

# DIFERENCIACIÓN ENTRE RAZAS OVINAS AUTÓCTONAS Y FORÁNEAS APLICANDO SECUENCIAS MICROSATÉLITES

## DIFFERENTIATION AMONG SPANISH AND FOREIGN SHEEP USING MICROSATELLITE SEQUENCES

Arranz, J.J., Y. Bayón y F. San Primitivo

Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. España.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Microsatélites. Ganado ovino.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Microsatellites. Sheep.

### RESUMEN

Sobre la base del análisis de secuencias de tipo microsatélite, se ha realizado un estudio de asignación individual, partiendo de dos razas de ganado ovino de interés económico en la Comunidad de Castilla y León (Churra y Castellana) y dos razas foráneas (Awassi y Lacaune). Se han utilizado 18 microsatélites, que se han analizado en un promedio de 45 individuos de cada raza. A partir de las frecuencias génicas obtenidas para las cuatro razas, se han estimado las correspondientes a las poblaciones  $F_1$  procedentes de los cruzamientos entre razas autóctonas y foráneas.

Los resultados obtenidos con los 18 marcadores simultáneamente, demuestran una buena efectividad en la asignación de los individuos procedentes de las razas puras, ya que la asignación a su raza originaria es la correcta en un porcentaje que varía entre el 97,6 p.100 en el caso de la raza Castellana y un 99,98 p.100 si el animal procedía de la Awassi. En el caso de las poblaciones cruzadas, la eficiencia es globalmente menor, tomando como valores extremos 90,3 p.100 en la  $F_1$  Lacaune-Churra y una asignación correcta del 98,6 p.100 para el caso Awassi-Castellana. Por lo que se refiere a la utilidad de cada marcador individual, ésta se mostró muy variable

en función de las frecuencias alélicas en cada una de las razas. En general, los resultados indican que, para obtener una asignación realmente eficiente, el número de marcadores a utilizar debe ser bastante elevado, probablemente cercano a 20. No obstante, en casos muy concretos, donde se sospeche la existencia de cruzamientos específicos y conociendo con anterioridad las frecuencias génicas de los marcadores, se podría diseñar un sistema eficaz con un número menor.

### SUMMARY

On the basis of microsatellite sequences, a study of individual assignment was carried out using two indigenous sheep breeds of economical interest in Castille and León region (Churra and Castellana) and two foreign breeds (Awassi and Lacaune). Eighteen microsatellites were genotyped in 45 individuals from each breed as an average. From the gene frequencies obtained in each breed, the values for  $F_1$  populations between indigenous and foreign sheep were estimated.

The results obtained from all the 18 microsatellites indicate a high effectiveness in the assign-

nation of individuals from pure breeds. The correct assignation rate varies between 97.6 p.100 for Castellana sheep and 99.98 p.100 for Awassis. In the case of  $F_1$  crosses, a lower effectiveness is found as an average, the extreme values being 90.3 p.100 for Lacaune-Churra  $F_1$ , and 98.6 p.100 for Awassi-Castellana  $F_1$ . The usefulness of each marker showed a large variation depending on the gene frequencies obtained in each breed. As a whole the results indicate that to get an efficient assignation, a considerable number of markers (close to twenty *loci*) is necessary. However, in particular cases in which certain crosses are more probable an efficient system may be designed using a lower number of *loci* based on a previous knowledge of gene frequencies.

## INTRODUCCIÓN

Algunas de nuestras razas autóctonas presentan una rentabilidad económica que depende de los procesos de comercialización mediante vías especiales de distribución. Los productos suelen estar protegidos por denominaciones específicas de origen que ofrecen calidades determinadas. El futuro de estas producciones y, como consecuencia, la rentabilidad de los animales autóctonos, implica el mantenimiento de la misma calidad, impidiendo que razas foráneas puedan entrar en el mismo circuito comercial, de forma fraudulenta. En consecuencia, es preciso establecer sistemas objetivos que permitan diferenciar el origen de los distintos animales, llegando, si es posible, a determinar la raza de la que procede un determinado producto.

Por otra parte, las secuencias microsatélites se están utilizando para el control de las genealogías, de forma prácti-

camente generalizada y actualmente la mayoría de las razas autóctonas, sobre todo aquellas que disponen de programa de selección, realizan controles genealógicos basados en secuencias de tipo microsatélite. Estas secuencias, la mayoría con gran número de alelos, podrían permitir asignar a una raza o población determinada, un producto del que pueda aislarse DNA.

Este es el supuesto del que parte el planteamiento aquí resumido, intentando su aplicación al problema del lechazo de Castilla y León, denominación de origen en la que están incluidos lechazos procedentes de las razas Churra, Castellana y Ojalada. Se han elegido muestras de las razas Castellana y Churra, por ser las mayoritarias. Como razas foráneas se han incluido Awassi y Lacaune.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se estudiaron dos razas ovinas autóctonas de interés económico en la comunidad de Castilla y León, como son la raza Churra y la Castellana. Como razas foráneas se incluyeron la Awassi y la Lacaune. El número de animales analizados, siempre que fue posible sin conexión familiar entre ellos, fue el siguiente: Churra (46), Castellana (46), Awassi (42) y Lacaune (45).

### MARCADORES

Se analizaron 18 *loci* microsatélites, localizados en diversos cromosomas. Aquellos situados en el mismo cromosoma presentan entre sí una distancia suficiente, que evita una relación estrecha de ligamiento. Las secuencias mi-

crostatélites analizadas fueron las siguientes (entre paréntesis se indica la localización cromosómica): ADCYC (15), BM1258 (20), BM143 (6), BM4621 (6), BM6444 (2), BMC3224 (21), CSSM66 (9), ILSTS002 (14), MAF33 (9), MAF36 (22), MAF48 (no asignado), MAF64 (1), MAF65 (15), MAF70 (4), OarCP34 (3), OarFCB11 (2), TGLA13 (2) and TGLA53 (12) (Maddox *et al.*, 1996; De Gortari *et al.*, 1998).

### METODOLOGÍA

Se aisló ADN genómico a partir de semen congelado (en los animales de raza Churra) o bien de sangre fresca (en el resto de los casos), mediante digestión con proteinasa K, utilizando el método de extracción *salting out* propuesto por Miller *et al.* (1988). Se amplificaron las secuencias microsatélites, utilizando marcado radiactivo ( $^{32}\text{P}$ ), en un volumen de reacción de 10  $\mu\text{l}$ , a partir de 25 ng de ADN molde. Las condiciones térmicas de amplificación se encuentran detalladas en las referencias bibliográficas indicadas anteriormente. La separación electroforética se realizó sobre geles de acrilamida de secuenciación de tipo estándar. Posteriormente los geles fueron sometidos a autorradiografía. La identificación alélica se llevó a cabo por dos personas distintas de forma independiente, con el fin de contrastar y verificar los resultados.

A partir de los datos suministrados por el análisis de las muestras, se obtuvieron las frecuencias génicas para cada raza y, a partir de éstas se estimaron las frecuencias génicas para las diferentes poblaciones  $F_1$  resultantes de los cruzamientos entre razas foráneas y au-

tóctonas: Awassi-Churra (Aw-Ch), Awassi-Castellana (Aw-Ca), Lacaune-Churra (La-Ch) y Lacaune-Castellana (La-Ca). A partir de estos datos se simularon poblaciones de 10000 individuos y se utilizó un procedimiento de máxima verosimilitud para la asignación de cada uno de los 10000 animales simulados a una de las 8 poblaciones (4 razas puras y 4 cruzamientos). Para ello se siguió la metodología propuesta por De March (comunicación personal), utilizando el programa estadístico SAS.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se indicó anteriormente, el objetivo del presente trabajo se centra en el estudio de las posibilidades que ofrecen los marcadores genéticos de tipo microsatélite para una posible diferenciación entre distintas razas de ganado ovino españolas y foráneas, mediante el análisis de un producto comercial del que pueda extraerse ADN. La utilidad de las secuencias microsatélite en la asignación de individuos a diferentes poblaciones, ha sido puesta de manifiesto por varios autores. En el caso concreto del ganado ovino, se ha analizado este procedimiento tanto para razas puras (Buchanan *et al.*, 1994), como para cruzamientos (Farid *et al.*, 1998).

En la **tabla I** se incluyen los resultados de la asignación individual obtenidos en las pruebas de simulación, referidos a ocho posibles poblaciones, cuatro de ellas razas puras (Churra, Castellana, Awassi y Lacaune) y las cuatro poblaciones  $F_1$  correspondientes a los cruzamientos entre razas autóctonas y foráneas (Aw-Ca, Aw-Ch, La-Ca y La-Ch).

## ARRANZ, BAYÓN Y SAN PRIMITIVO

**Tabla I.** Resultados expresados en porcentaje de la asignación de 10000 individuos a cada una de las razas puras o poblaciones  $F_1$  utilizando los 18 marcadores. (Results in percentage of the assignment of 10000 individuals to each of the pure breeds or  $F_1$  crosses).

Población identificada	Población de origen							
	Awassi	Castellana	Churra	Lacaune	Aw-Ca	Aw-Ch	La-Ca	La-Ch
Awassi	99,98	0	0	0	0,11	0	0	0
Castellana	0	97,58	0	0	0,75	3,64	0,60	0
Churra	0	0	97,97	0	0	1,24	0,02	2,80
Lacaune	0	0	0	97,88	0,01	0	1,61	4,57
Aw-Ca	0,02	0,66	0,01	0	98,57	0,48	0,29	0,01
Aw-Ch	0	1,51	0,65	0	0,42	91,57	3,57	0,58
La-Ca	0	0,25	0,03	0,39	0,12	2,27	90,66	1,74
La-Ch	0	0	1,34	1,73	0,02	0,80	3,25	90,30

Los valores obtenidos para la asignación a razas puras, utilizando los 18 marcadores genéticos en conjunto, fueron los siguientes: 97,58 p.100 (Castellana), 97,88 p.100 (Lacaune), 97,97 p.100 (Churra) y 99,98 p.100 (Awassi). Estos datos indican una elevada eficiencia en la diferenciación racial en todos los casos analizados, particularmente destacable para la raza Awassi. Estudios anteriores en los que se estimaron, mediante microsatélites, las distancias genéticas entre varias razas ovinas autóctonas españolas y la Awassi, ya indicaban una clara separación filogenética de esta oveja respecto a aquellas (Arranz *et al.*, 1998), lo que concuerda con los resultados que aquí se presentan.

En el caso de las poblaciones resultantes de los cruzamientos, la eficiencia resulta ser inferior, aunque también alcanza valores destacables. Los porcentajes de asignación correcta fueron: 90,30 p.100 (La-Ch), 90,66

p.100 (La-Ca), 91,57 p.100 (Aw-Ch) y 98,57 p.100 (Aw-Ca). De nuevo, la asignación resultó más eficaz en los cruzamientos en los que se encontraba implicada la raza Awassi.

Estos datos sugieren que un número de secuencias microsatélite próximo a 20 puede ser suficiente para permitir una diferenciación entre poblaciones ovinas españolas y foráneas, así como de sus cruzamientos  $F_1$ , con un considerable nivel de eficacia. La elevada variabilidad que presentan generalmente este tipo de *loci* permite lograr estos resultados. Así, los valores de heterocigosis media estimados sobre 19 *loci* microsatélite en varias razas ovinas españolas ha resultado ser superior ser a 0,7 (Arranz *et al.*, 1998).

Un aspecto interesante es el análisis de la variabilidad entre marcadores, por lo que se refiere a su eficiencia en la diferenciación entre poblaciones. En la **tabla II** se muestran resultados que corresponden de forma individual a ca-

## DIFERENCIACIÓN ENTRE RAZAS OVINAS AUTÓCTONAS Y FORÁNEAS

**Tabla II.** Resultados de cada marcador en la asignación de 10000 individuos a cada una de las razas puras. Sólo se incluye el porcentaje correspondiente a la asignación de la población correcta. (Results at each marker for the assignment of 10000 individuals to each of the pure breeds. Only the percentage of the assignment to the correct population is indicated).

	ADCYC	BM1258	BM143	BM4621	BM6444	BMC3224	CSSM66	ILSTS002	MAF33
Awassi	55,3	100	79,1	94,5	92,2	58,1	88,1	95,6	84,6
Castellana	62,5	56,4	73,9	42,9	56,5	42,6	46,4	87,5	83,2
Churra	11,4	24,2	68,4	69,2	69,2	79,8	58,6	89,1	59,3
Lacaune	34,7	36,4	45,1	79,7	58,7	41,6	68,1	69,5	54,6

  

	MAF36	MAF48	MAF64	MAF65	MAF70	OarCP34	OarFCB11	TGLA13	TGLA53
Awassi	77,7	94,7	74,8	30,7	94,8	45,1	67,4	84,1	81,0
Castellana	55,1	29,9	71,5	44,1	66,1	55,4	91,7	76,5	58,8
Churra	50,0	44,7	32,6	56,3	25,4	51,8	53,8	54,6	62,1
Lacaune	56,6	24,1	53,7	39,9	78,3	48,7	65,9	60,9	63,0

da uno de los 18 microsatélites utilizados, considerando sólo las razas puras. Con objeto de simplificar la presentación de estos datos, únicamente aparecen reflejados los porcentajes en los que la asignación correspondió a la población correcta.

Al analizar el rango de variación obtenido para cada raza, en los porcentajes de asignación correcta, los datos obtenidos fueron: 30,7 p.100-100 p.100 (Awassi), 29,9 p.100-91,7 p.100 (Castellana), 11,4 p.100-89,1 p.100 (Churra) y 24,1 p.100-79,7 p.100 (Lacaune). Los valores más elevados corresponden a la raza Awassi, en la cual, en el caso más favorable, un solo marcador (BM1258) fue capaz de realizar una diferenciación correcta de las otras tres razas en el 100 p.100 de los 10000 individuos simulados. En el extremo opuesto podemos citar el *locus* (ADCYC) en la raza Churra, que permitió una asignación

correcta únicamente en el 11,4 p.100 de los casos.

El análisis de la eficiencia de cada marcador resulta complejo. Podemos destacar como microsatélites más interesantes para la diferenciación entre las cuatro razas puras, las secuencias BM6444, ILSTS002, MAF33, MAF36, OarFCB11, TGLA13 y TGLA53. Los porcentajes de asignación correcta que determinaron, fueron en todas las razas superiores al 50 p.100 y llegaron a alcanzar cifras superiores al 95 p.100.

Otro aspecto a considerar es la variación de su eficacia entre razas. Por una parte podemos señalar algunos marcadores con una gran variabilidad en este aspecto, como por ejemplo los *loci* BM1258, MAF48 y MAF70, con valores mínimos próximos al 25 p.100 de asignaciones correctas y valores máximos superiores al 90 p.100. Otro grupo son aquellos con resultados incluidos en un estrecho margen entre el

40 p.100 y el 50 p.100 de asignación correcta en todos los casos (*loci* BMC3224 y OarCP34).

En líneas generales, podemos indicar que existe un elevado grado de variación, por lo que respecta a la utilidad de cada *locus* microsatélite en la diferenciación entre poblaciones, dependiendo de las frecuencias génicas de cada caso específico. En función de estos datos, realizamos dos simulaciones independientes, por una parte para la diferenciación de las razas Churra, Awassi y su F<sub>1</sub>, y por otro lado para las razas Churra, Lacaune y su F<sub>1</sub>. En dichas simulaciones se incluyeron solamente nueve marcadores, que fueron seleccionados de entre los 18 microsatélites, de forma independiente para cada una de las dos simulaciones.

Los resultados obtenidos se incluyen en la **tabla III**. Por lo que se refiere al caso de las poblaciones Awassi, Churra y Aw-Ch, los porcentajes de asigna-

ción obtenidos utilizando sólo nueve marcadores resultaron ser, incluso superiores a los citados anteriormente para el total de los 18 marcadores en el conjunto de las 8 poblaciones. Por el contrario, la diferenciación entre Churra, Lacaune y Ch-La alcanzó niveles inferiores a los correspondientes al caso conjunto, detectándose una clara pérdida de eficiencia al reducir el número de marcadores.

De esta forma, el número de marcadores (próximo a 20) utilizado en el presente trabajo para el análisis global, podría verse reducido considerablemente sin que se resienta la eficacia del método, si se dispone de información previa acerca de las razas más probables implicadas en los productos objeto de investigación, así como de las frecuencias génicas de los marcadores en cada una de ellas. En función de las diferencias detectadas entre las poblaciones problema, puede resultar o no interesante utilizar un

**Tabla III.** Porcentaje de asignación utilizando nueve marcadores, para los casos Awassi, Churra, Aw-Ch y Lacaune, Churra, La-Ch. (Percentage of the assignment using nine markers for the cases Awassi, Churra, Aw-Ch y Lacaune, Churra, La-Ch).

Población identificada	Población de origen		
	Awassi	Churra	Aw-Ch
Awassi	100	0	0
Churra	0	98,38	5,23
Aw-Ch	0	1,62	94,77
	Lacaune	Churra	La-Ch
Lacaune	95,06	0,01	11,80
Churra	0,03	96,26	7,50
La-Ch	4,91	3,73	8,70

número de marcadores más o menos elevado.

En cualquier caso, este método no presenta una fiabilidad absoluta en la asignación de un individuo o un producto comercial determinado, a una raza o cruzamiento concreto. No obstante, hemos de considerar que en el supuesto práctico que planteamos, dicha fiabilidad alcanzaría valores más elevados, incluso próximos al 100 p.100, si el problema se plantea, no para muestras individuales, sino para lotes uniformes de productos (por ejem-

plo lechazos), en cuyo caso la probabilidad estadística conjunta sería considerablemente más elevada. Esta posibilidad permitiría, además, reducir el número de marcadores a analizar y en consecuencia, reducir el coste económico de la prueba.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con financiación del proyecto CICYT AGF96-0819-CP.

### BIBLIOGRAFÍA

- Arranz, J.J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim. Genet.*, 29: 435-440.
- Buchanan, F.C., L.J. Adams, R.P. Littlejohn, J.F. Maddox and A.M. Crawford. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 22: 394-403.
- De Gortari, M.J., B.A. Freking, R.P. Cuthbertson, S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, K.A. Leymaster, K.G. Dodds, A.M. Crawford and C.W. Beattie. 1998. A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mam. Genome*, 9: 204-209.
- Farid, A., A. Almudevar, C. Dollard and E. O'Reilly. 1998. Classification of crossbred animals using microsatellites. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. 24: 208-211.
- Maddox, J.F., K.P. Davies, R. Cuthbertson, D.J. Hulme, H. Henry, R.J. Hawken, R. Drinkwater, K.G. Dodds, and A.M. Crawford. 1996. Updating the sheep linkage map. *Anim. Genet.*, 27: 85-86.
- Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 161: 1215.