro de su raza.
- Se recomienda, no obstante, que se realicen estudios de caracterización genética más completos, en los que se analicen diferentes subpoblaciones de cada una de las razas, para una mejor estimación de los patrones de variabilidad y grado de diferenciación genética.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ajmone-Marsan, P y The GLOBALDIV Consortium. 2010. A global view of livestock biodiversity and conservation. *Animal Genetics* (41): 1-5.

Alvarez, I., Royo, L.J., Fernández, I., Gutiérrez, J.P., Gómez, E y Goyache, F. Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *Journal of Animal Science* (82): 2246-2252.

Aranguren-Méndez, J.A. 2002. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Arranz, J.J., Bayón, Y. y San Primitivo, F. 2001. Genetic differentiation among spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetics Selection Evolution* (33): 529-542.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A y Struhl, K. 1989. Currents protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc., New York.

Avellanet, R. 2002. La raza Ovina Xisqueta: estudio biométrico y caracterización estructural de las explotaciones. Tesina de investigación. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Avellanet, R. 2006. Conservación de recursos genéticos ovinos en la raza Xisqueta: caracterización estructural, racial y gestión de la diversidad en programas "in situ". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Babo, D. 2000. Races ovines et caprines françaises. Edits. Paris, France Agricole.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. y Bonhomme, F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Buchanam, F.C., Swarbrick, P.A y Crawford, A.M. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF65 locus. *Animal Genetics* 23(1): 85.

Buchanam, F.C y Crawford, A.M. 1993. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 y OarFCB304 loci. *Animal Genetics* 24(2):145.

Cañón, J., García, D., García-Atance, M.A., Obexer-Ruff, G., Lenstra, J.A., Ajmone-Marsan, P., Dunner, S. y ECONOGENE Consortium. 2006. Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics* (37): 327-334.

Earl, D.A y VonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources* 4(2): 359-361

Ede, A.J., Pierson, C.A y Crawford, A.M. 1995. Ovine microsatellites at the OarCP34, OarCP38, OarCP43, OarCP49, OarCP73, OarCP79 y OarCP99 loci. *Animal Genetics* 26(2): 130-131.

El Mousadik, A y Petit, R.J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa*(L) Skeel) endemic to Morocco. *Theory Applied Genetics* (92):832-839.

Esteban, C. 2003. Razas ganaderas españolas. II. Ovinas. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* (14): 2611-20.

FAO.1992. The management of global animal genetic resources. Proceedings of an Expert Consultation, Rome, Italy, April 1992. *Animal Production and Health Paper 104 (A)* (ed. Hodges, J.). Publ. by FAO, Rome, 309 pp.

FAO, “DAD-IS Domestic Animal Diversity Information System”, <http://dad.fao.org/>, 20/06/2012

Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* (164): 1567-1587.

Federació d'Entitats Catalanes de Ramaders d'Oví i Cabrum, “ Races d'oví i cabrum autòctones a Catalunya”, http://dad.fao.org, 20/06/2012.

Felsenstein, J. 2009. PHYLIP (Phylogenetic inference package) ver. 3.69. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, W.A.

Giovambattista, G., Ripoli, M.V., Peral-Garcia, P y Bouzat, J.L. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Animal Genetics* (32): 240-247.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

González-Candelas, F y Montolio, A.2000. Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentine* (Leguminosae) populations. *Journal of Heredity* (91): 134-141.

Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H., Toro, M.A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Finlay, K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S. y GLOBALDIV Consortium. 2010. Genetic diversity in farm animals- a review. *Animal Genetics* 41(1): 6-31.

Hoffmann, I. 2010. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics* 41(1): 32-46.

Hulme, D.J., Silk, J.P., Redwin, J., Barense, W.R y Beh, K.J. 1994. Ten polymorphic ovine microsatellites. *Animal Genetics* (25): 434-435.

Hulme, D.J., Davies, K.P., Beh, K.J. y Maddox, J.F. 1996. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the McM218, McM150 y McM138 loci. *Animal Genetics* (26):57.

Jordana, J., de Moner, J.M. y Ferrando, A. 2010. Ovella Xisqueta. En: Dossier Tècnic, Núm. 43. pp:21-25. Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural.

Jordana, J., Pons, A., Vicente, A., Cárcel, M.J. y Sierra, I. 2010. Biodiversidad Ovina en la España Mediterránea e Islas Baleares. En: Biodiversidad Ovina Iberoamericana. Caracterización y usos sustentable. pp: 91-114. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L y Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accomodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* (16): 1099-1006

Kimura, M y Crow, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics* (49): 725-738

Langella, O. 1999. POPULATIONS 1.2.31.CNRS UPR9034

Laval, G.M., San Cristobal, M. y Chevalet, C. 2002. Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short-term evolution models. *Genetics Selection Evolution* (34): 481-507.

Lawson-Handley, L.J., Byrne, K., Santucci, F., Townsend, S., Taylor, M., Bruford, M.W y Hewit, G.M. 2007. Genetic structure of european sheep breeds. *Heredity* (99): 620-631.

Lenstra, J.A., Groeneveld, L.F., Eding., H., Kantanen, J., Williams, J.L., Taberlet, P., Nicolazzi, E.L., Sölkner, J., Simianer, H., Ciani, E., García, J.F., Bruford, M.W., Ajmone - Marsan, P y Weigend, S. 2012. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Animal Genetics*. Review Article.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 1980. Raza Ripollesa. En: Catálogo de razas autóctonas españolas: I. Especies ovinas y caprinas. Pp 109-115. Ministerio de Agricultura, Dirección General de la Producción Agraria, Madrid, España.

- Nei, M.1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (70):321-332.
- Nei, M.1974. A new measure of genetic distance. En: *Genetic Distance* (J. F. Crow and C. Denniston, eds.). Pp 63-76. Plenum Press, New York.
- Nei, M., Tajima, R. y Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* (19): 153-170.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Parés, P.M.2008. *Caracterització estructural i racial de la raza ovina Aranesa*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Parés, M.P., Perezgrovas, R y Jordana, J. 2011. Comparison of four European endangered red sheep base don fleece characteristics. *Animal Genetics Resources* (48): 85-91.
- Peter, C., Bruford, M., Perez, T., Dalamitra, S., Hewitt, G., Erhardt, G., y Econogene Consortium. 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* (38): 37-44.
- Page, R.D.M.1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetics trees on personal computers. *Computers Applications in the Biosciences* (12):357-358
- Pritchard J.K., Stephens M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* (155): 945-959.
- Pujol, T.P. 1974. *La Race Rouge du Rousillon*. Paris, Institut Technique de l'Élevage Ovine et caprine (ITOVIC).
- Real Decreto 2129. Boletín oficial del Estado. Número 23. Año 2009. Pp 9211-9240.
- Reynolds, J., Weir, B.S y Cockerham, C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105(3):767-779.
- Sánchez Belda, A. 1976a. Los ovinos de la raza Roja Levantina. *Av. Aliment. Mejora Animal* (4) 3-11.
- Sánchez Belda, A. 1976b. Los ovinos de la raza Roja Mallorquina de cola ancha. *Av. Aliment. Mejora Animal* (1) 3-9.
- Schneider,S., Kueffer, J.M., Roessli, D., y Excoffier, L. 1997. Arlquin ver.1.1: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland*.
- Scott, P.C., Maddox, J.F., Gogolin-Ewens, K.J y Brandon, M.R.1991. *Inmunogenetics* 34(2): 80-87.

- Taberlet, P., Coissac, E., Pansu, J. y Pompanon, F. 2011. Conservation genetics of cattle, sheep and goats. *Comptes Rendus Biologies* (334): 247-254
- Takezaki, N y Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. *Genetics* (144): 389-399.
- Tolone, M., Mastrabgelo, S., Rosa, A.J.M. y Portolano, B. 2012. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research* (102): 18-25
- Toro, A.M., Fernández, J. y Caballero, A. 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science* 120:174-195.
- Vainman, D., Mercier, D., Moazamil-Goudarzi, K., Eggen, A., Ciampolini, R., Lepingle, A., Velmala, R., Kaukinen, J., Varvio, S.L. y Martin, P. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian* 5 (5): 288-297.
- Weir, B.S y Cockerham, C.C. 1984. Estimating F statistics for the analyses of population structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.
- Yeh, F.C y Boyle, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* (129): 157.
- Zimin, A.V., Delcher, A.L., Florea, L., Kelley, D.R., Schatz, M.C., Puiu, D., Hanrahan, F., Perte, G., Van Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Marçais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J.A. y Salzberg, S.L. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology* 10(4): 42.

8. ANEXOS

Tabla 1. Loci microsatélites analizados y secuencias de los *primers* utilizados para su amplificación

Locus	Localización cromosoma	Secuencia (<i>forward</i> y <i>reverse</i>)	Número de acceso en <i>GenBank</i>	Referencia
HSC	20 (ovino)	F: CTGCCAATGCAGAGACACAAGA R: GTCTGTCTCCTGTCTTGTGCATC	M90759	Scott <i>et al.</i> (1991)
INRA49	1(bovino)	F: GTTGTATTAGTTTGTGTTCTTTGGC R:TTG GCT TCCACAATCACACA	X71588	Vainman <i>et al.</i> (1994)
MAF65	15 (ovino)	F:AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG R: CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	M67437	Buchanan <i>et al.</i> (1992)
MAF214	16 (ovino)	F:AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG R:GGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG	L38982	Buchanam y Crawford <i>et al.</i> (1993)
MCM42	9 (ovino)	F:CATCTTTCAAAGAAGTCCGAAAGTG R: CTTGGAATCCTTCTAACTITCGG	L34281	Hulme <i>et al.</i> (1994)
MCM527	5 (ovino)	F: GTCCATTGCCTCAAATCAATTC R: AAACCACTGACTACTCCCAA	L34277	Hulme <i>et al.</i> (1994)
MCM218	4 (ovino)	F: CACTAAAAGCTTATGAAAGTTCCAGC R:GATCCTAGCATCAGTCTCCAGATG	L39828	Hulme <i>et al.</i> (1996)
OARCP49	17(ovino)	F:CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC R: GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG	U15702	Ede <i>et al.</i> (1995)
OARCP20	21(ovino)	F: GATCCCCTGGAGGAGGAAACGG R: GGCATTTTCATGGCTTTAGCAGG	U15695	Ede <i>et al.</i> (1995)
OARCP34	3(ovino)	F:GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG R:GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	U15699	Ede <i>et al.</i> (1995)
OARFCB11	2 (ovino)	F: GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC R:GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC	L01531	Buchanam y Crawford <i>et al.</i> (1993)
TGLA53	16 (bovino)	F: CAGCAGACAGCTGCAAGAGTTAGC R: CTTTCAGAAATAGTTTGCATTCATGCAG	AC_000173 GPC_000000185 (referencia genómica)	Zimin <i>et al.</i> (1999)

Tabla 2. Parámetros de variabilidad genética a nivel de razas

Raza	Número de individuos muestreados	Número observado de alelos (Na)	Número efectivo de alelos	Riqueza alélica (R_t) en base a n = 13 individuos	Heterocigosis observada (H_o)	Heterocigosis esperada (H_e)
Aranesa	94	9,66±3,25	4,70±2,41	6,45±2,01	0,70±0,11	0,73±0,11
Tarasconesa	44	8,08±2,64	4,56±1,94	6,46±1,98	0,74±0,12	0,73±0,12
Xisqueta	97	11,25±3,44	5,16±2,58	7,12±2,10	0,72±0,13	0,76±0,10
Ripollesa	53	8,91±2,90	4,50±1,61	6,30±1,98	0,73±0,12	0,74±0,10
Roja del Rosellón	52	8,91±2,46	4,31±2,08	6,36±1,78	0,74±0,13	0,73±0,08
Castillonesa	24	6,41±2,10	3,69±1,13	5,51±1,53	0,69±0,14	0,70±0,10
Guirra	33	6,25±1,42	3,51±1,16	5,29±1,19	0,66±0,14	0,68±0,11
Lacaune	13	4,25±1,05	2,58±0,65	4,25±1,05	0,75±0,20	0,58±0,11

Tabla 3. Parámetros de variabilidad genética para el conjunto de las razas

Locus	Número observado de alelos	Número efectivo de alelos	PIC	Heterocigosis observada	Heterocigosis esperada de Nei (1973)
MCM42	11	3,60	0,686	0,65	0,72
INRA49	9	2,72	0,598	0,57	0,63
MCM527	10	4,52	0,749	0,72	0,77
TGLA53	11	7,84	0,859	0,80	0,87
MAF65	11	3,98	0,709	0,72	0,74
HSC	17	9,94	0,891	0,85	0,90
OARCP20	12	4,40	0,740	0,75	0,77
OARCP34	10	4,69	0,755	0,75	0,78
OARCP49	24	10,04	0,893	0,82	0,90
OARFCB11	10	4,73	0,757	0,78	0,78
MCM218	13	3,50	0,688	0,67	0,71
MAF 214	15	2,38	0,528	0,50	0,58
Media	12,75	5,19	0,737	0,72	0,76
Desviación estándar	4,22	2,61	0,109	0,10	0,09

Tabla 4. Análisis de variancia molecular (AMOVA) jerárquico, dentro y entre razas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la variancia	Porcentaje de variación	P
Entre razas	7	161,098	0,19009 Va	4,15 %	0,00000
Dentro de razas	812	3567,280	4,39320 Vb	95,85%	0,00000

P<0,0001

Tabla 5. Matriz de distancias genéticas entre pares de razas en base al estimador F_{ST} (θ)

	Aranesa	Tarasconesa	Xisqueta	Ripollesa	Roja del Rosellón	Castillonesa	Guirra	Lacaune
Aranesa	----	0,013	0,013	0,021	0,037	0,037	0,090	0,097*
Tarasconesa	*	----	0,011	0,016	0,040	0,041	0,095	0,103*
Xisqueta	*	*	----	0,011	0,022	0,026	0,084	0,079*
Ripollesa	*	*	*	----	0,037	0,033	0,090	0,108*
Roja del Rosellón	*	*	*	*	----	0,053	0,087	0,114*
Castillonesa	*	*	*	*	*	----	0,109	0,112*
Guirra	*	*	*	*	*	*	----	0,146*
Lacaune	*	*	*	*	*	*	*	----

P<0,05*

Tabla 6. Valores del parámetro f , estadístico análogo a la F_{IS} de Wright, calculado para cada raza ovina estudiada

Locus/Raza	Aranesa	Tarasconesa	Xisqueta	Ripollesa	Roja del Rosellón	Castillonesa	Guirra	Lacaune
MCM42	0,148*	-0,099	0,004	0,092	0,022	0,338*	0,183	-0,121
INRA49	0,093	0,038	0,128*	0,021	-0,025	0,069	-0,086	-0,333
MCM527	0,046	-0,058	0,124*	-0,038	-0,016	0,053	0,077	-0,286
TGLA53	0,036	0,114	0,063	-0,051	-0,018	-0,031	-0,026	-0,077
MAF65	0,052	-0,074	-0,110	0,001	-0,082	0,059	0,072	-0,244
HSC	0,075*	0,057	0,001	0,105	-0,029	-0,021	0,094	-0,339
OARCP20	0,014	-0,045	0,024	-0,037	-0,005	-0,184	0,224*	-0,213
OARCP34	0,085	0,040	0,049	0,001	0,021	-0,004	-0,092	-0,492
OARCP49	0,106**	0,055	0,081**	0,054	-0,043	-0,009	0,081	-0,425
OARFCB11	-0,119	0,024	0,045	-0,040	-0,167	0,017	0,103	0,209
MCM218	0,030	-0,076	-0,019	0,112	0,141*	0,039	0,079	-0,062
MAF 214	0,055	0,065	0,267***	0,102	0,214*	0,121	-0,072	-0,508
Total	0,051**	0,004	0,051**	0,025	-0,005	0,033	0,050*	-0,251

P<0,001*, P<0,01**, P<0,05***

Tabla 7. Valores promedios de la proporción de membresía (Q) del genoma de las razas ovinas originada en los tres grupos considerados, para los genotipos observados, utilizando el modelo Bayesiano. Los valores en negrita indican proporciones mayores al 50%

Razas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Aranesa	0,03	0,76	0,19
Tarasconesa	0,01	0,78	0,20
Xisqueta	0,03	0,30	0,65
Ripollesa	0,05	0,31	0,63
Roja del Rosellón	0,04	0,08	0,87
Castillonesa	0,05	0,41	0,53
Guirra	0,90	0,03	0,06

Tabla 8. Distancia genética de Nei *et al.*, 1983 (D_A) en la diagonal inferior y de Reynolds *et al.*, (1983) en la diagonal superior, para las razas ovinas estudiadas

Razas	Aranesa	Tarasconesa	Xisqueta	Ripollesa	Roja del Rosellón	Castillonesa	Guirra	Lacaune
Aranesa	----	0,013	0,013	0,021	0,038	0,039	0,095	0,102
Tarasconesa	0,058	----	0,011	0,017	0,041	0,043	0,100	0,107
Xisqueta	0,052	0,073	----	0,012	0,022	0,026	0,088	0,083
Ripollesa	0,072	0,090	0,060	----	0,037	0,034	0,094	0,114
Roja del Rosellón	0,116	0,138	0,077	0,110	----	0,055	0,092	0,120
Castillonesa	0,115	0,130	0,099	0,123	0,129	----	0,116	0,117
Guirra	0,181	0,215	0,168	0,169	0,187	0,208	----	0,157
Lacaune	0,229	0,252	0,203	0,241	0,242	0,220	0,253	----

Figura 1. Valor de Delta K para la obtención del número de *clusters* más probable en que se estructuran las razas ovinas en estudio

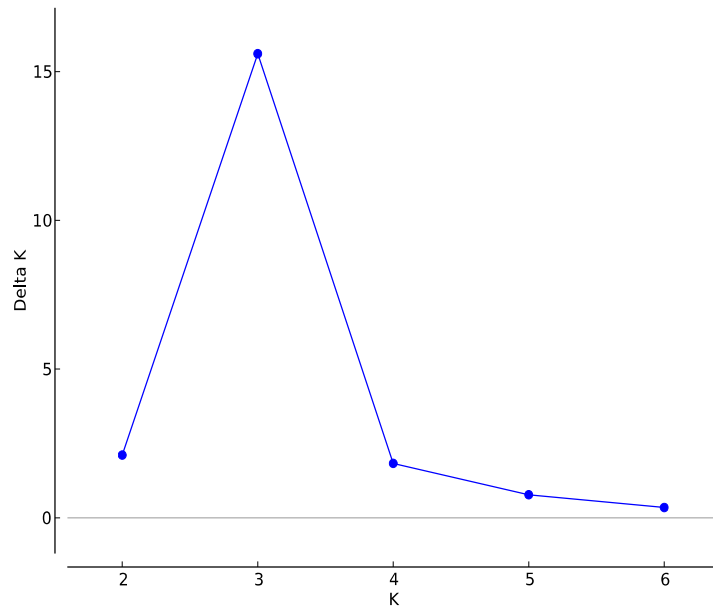
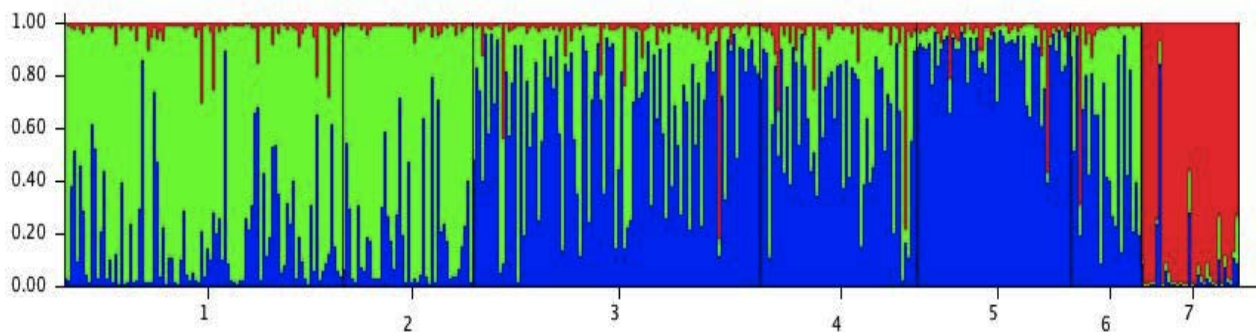


Figura 2. Representación gráfica de las proporciones de membresía (Q) individuales en cada una de las razas ovinas predefinidas



El número de poblaciones predefinidas fue de 7.

1: Aranesa; **2:** Tarasconesa; **3:** Xisqueta; **4:** Ripollesa; **5:** Roja del Rosellón; **6:** Castellonesa; **7:** Guirra

Figura 3. Árbol filogenético enraizado que representa las relaciones genéticas entre las razas estudiadas con la distancia de Reynolds *et al.*, (1983) y con 1000 remuestros del tipo *bootstrap*. La raza Lacaune ha sido utilizada como población *outgroup*

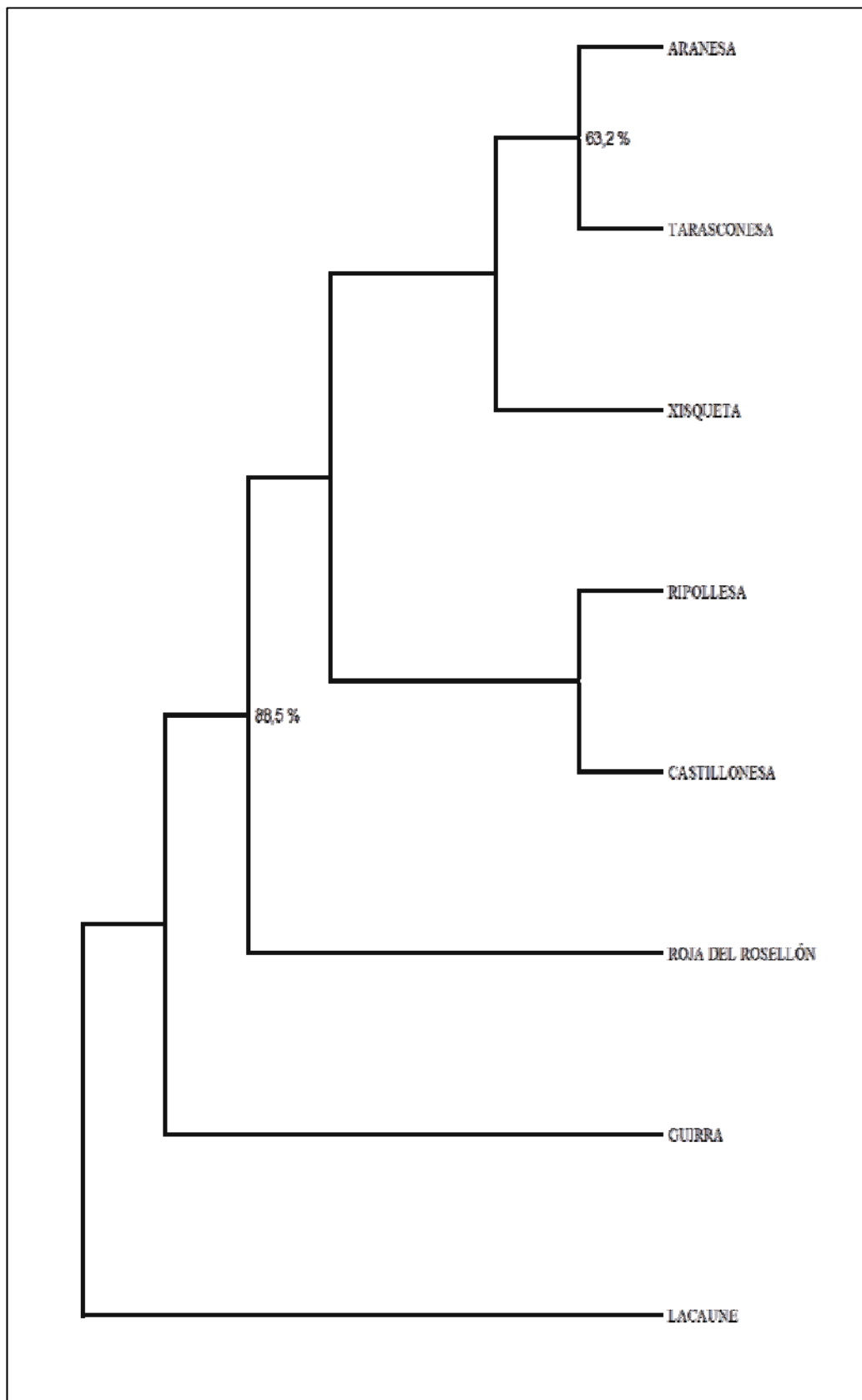


Figura 4. Árbol filogenético enraizado que representa las relaciones genéticas entre las razas estudiadas con la distancia de Nei *et al.*, (1983) y con 1000 remuestros del tipo *bootstrap* sobre los *loci*. La raza Lacaune ha sido utilizada como *outgroup*

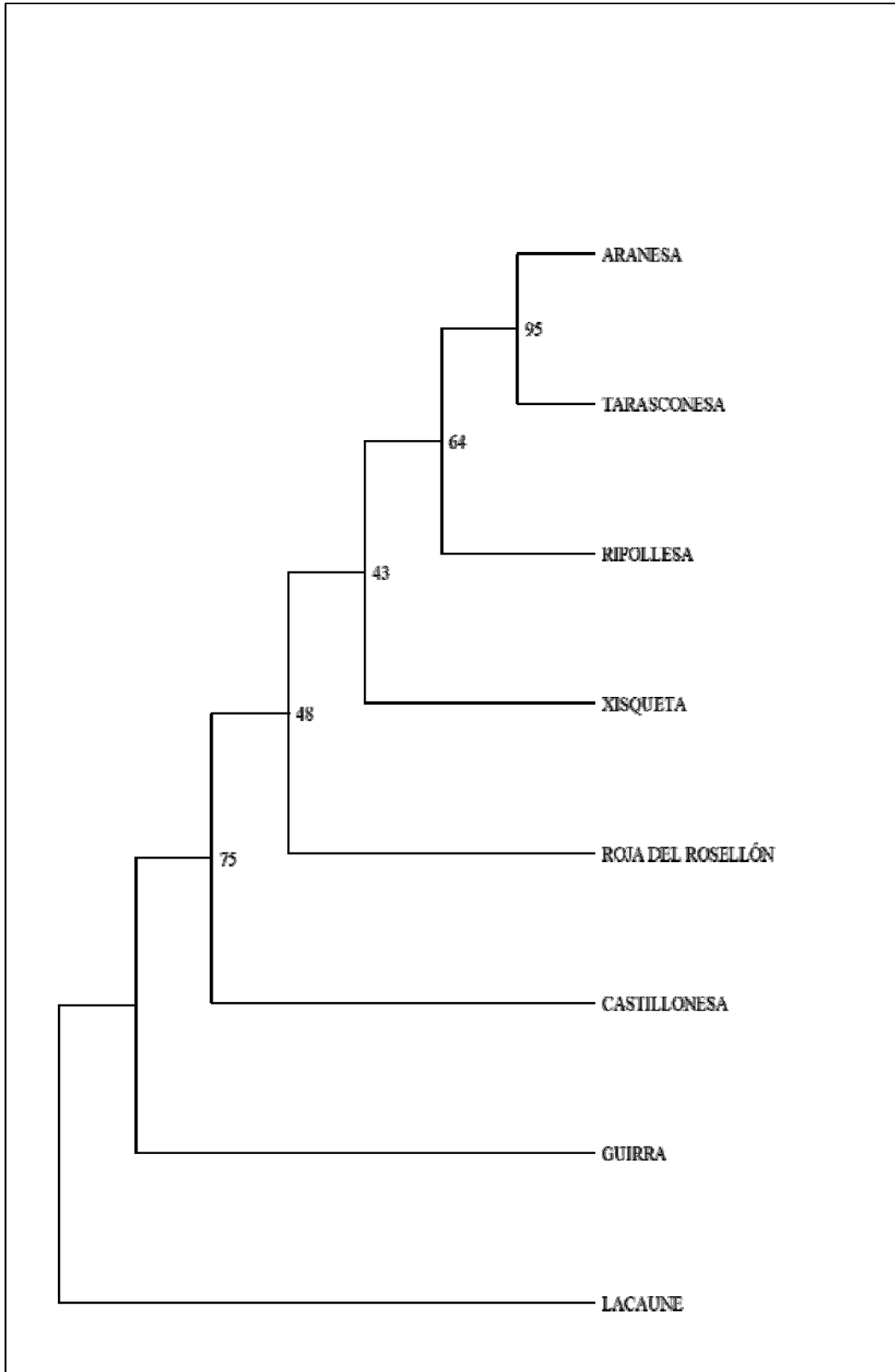
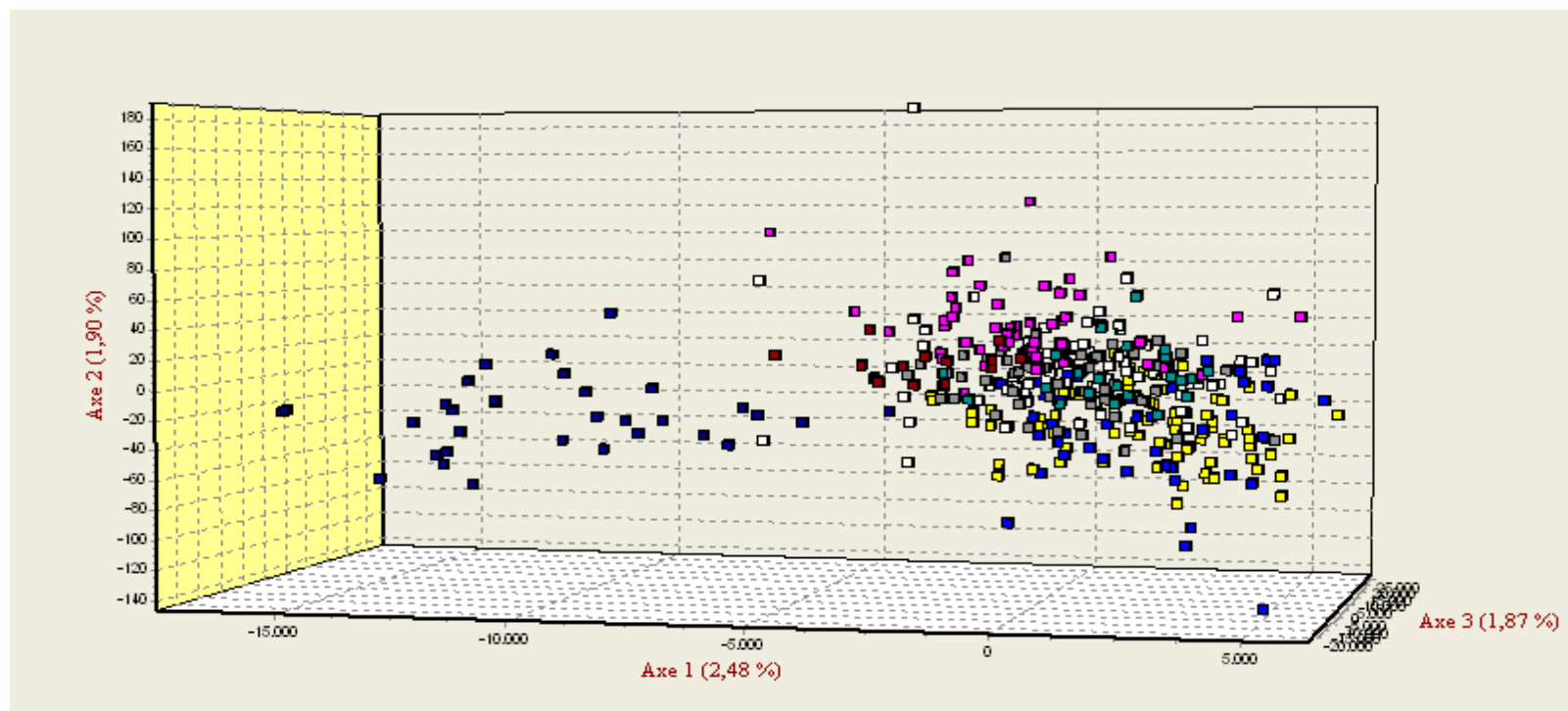










Figura 5. Análisis factorial de correspondencias para las razas ovinas estudiadas



- | | | | | |
|--|---|--|---|---|
|  Aranesa |  Tarasconesa |  Xisqueta |  Ripollesa |  Roja del Rosellón |
|  Castellonesa |  Guirra |  Lacaune | | |