

## Trabajo Fin de Grado

Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural  
Explotaciones Agropecuarias

Estudio de la relación del gen *CYP7B1* con el peso al  
nacimiento y crecimiento de corderos de Rasa  
Aragonesa y Roya Bilbilitana

Study of the relation of the *CYP7B1* gene with the  
birth weight and growth in Rasa Aragonesa and Roya  
Bilbilitana lambs

Autora

Raquel Izquierdo Campos

Director

Jorge Hugo Calvo Lacosta

Ponente

Jesús Luis Yániz Pérez de Albéniz

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR  
2025



## AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quiero dar las gracias al personal del laboratorio de biología molecular animal del Departamento de Ciencia Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) por el buen trato, el conocimiento transmitido y la ayuda recibida siempre que la he necesitado. Y, en particular, a Pilar por guiarme paso a paso.

A Jorge Calvo y a Jesús Yániz por el tiempo y el esfuerzo dedicados. Gracias por todo.

A mi familia y amigos por estar siempre, aconsejarme y apoyarme. Gracias de corazón. Y, de manera especial, a mi hermana Estela y a mis padres Fabián e Isabel por el cariño, la paciencia, el sacrificio y el apoyo constante en esta etapa, que ha resultado más larga de lo habitual.

Como escribe María Sánchez en *Tierra de mujeres: Una mirada íntima y familiar al mundo rural* (2019): “No todo el mundo puede volver a un trocito de tierra y doblarse la falda para recoger los alimentos del huerto”, y para mí ese trocito de tierra guarda todo lo que me han enseñado mis padres. Gracias, papá y mamá por enseñarme las veredas, el perol de sopas, las patatas jutas y la harinosa; a despedregar y escardar bancales, sembrar trigo y dallar mielgas; a hacer gavillas, recoger pipirigallo y escorquitar judías; a sacar ciemo y limpiar los gamellones; a postear en el trajón, salar los jamones, sacar la binza y preparar la tina de las güeñas, a hacer leña y tedas, y a triar ovejas y ahijar corderos.



## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO FIN DE GRADO**

Yo, Raquel Izquierdo Campos, con documento de identificación 18462620Z, y estudiante del Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural de la Escuela Politécnica Superior de Huesca de la Universidad de Zaragoza, en relación con el Trabajo Fin de Grado presentado para su defensa y evaluación en el curso 2024/2025, declara que asume la originalidad de dicho trabajo, entendida en el sentido de que no ha utilizado fuentes sin citarlas debidamente.

Huesca, a 28 de agosto de 2025

Fdo.: Raquel Izquierdo Campos 18462620Z



## RESUMEN

Este trabajo analiza la relación entre un polimorfismo en la región promotora del gen *CYP7B1* (SNP (-63)) y dos caracteres de crecimiento en corderos de las razas Rasa Aragonesa (n=579) y Roya Bilbilitana (n=397): el peso al nacimiento (PN) y la ganancia media (GM) hasta el destete.

Se genotipó el SNP mediante la técnica KASP y se evaluaron las asociaciones con modelos lineales en R, considerando como factores fijos el sexo, tipo de parto, mes de paridera y genotipo, y como covariables la edad de la madre y, en GM, los días de lactación.

Los resultados mostraron que el polimorfismo estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg y con frecuencias similares en ambas razas. No se encontraron asociaciones significativas con PN ni con GM. En cambio, factores como el sexo, el tipo de parto y, en Roya Bilbilitana, los días de lactación, explicaron gran parte de la variación. Por ejemplo, los machos y los corderos de partos simples presentaron mayores pesos y ganancias.

Se concluye que, aunque el SNP (-63) no tuvo efectos detectables en este estudio, podría seguir siendo un candidato de interés en futuros trabajos con mayor tamaño muestral, ya que los caracteres de crecimiento son poligénicos y complejos.

**Palabras clave:** polimorfismo, ovino, crecimiento, genotipado, asociación

## **ABSTRACT**

This study analyzes the relationship between a polymorphism in the promoter region of the CYP7B1 gene (SNP (-63)) and two growth traits in lambs of the Rasa Aragonesa (n=579) and Roya Bilbilitana (n=397) breeds: birth weight (BW) and average daily gain (ADG) until weaning.

The SNP was genotyped using the KASP technique, and associations were evaluated through linear models in R, considering sex, type of birth, lambing month, and genotype as fixed factors, and maternal age and, in the case of ADG, lactation days as covariates.

The results showed that the polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium and had similar frequencies in both breeds. No significant associations were found with BW or ADG. On the other hand, factors such as sex, type of birth, and, in Roya Bilbilitana, lactation days, explained a large proportion of the variation. For example, males and lambs from single births presented higher weights and gains.

It is concluded that, although SNP (-63) showed no detectable effects in this study, it may still be a candidate of interest in future research with larger sample sizes, since growth traits are polygenic and complex.

**Keywords:** polymorphism, sheep, growth, genotyping, association





# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sector ovino de carne en España .....	1
1.2. Raza Rasa Aragonesa.....	5
1.3. Raza Roya Bilbilitana.....	8
1.4. Base genética de los caracteres de crecimiento en ovino.....	10
1.5. Búsqueda de variantes génicas asociadas a fenotipos de interés .....	11
1.6. Análisis GWAS de caracteres relacionados con el crecimiento en Rasa Aragonesa.....	15
1.7. CYP7B1.....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1. Material animal y fenotipos .....	19
3.2. Extracción de ADN y genotipado mediante PCR competitiva alelo-específica (KASP: Kompetitive Allele Specific PCR).....	20
3.3. Análisis estadístico de asociación.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
4.1. Rasa Aragonesa .....	28
4.2. Roya Bilbilitana.....	31
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA .....	35



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sector ovino de carne en España

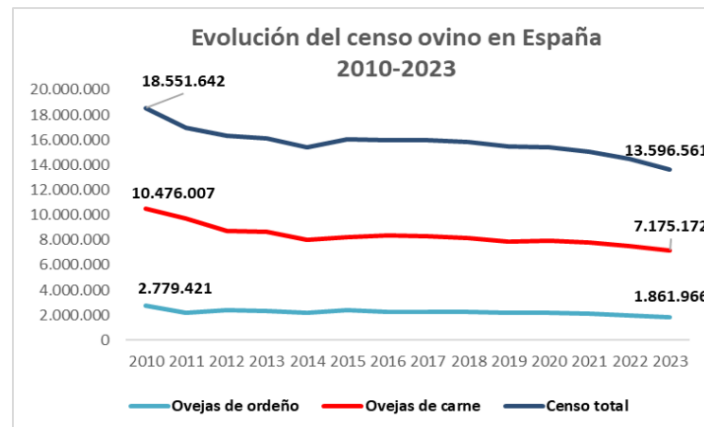
En España, la ganadería ovina posee una arraigada tradición y desempeña un papel relevante desde el punto de vista económico, social y ambiental (Bernués, Rodríguez-Ortega, Collado, Casasús, y Olaizola, 2018). Este tipo de ganado destaca por su capacidad para aprovechar de manera eficiente los pastos en zonas áridas y semiáridas (Zygyiannis, 2006), generando bienes públicos vinculados al pastoreo. Entre estos beneficios se incluyen la conservación del suelo, el aumento de su contenido en materia orgánica, la preservación de la biodiversidad y la prevención de incendios, lo que en conjunto contribuye a mitigar los procesos erosivos y a favorecer el equilibrio ecológico (Gabiña, 2006; Interovic, 2006; Pardos, Lahoz, Bernués, Alabart, y Fantova, 2022).

Asimismo, la capacidad del ovino para utilizar recursos pastables en áreas marginales, junto con el empleo de mano de obra mayoritariamente familiar y localizada fuera de los grandes núcleos urbanos, favorece el asentamiento de la población en el medio rural. De este modo, la ganadería ovina contribuye a frenar el despoblamiento en las zonas más desfavorecidas, constituyendo una alternativa laboral sostenible en estos territorios.

Los sectores ovino y caprino dentro del sistema de producción ganadera de España son de especial importancia, representando un 12% de la Producción Final Ganadera (PFG) (Bravo, Iglesias, y Palomo, 2020). Además, la producción total del sector de pequeños rumiantes se sitúa en el quinto lugar en importancia económica con respecto a la PFG. En lo que respecta exclusivamente a la producción de carne de ovino y caprino, esta supone el 1,8% de la Producción Final Agraria (PFA) y el 4,2% de la PFG (MAPA, 2023).

Según datos del MAPA (2023) y tal y como se muestra en la Figura 1, entre 2006 y 2014 el censo total ovino pasó de 22,4 millones de cabezas de ganado a 15,4, estabilizándose hasta el año 2018. A partir del 2019 se vuelve a la tendencia descendente hasta llegar a los 13,6 millones de cabezas en 2023, un 5,9% menos con respecto al año anterior. En 2024, el censo ovino registró 13,54 millones de cabezas, un -0,89 % respecto al año anterior, lo que supone una caída acumulada de más de 2 millones desde 2020. En cuanto al censo de ovino de carne el número de cabezas pasó de 10,5 millones en 2010 a 7,2 en 2023. El 79% de las hembras reproductoras en dicho año eran de aptitud cárnica distribuyéndose principalmente

en Extremadura (29%), Andalucía (16%), Castilla y León y Aragón (12%), y Castilla La Mancha (11%). Andalucía fue la única región en crecimiento en 2024, con un +9,06 %, alcanzando casi 2 millones de animales.



**Figura 1.** Evolución del censo ovino en España desde el 2010 al 2023 (en millones).

Fuente: MAPA (2023).

En cuanto al número de explotaciones, en España se computaron 111.204 explotaciones ovinas en 2023, abarcando sistemas de producción de cebo, leche, carne y producción mixta. De ellas, un 80% destinan su actividad a la producción de carne, mientras que un 8% son de producción mixta, combinando la producción de carne y leche. Estas explotaciones dedicadas al sector cárnico se localizan principalmente en Galicia y Extremadura (20%), Andalucía (16%) Castilla y León y País Vasco (7%) (MAPA, 2023).

De estos datos, y los anteriores, cabe destacar los casos de Galicia y Aragón. En Galicia, aunque existe un elevado número de explotaciones ovinas, muy pocas superan las 250 cabezas (Ansia et al., 2008). Sin embargo, en Aragón, aunque el número de explotaciones es menor, estas cuentan con un mayor número de animales, lo que evidencia un sector más profesionalizado (Rodríguez, Martín, Casasús, Olaizola, y Bernués, 2018).

De acuerdo con el MAPA, en 2023 se sacrificaron algo más de 7.450.000 corderos, es decir, un 89% del total de ovinos. El 32% de estos eran recentales (10,1-13 kg de canal), un 31% de corderos pascuales (>13 kg), un 22% eran corderos lechales (<7 kg) y, por último, un 13% correspondieron a corderos ligeros (7,1-10 kg). En los cuatro casos la producción disminuyó con respecto al año anterior oscilando entre 2,5 y un 14,7%. Aragón, Cataluña y Castilla La Mancha fueron las comunidades que más corderos de entre 10 y 13 kg produjeron. Por otro

lado, en Castilla y León, Navarra y Castilla La Mancha se sacrificaron la mayor cantidad de corderos lechales. La Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Ternasco de Aragón” es la que mayores datos de producción obtuvo, siendo esta IGP a la que pertenecen las razas del presente estudio: Rasa Aragonesa y Roya Bilbilitana. El Ternasco de Aragón se sacrifica con menos de 90 días de vida, y su peso de canal oscila entre 8 y 12,5 kilogramos. Este tipo de carne procede exclusivamente de razas autóctonas aragonesas (Rasa Aragonesa, Roya Bilbilitana, Ojinegra de Teruel, Maellana y Ansotana) y se cría en explotaciones ubicadas en Aragón. Los animales son alimentados inicialmente con leche materna y, posteriormente, con piensos naturales autorizados, lo que contribuye a una carne de alta calidad, muy valorada en el mercado nacional por su ternura, jugosidad y sabor característico.

Sin embargo, el consumo de carne de ovino en España es relativamente bajo y ha mostrado una tendencia descendente en los últimos años, a pesar de que el país se sitúa como el segundo mayor productor de la Unión Europea (Garnier, 2010). Además, el consumo de esta carne se asocia con ocasiones especiales, como festividades navideñas, celebraciones regionales, actos religiosos o eventos familiares. La escasa demanda interna se ve parcialmente compensada por las exportaciones, siendo principalmente hacia la Unión Europea y, en el caso de animales vivos, a terceros países como Marruecos, Jordania y Libia (MAPA, 2023).

Aragón muestra también una tendencia descendente del censo ovino como el resto de España, debido a motivos similares tales como el envejecimiento de los ganaderos, la escasez de relevo generacional, la falta de innovación en las ganaderías, la disminución del consumo de carne de ovino, y la disminución de la rentabilidad económica de las explotaciones. Este último factor ha llevado a muchos ganaderos a abandonar la actividad debido al incremento de los costes de alimentación (precio de los cereales) y del combustible, así como a otros problemas como son encontrar mano de obra, o la menor disponibilidad de pastos por la intensificación de la agricultura. Tal como se ha señalado previamente, la relevancia del sector ovino de carne trasciende el ámbito económico. Su capacidad para aprovechar recursos pastables en zonas marginales, junto con la generación de empleo vinculado a explotaciones familiares ubicadas fuera de los grandes núcleos urbanos, contribuye de manera significativa al asentamiento de la población en áreas rurales y a la lucha contra el despoblamiento en las regiones más desfavorecidas (Bravo et al., 2020). En este contexto, el sector representa una oportunidad para ofrecer alternativas laborales sostenibles en territorios con dificultades socioeconómicas, especialmente mediante el uso y valorización de

razas autóctonas como la Rasa Aragonesa y la Roya Bilbilitana. Estas razas constituyen no solo un recurso productivo adaptado al entorno, sino también un valioso patrimonio genético y cultural que merece ser preservado y potenciado.

En este sentido, resulta necesario implementar tecnologías innovadoras que permitan la mejora de la eficiencia productiva de las explotaciones para garantizar su sostenibilidad. Esta sostenibilidad debe basarse en un equilibrio entre el bienestar social, la protección del medio ambiente y el crecimiento económico. Este crecimiento no puede medirse únicamente por la producción de corderos o los kilos de carne vendidos por oveja, ya que está condicionado por las tendencias de consumo previamente mencionadas (Ancín, y Lana, 2018).

Las tecnologías innovadoras incluyen herramientas basadas en la información genética, que permiten la preselección de los reproductores más eficientes. No obstante, su aplicación resulta verdaderamente eficaz cuando se enmarca en esquemas de selección genética, que garantizan la recogida sistemática de datos, la evaluación objetiva de los caracteres de interés y la mejora progresiva de los parámetros productivos y reproductivos. En este contexto, la incorporación de la información genética (como los valores genéticos estimados o la presencia de variantes favorables) representa un avance clave para acelerar el progreso genético y mejorar la sostenibilidad y competitividad del sector. Por ejemplo, el conocimiento de marcadores genéticos asociados con la resistencia al estrés ambiental y la resiliencia ayudaría a conseguir animales con una mejor capacidad de gestión de sus reservas corporales y a enfrentarse a los estreses ambientales.

Unos fenotipos ampliamente estudiados son los relacionados con el crecimiento en los corderos como el peso al nacimiento (PN) y la ganancia media diaria (GMD), o la condición corporal (CC) y el peso vivo (PV) en ovejas adultas relacionadas con sus reservas corporales, las cuales influyen en aspectos importantes de la producción y la reproducción, afectando a su vez a la rentabilidad de las explotaciones. (Lakhssassi, Meneses, Sarto, Serrano, y Calvo, 2023).

Se ha demostrado la existencia de variabilidad de la CC y el PV dentro de un rebaño, es decir esta variabilidad será debida a la genética del individuo. Adicionalmente, la CC interviene de manera importante en la fertilidad y en la tasa de crecimiento (TC) de la descendencia (Macé et al., 2019). Asimismo, se ha visto que las ovejas con poca CC pueden tener un rendimiento reproductivo menor que las que tengan una CC más elevada, afectando en la rentabilidad final de las

explotaciones (Young et al., 2010). En este sentido, el número de corderos destetados por oveja, en la raza Mashamewe, se ha correlacionado de forma positiva con la CC cuando se produce la monta (Kenyon et al., 2014). También en el trabajo de Kenyon et al. (2014) se observó que la CC influye en la respuesta a las señales estacionales de las ovejas, es decir, una CC baja se relacionaría con un anestro estacional más largo. En cuanto al PV, es importante en el momento de la cubrición, ya que influye posteriormente en el tamaño de la camada (Paganoni et al., 2022).

De la misma manera, la CC y el PV se ven influenciados por la edad al primer parto, el tamaño de la camada y el número de partos en ovejas de la raza Romane, (Macé et al., 2019). El PN de los corderos es una variable económica muy importante, puesto que se relaciona de forma positiva con su supervivencia y crecimiento. Esta variable depende de la edad de la madre, el sexo, el tipo de parto (simples o múltiples), el tipo genético, la época de parto, la alimentación, manejo y estado sanitario de la madre. Igualmente, la GMD influye directamente en la productividad al destete, siendo una variable de elevado interés económico en ovino de carne. El crecimiento de los corderos y el PN dependen de múltiples factores entre los que se incluyen la CC de la madre al parto, la alimentación y producción lechera de la madre, la alimentación del cordero, el estado sanitario y manejo de ambos, así como las condiciones ambientales (Forero, Venegas, Alcalde, y Daza, 2017).

En este estudio se ha estudiado la implicación del gen *CYP7B1* en la base genética de los caracteres de crecimiento de corderos de las razas Rasa Aragonesa y Roya Bilbilitana.

## **1.2. Raza Rasa Aragonesa**

Una parte de este trabajo se ha llevado a cabo con corderos de la raza de aptitud cárnica Rasa Aragonesa. Tal y como expone el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (2023), esta se incluye en el Grupo de Razas Autóctonas de Fomento. Atendiendo a la Real Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (RFEAGAS, 2023), la distribución geográfica de la Rasa Aragonesa comprende la mayor parte de Aragón, el sur de Álava, este de Logroño, Soria y Guadalajara, oeste de Lérida, noroeste de Castellón y gran parte de la provincia de Tarragona. Las características de la raza se pueden encontrar en la base de datos ARCA perteneciente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:



<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/rasa-aragonesa>

Se trata de una raza rústica, adaptada al aprovechamiento de pastos en zonas con bajas precipitaciones y temperaturas extremas. Las explotaciones se caracterizan por un sistema de producción semiextensivo. Aprovechan vegetación espontánea, cultivos forrajeros y rastros además de, en la época de cría, piensos concentrados y forrajes mientras están estabuladas. Además, se realizan trasterminancias hacia zonas de alta montaña y, en casos aislados, trashumancias. En España hay un total de 268.380 cabezas, perteneciendo 263.120 a la comunidad autónoma de Aragón (MAPA, 2023).

En resumen, la Rasa Aragonesa presenta características reproductivas y de movilización de reservas lipídicas que le permiten adaptarse y ser explotada en entornos climática y nutricionalmente adversos. Esta rusticidad la hace apta para distintos grados de extensificación, manteniendo buenos niveles productivos (Folch y Alabart, 2000). No obstante, se trata de una raza con una prolificidad relativamente baja, con una media de 1,37 corderos por oveja y parto (Jiménez y Serrano, 2024).

La Asociación Nacional de Criadores de Ovino de Raza Rasa Aragonesa (ANGRA) y la Unión de Productores de Raza Aragonesa (UPRA)-Grupo Pastores, son las entidades responsables del Programa de Cría y Mejora Genética de la raza. Análisis técnico-económicos llevados a cabo en una muestra de explotaciones de Rasa Aragonesa controladas por la UPRA han demostrado que uno de los factores que más intervienen en la sostenibilidad económica de las explotaciones es el número de corderos vendidos por oveja y año (Pardos et al., 2008). Por ello, en 1994 se puso en marcha un Programa de Mejora Genética basado en el control de rendimientos productivos y genealógicos para incrementar su prolificidad. Además, la última Función de Beneficio (GTE 2012-2016), calculada con una muestra constante de ganaderías que recoge los estudios de gestión técnico económica para este caso actualizados quinquenalmente y llevados a cabo por la Escuela Universitaria Politécnica de Huesca (Universidad de Zaragoza) en colaboración con Oviaragon desde 1994, vuelve a demostrar que la prolificidad sigue siendo uno de los factores que más influye en la rentabilidad de las ganaderías de raza Rasa Aragonesa en sus condiciones habituales de producción. La mejora de un 1% de la prolificidad repercute en la mejora de un 3, 8% en el margen bruto por oveja y por UTH de la ganadería. En el marco de este programa, en 2007 se identificó en esta raza la presencia del alelo de hiperprolificidad *FecX<sup>R</sup>* (ROA) en el gen *BMP15*, localizado en el cromosoma X (Martínez-Royo et al., 2008). Más recientemente, un

estudio de asociación del genoma completo (GWAS) permitió identificar nuevas variantes génicas asociadas a la prolificidad: el alelo prolífico *FecX<sup>Gr</sup>* (*Grivette*) y un nuevo alelo denominado *FecX<sup>RA</sup>*, también localizado en el gen *BMP15* (Calvo et al., 2020a). Actualmente, estos alelos se emplean en programas de selección asistida por marcadores (SAM), mediante la preselección de reproductores en función de su genotipo para estas variantes. En el marco del programa de mejora genética de la Rasa Aragonesa, se han incorporado herramientas de genómica, en particular, se utiliza un panel de marcadores SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) para la verificación de filiaciones y paternidades, garantizando la fiabilidad de los datos genealógicos esenciales para los modelos BLUP (Calvo et al., 2020b). Además, estos paneles permiten identificar alelos funcionales de interés, como variantes asociadas a la prolificidad o al crecimiento, que pueden ser utilizados en SAM. Estas tecnologías genómicas complementan el registro fenotípico tradicional, fortaleciendo la base del esquema de selección y contribuyendo a la mejora sostenible y dirigida de la raza. Este panel incluye alelos relacionados con la resistencia a enfermedades (como el scrapie y el maedi), la prolificidad o la estacionalidad reproductiva. Se trata de un panel abierto que permite la incorporación de nuevos polimorfismos en caso de detectarse asociaciones positivas y significativas, como aquellas que puedan estar vinculadas al crecimiento o a otros caracteres de interés productivo.

Finalmente, el aumento en prolificidad que se ha producido debido a la selección genética en el carácter prolificidad ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar otros caracteres, como la capacidad maternal, que se refiere a la habilidad de las ovejas para alimentar y cuidar a sus crías, de manera que puedan sacar adelante sin dificultades a corderos nacidos. Este carácter se incorporó al programa de mejora en el año 2013, y, en la actualidad, se han publicado dos Catálogos de Sementales que recogen la valoración genética de los reproductores para el mismo.



**Figura 2.** Macho de la raza Rasa Aragonesa. Fuente: RFEAGAS (2023).



**Figura 3.** Rebaño de hembras de la raza Rasa Aragonesa.

### 1.3. Raza Roya Bilbilitana

Para llevar a cabo este estudio también se han utilizado datos de corderos de otra raza ovina de aptitud cárnica, la Roya Bilbilitana. La Roya Bilbilitana es una de las cinco razas de ovejas admitidas dentro de la I.G.P. Ternasco de Aragón junto a la Rasa Aragonesa, la Ojinegra de Teruel, la Maellana y la Ansotana. Se clasifica, dentro del Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, como Raza Autóctona en peligro de extinción. Según datos de la RFAGAS (2023), la Roya Bilbilitana tiene como núcleo principal el suroeste de la provincia de Zaragoza, el sureste de Soria y el noreste de la de Guadalajara. Las características de la raza se pueden encontrar en la base de datos ARCA perteneciente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/roya-bilbilitana>

Se trata de animales rústicos que ocupan zonas con medios difíciles donde otras razas han presentado dificultades para introducirse. Los rebaños de esta raza están adaptados a áreas semiáridas y montañosas (400-1200m) con limitaciones en la disponibilidad de agua y temperaturas extremas, habiendo heladas desde octubre hasta abril. Coincidiendo con la Rasa Aragonesa, su manejo se basa en un sistema semiextensivo con pastoreo y estabulación en la época de cría. El número de cabezas es de 32.630 en España y, en Aragón, hay un total de 15.635 animales (MAPA, 2023).

La Raza Bilbilitana es una de las razas más características de toda España. Cuando nacen, los corderos tienen la piel negra con las diferentes partes blancas que la caracterizan. Una vez van creciendo, la lana se torna de un color pardo-rojizo o “royo”, del cual recibe la otra parte del nombre. Otra de sus peculiaridades es que algunas de las ovejas tienen cuernos. Esto se da con menor medida en las hembras (en torno a un 41%), siendo más abundante en los machos (más o menos un 89%). La Asociación de Ganaderos de Ovino de la Raza Raza Raza Bilbilitana (AGROBI), es la entidad responsable del Programa de Cría y Mejora Genética de la raza, cuyo objetivo es, además de gestionar el libro genealógico, la conservación y la mejora genética de la raza. El programa de mejora se basa en la mejora de la prolificidad. Como en el caso de Raza aragonesa, se ha detectado el alelo prolífico *FecX<sup>Gr</sup>* (Grivette), y se utiliza el mismo panel de marcadores SNPs para la verificación de filiaciones y paternidades, que el nombrado anteriormente en Raza aragonesa. El número de partos al año es aproximadamente de 1,3, presentando una prolificidad de 1,26 corderos por parto (MAPA, 2023).

Comparándola con la Raza Aragonesa, destaca la mayor precocidad de deposición de cúmulos adiposos de la Raza Bilbilitana. Esta característica influye en la calidad del Ternasco. A los 80-100 días de edad se obtiene una canal de entre 10 y 12 kg con unas características propias de las del Ternasco. Estas canales presentan una composición tisular idónea, donde el tejido óseo no es exagerado permitiendo el desarrollo apropiado del tejido graso subcutáneo e intermuscular y llegándose a iniciar el adiposo intramuscular. Este último confiere una alta calidad al producto (BOA 101, 2016).

En razas como la Raza Aragonesa y la Raza Bilbilitana, la utilización de marcadores genéticos es ya una práctica habitual, empleándose para la asignación de paternidades, la gestión del libro genealógico y la identificación de alelos funcionales relacionados con características productivas, o resistencia a enfermedades. Además, existe un especial interés en identificar nuevas variantes asociadas a los caracteres de crecimiento para incorporarlas al panel de marcadores y aplicarlas en selección asistida por marcadores (SAM), mejorando así la eficiencia de los programas de cría.



**Figura 4. Macho de la raza Royo Bilbilitana.** Fuente: RFEAGAS (2023).



**Figura 5. Rebaño de hembras de la raza Royo Bilbilitana.** Fuente: MAPA (2023).

#### **1.4. Base genética de los caracteres de crecimiento en ovino**

Los caracteres de crecimiento, como lo son el PN, la GMD, o la CC, son importantes en la producción ovina, ya que influyen directamente en la rentabilidad económica del sistema productivo. Los animales que presenten mejor eficiencia alimentaria y mayores ganancias medias diarias necesitarán menos días para alcanzar el peso de sacrificio, lo que implica un menor consumo de alimento y, por tanto, una mayor rentabilidad económica para la explotación. Sin embargo, no se han realizado muchos estudios moleculares en ovino acerca de los mecanismos genéticos de los caracteres de crecimiento. El conocimiento de la base genética de los mismos, y de los genes que influyen en estos caracteres, podría ser utilizada para seleccionar los futuros reproductores en función de variantes génicas que mejoren los rendimientos. La Farm Animal Industrial (FAIP), en 2003, propone incorporar la genómica a los esquemas de selección influyendo en la caracterización de caracteres complejos afectados por varios genes con efectos pequeños. Confirmado el efecto de genes o marcadores genéticos se podría hacer selección asistida por marcadores (SAM).

La heredabilidad de un carácter es una medida que indica qué parte de las diferencias que vemos entre animales se debe a sus genes y no al ambiente. Por ejemplo, si un carácter como el PN tiene alta heredabilidad, significa que las diferencias entre corderos se explican en gran parte por su genética, y se puede mejorar más fácilmente con la selección. Los caracteres de crecimiento en ovino, como el PN o el peso al destete, están influenciados tanto por la genética del propio

animal como por la de su madre. Por ello, se distingue entre heredabilidad directa y heredabilidad materna. La heredabilidad directa refleja la proporción de la variación fenotípica que se debe a los genes del propio cordero y describe su capacidad genética intrínseca para crecer. En cambio, la heredabilidad materna representa la influencia genética de la madre sobre el ambiente que proporciona a su cría, como su habilidad para la gestación, la producción de leche o el comportamiento maternal. Estos dos componentes se estiman simultáneamente en modelos genéticos con efectos maternos, ya que ambos afectan de manera importante los valores observados de crecimiento en los corderos y son esenciales para diseñar programas de selección más precisos y eficaces. Estos caracteres presentan heredabilidades moderadas, lo que permite su mejora a través de programas de selección genética. Por ejemplo, Safari, Fogarty, y Gilmour (2005), en un artículo de revisión mostraron que las medias ponderadas de heredabilidad para los caracteres de crecimiento en varias razas fueron, en general, de magnitud moderada y oscilaron entre 0.15 y 0.41, con errores estándar muy bajos (entre 0.01 y 0.04). Las heredabilidades medias para el PN y al destete fueron similares, y la heredabilidad aumentó con la edad hasta los pesos post-destete y adulto. Por ejemplo, la heredabilidad de la GMD antes de destetar los corderos de raza Akkaraman varía entre 0,29 y 0,52, refiriéndose esta última al peso a los 180 días (Kizilaslan, Arzik, White, Piel, y Ulas, 2022). El PV al nacer en razas utilizadas en la Región de La Araucaína en Chile tiene una heredabilidad de entre 0,2 y 0,3 y, la del PV al año es de 0,3-0,4 (Romero, y Bravo, 2012). En Merino la heredabilidad directa y materna fueron de 0,25 y 0,15, respectivamente (Menéndez Buxadera, Serradilla, Valera, y Molina, 2003). En las razas Rasa Aragonesa y Roya bilbilitana no existen estudios de cálculo de heredabilidad para estos caracteres. Estas estimaciones en otras razas confirman el potencial genético significativo de estas razas autóctonas para la mejora de la eficiencia productiva en sistemas extensivos y semi-extensivos.

### **1.5. Búsqueda de variantes génicas asociadas a fenotipos de interés**

En la búsqueda de variantes génicas, podemos distinguir dos grandes tipos de estudios según el enfoque utilizado. Por un lado, está el estudio de todo el genoma, que adopta un enfoque libre de hipótesis al no requerir condiciones previas ni selección de regiones específicas. Por otro lado, se encuentra el enfoque de gen candidato, que se centra en un número limitado de genes previamente seleccionados por su posible relación con el fenotipo de interés, como prolificidad, fertilidad, predisposición o resistencia a enfermedades. En el primer tipo de estudios

destacan los análisis de asociación de genoma completo (GWAS; por sus siglas en inglés “Genome Wide Association Studies”), que emplean chips de SNPs capaces de contener desde miles hasta más de un millón de marcadores en el caso de aplicaciones en humanos. Estos análisis permiten localizar de forma posicional en el genoma genes o regiones genómicas asociadas al carácter de interés. (Martínez-Gil, Paiño-Salazar, Rabionet, Grinberg, y Balcells, 2023).

A diferencia del enfoque de todo el genoma, el método basado en hipótesis previa se caracteriza por una alta eficacia estadística y una mejor comprensión biológica de las diferencias genéticas y fenotípicas, ya que se centra en genes seleccionados previamente por su relación potencial con el carácter estudiado. Sin embargo, requiere conocimiento biológico previo para identificar esos genes candidatos. Además, este enfoque ofrece la ventaja de permitir la aplicación directa de los resultados en la raza de estudio, algo que resulta más limitado en los análisis de genoma completo. En estos últimos, aunque se identifican regiones genómicas asociadas al fenotipo, suele ser necesario un trabajo adicional para determinar el polimorfismo causal, lo que dificulta su uso directo en programas de selección. (León-Cachón, Ortiz-López, y Rojas-Martínez, 2009).

En cuanto a las variantes génicas identificadas y relacionadas con caracteres de crecimiento, se describen a continuación los estudios más destacados encontrados en la bibliografía:

- En un estudio GWAS se confirmó que los fenotipos de conformación de canal en corderos Scottish Blackface presentaban heredabilidades entre moderadas y altas (0,19-0,78). Se identificó una región en el cromosoma 6 (OAR6) relacionada con el peso óseo y el área ósea. También fue relacionada con el área, la densidad y el peso graso, así como la cantidad de músculo, detectándose otro SNP en OAR1 asociado con el mismo carácter.
- En el ovino de raza Segureña se han estudiado nuevos criterios de selección relacionados con la fisiología del crecimiento, como es la introducción de parámetros de la curva de crecimiento que mejor ajuste, pudiendo detectar la madurez sexual de los animales (entrada en pubertad), características no deducibles con el análisis de los fenotipos de crecimiento simples como el PV en diferentes etapas o las ganancias diarias (Duarte, 2016).
- En este contexto, y aunque las razas españolas no se han detectado muchas variantes génicas asociadas a caracteres de crecimiento, en

corderos de raza Merina existen variantes genéticas relacionadas con el impacto del estrés térmico sobre el PN y la GMD en los primeros quince días de vida (Menendez-Buxadera, Serradilla, y Molina, 2017). Estas variantes génicas pueden ser importante en el contexto actual de cambio climático.

- En ovejas Merino australianas, una región del cromosoma OAR6 contenía 13 SNPs significativos para el peso corporal. Esta región coincide con regiones genómicas asociadas con el peso y la estatura en humanos y bovinos, dando a entender que hay mecanismos biológicos conservados. Los genes candidatos detectados fueron *LAP3* (participa en el procesamiento del precursor de la oxitocina), *NCAPG* (relacionado con el crecimiento fetal y tamaño de canal en bovinos) y *LCORL* (asociado con la estatura en ganado y humanos) (Al-Mamun et al, 2015).
- Es destacable, la mutación *Callipyge* (*CLPG1*) que es un cambio de adenina (A) por guanina (G) en el cromosoma OAR18 que provoca hipertrofia en los músculos glúteos de ovinos de las razas Texel, Dorset y Suffolk (Postiglioni, García Rincón, y Arruga, 2010). Mediante análisis genómicos, se han identificado 39 genes, involucrados mayoritariamente en el ciclo celular y el desarrollo corporal, que están asociados con el PN y fenotipos de conformación corporal en la raza Luzhong Mutton Sheep (Tao et al., 2020).
- En la raza ovina Baluchi, se hizo un estudio de asociación de genoma completo ponderado (WssGWAS), atendiendo al PN y peso al destete, para calcular la proporción de varianza explicada por diferentes regiones genómicas. Se detectaron varias regiones genómicas que explicaban el 4,30% de las varianzas genéticas aditivas directas y el 4,92% de las maternas. En el caso del peso al destete, el 6,38% de las varianzas genéticas fueron directas, mientras que el 5,76% fueron maternas (Khazaei-Koohpar, Gholizadeh, Hafezian, y Esmaeili-Fard, 2024).
- En una investigación en ovino de carne Lori-Bakhtiari, a través de un estudio de asociación de genoma completo, se constató que tres SNP en el cromosoma 1 estaban asociados significativamente con el PN. Esto es, en conjunto explicaban un 0,8% de la variación genética total. De este modo, los genes *RAB6B*, *TF* y *GIGYF2* se podrían considerar genes candidatos para el PN (Ghasemi, Zamani, Vatankhah, y Abdoli, 2019)
- Zhang et al. (2013) realizaron un GWAS en 329 oveja de razas puras chinas para 11 fenotipos de crecimiento y producción de carne: PN, peso



el destete, peso a los 6 meses, área muscular del ojo, espesor de grasa, ganancia antes y después del destete, ganancia diaria, altura de la cruz y circunferencia del pecho y de la canilla. Se encontraron 36 SNPs significativos para 7 de estos fenotipos a nivel cromosómico. A nivel genómico se identificaron 10 SNPs específicos para la ganancia tras el destete. Los genes candidatos más destacables para la ganancia post-destete fueron *MEF2B*, *RFXANK*, *CAMKMT*, *TRHDE* y *RIPK2*.

- Li et al. (2023) integró la información de un GWAS para evaluar métodos de selección genómica y así predecir el PV a los 14 meses en 765 ovejas Alpine Merino. Se asociaron 30 SNPs altamente significativos con el PV a esa edad. Los genes candidatos seleccionados fueron: *TBL1X*, *PPARGC1A* (adipogénesis), *TRPM6* (transporte de iones), *CLGN*, *CCSER1*, *ITGA11*. Estos genes están involucrados en el crecimiento muscular, el metabolismo energético y el desarrollo óseo. En resumen, la integración de la información molecular obtenida del GWAS en modelos de selección genómica mejora significativamente la precisión predictiva para el PV en esta raza ovina.
- Finalmente, dado que la CC y PV son claves para el desempeño productivo y reproductivo, Lakhssassi et al. (2023) realizaron un GWAS con CC, PV y (TC) en 225 ovejas adultas de Rasa aragonesa genotipadas con chips Illumina de media y alta densidad, encontrando un SNP en el gen candidato *CYP7B1* asociado a estos caracteres. Este estudio constituye el punto de partida de este trabajo, por lo que se describirá de manera más exhaustiva en apartados posteriores.

Estos estudios muestran el carácter poligénico de los caracteres de crecimiento, con excepción del *Callipyge*, que presenta un efecto de gen mayor, pero que no se ha detectado en razas españolas. Además, la poca repetibilidad de los resultados entre razas, indica que es necesario validar los polimorfismos encontrados en las diferentes razas, para una vez validados, poder aplicarlos en los esquemas de selección.

En este trabajo se parte de los resultados obtenidos en un GWAS con CC, PV y TC en ovejas de la raza Rasa Aragonesa para caracteres de crecimiento. En ese estudio se demostró que la región promotora del gen *CYP7B1* (*miembro 1 de la subfamilia B de la familia 7 del citocromo P450*) estaba relacionada con la GMD y CC de ovejas adultas (Lakhssassi et al., 2023). Sin embargo, no se tiene

información de la influencia de este polimorfismo en caracteres de crecimiento en corderos.

### **1.6. Análisis GWAS de caracteres relacionados con el crecimiento en Rasa Aragonesa**

El estudio de investigación de Lakhssassi et al. (2023) hace un análisis de asociación de genoma completo (GWAS) para características de crecimiento en 225 ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa mediante los arrays de SNPs de 50k y 600K de Illumina. En estas ovejas se registraron y controlaron la CC, el PV y la TC desde enero hasta septiembre durante dos años (2011 y 2012). A partir de estos datos se calcularon fenotipos corregidos para CC, PV y TC, que se emplearon posteriormente en el análisis GWAS. En el análisis, solo el SNP rs425509273 en el cromosoma 9 (OAR9) mostró una asociación significativa a nivel genómico para el fenotipo TC. Además, se identificaron uno, tres y nueve SNPs asociados a nivel cromosómico ( $FDR < 0,10$ ) con los caracteres CC, PV y TC, respectivamente.

El gen candidato *CYP7B1*, localizado a 83 kb del SNP rs425509273 y asociado con TC, se aisló parcialmente para analizar polimorfismos mediante secuenciación Sanger en animales seleccionados por fenotipos extremos de TC. De esta manera, se aislaron todos sus exones y 996 pb de la región promotora. Se identificaron 15 polimorfismos en la región 5' del gen: 12 SNPs, dos indels y un poliC.

El análisis de asociación de los polimorfismos cercanos al sitio de inicio de la transcripción (TSS) reveló que una inserción de 22 pb a -58 nucleótidos del TSS (indel (-58)), un poliC (-25) y dos SNPs A/G (SNP3 (-114) y SNP5 (-63)) se asociaron con TC, mientras que solo el indel (-58) mostró asociación con CC.

No se encontraron secuencias del tipo caja TATA en la región promotora del gen *CYP7B1*, por lo que la activación de la transcripción de este gen estaría mediada por elementos de tipo SP1 (Wu, Martin, Javitt, y Chiang, 1999). El análisis *in silico* de la región promotora del gen, en relación a la modificación de sitios de unión de factores de transcripción, mostró que el SNP5 (-63) y el indel (-58) modifican un sitio de consenso SP1. Además, se predijo una isla CpG, que podría estar metilada y por lo tanto reprimir la expresión, de 1200 pb que incluye el exón 1 y 600 pb de la región promotora y que la región que hay entre las bases 291 y +189 del TSS es decisiva para la transcripción.

Los resultados anteriores se confirmaron en un análisis de asociación haplotípica (conjunto de alelos que se heredan en la misma fase gamética) de la región promotora, en el cual los animales que portaban dos copias del haplotipo denominado H2 ((G-C-A-Ins22-C7 para SNP3 (-114)- SNP4 (-97)- SNP5 (-63)- indel (-58)- polyC (-25)), presentaros una TC más baja que los animales que tenían una o ninguna copia ( $P < 0,05$ ). También se descubrió que los alelos Ins22 y A para los polimorfismos indel (-58) y SNP5 (-63) estaban relacionados con una menor TC y podrían modificar los sitios de consenso SP1. Sin embargo, el diplotipo H12/H12 supuso un mayor TC que los que contenían una o ninguna copia. El H12 (G-C-G-N-C8) mostró los alelos asociados con una TC superior, para los polimorfismos SNP3 (-114), SNP5 (-63), indel (-58) y polyC (-25).

Por último, al estar localizados en la región promotora, se caracterizaron funcionalmente los polimorfismos del gen *CYP7B1* en muestras de hígado en animales jóvenes de menos de 90 días de edad a través de un análisis de PCR cuantitativa en tiempo real, ya que los análisis *in silico* indicaban una modificación de los sitios de unión de los factores de transcripción. Este análisis confirmó que las mutaciones del promotor influían en la expresión del gen en cuestión. El SNP5 (-63) afectó a la expresión de *CYP7B1* y el alelo A modificó los sitios de consenso de unión de SP1 y Adf-1, pudiendo influir en la tasa de expresión génica. Los análisis de expresión génica teniendo en cuenta los haplotipos confirmaron estos resultados.

Con todo, los resultados de esta investigación demostraron la involucración del gen *CYP7B1* en los fenotipos de TC y CC de las ovejas Rasa Aragonesa. Resultados que indican que las variaciones en *CYP7B1* podrían ser posibles marcadores genéticos para mejorar los caracteres de crecimiento en los programas de cría y, a su vez, influir en las características reproductivas. Finalmente, la diferencia de expresión génica en animales jóvenes podría indicar que las variantes génicas también podrían afectar a los fenotipos estudiados en los mismos.

### **1.7. CYP7B1**

El *CYP7B1* es el gen del citocromo P450, miembro 1 de la subfamilia B de la familia 7. Contiene 6 exones y 5 intrones y ocupa, aproximadamente 65 kb del genoma (Wu et al., 1999).

Los citocromos P450 codifican dos tipos de enzimas, las que actúan en sustratos endógenos (lípidos) y las que lo hacen en sustratos exógenos (fármacos, químicos ambientales). El *CYP7B1* interviene sobre sustratos endógenos,

hidroxilando dehidroepiandrosterona, pregnenolona y otros esteroides, y dos oxистерoles: el 25-hidroxicolesterol y el 27-hidroxicolesterol. La hidroxilación de los carbonos 6 y 7 del anillo B de los oxистерoles y esteroides reduce la actividad biológica de los mismos y facilita la conversión en productos finales que se eliminan del cuerpo con facilidad. Su actividad en el hígado es esencial para la inactivación de los oxистерoles y su posterior conversión en sales biliares. La enzima *CYP7B1* metaboliza los andrógenos que se oponen a la acción de los estrógenos. También tiene actividad en el cerebro, pues en estudios se ha mostrado que una neuropatía progresiva (paraplejia espástica tipo 5) es causada por mutaciones de pérdida de función en el gen humano (Stiles, McDonald, Bauman, y Russel, 2009).

En este contexto, el gen *CYP7B1* está involucrado en el metabolismo de los esteroides, participando en vías que regulan la homeostasis del colesterol y los lípidos (Guillemot-Legrís, Mutemberezi, Cani, y Muccioli, 2016). Como se ha mencionado anteriormente, su función principal consiste en la hidroxilación de ácidos biliares y esteroides oxidados, facilitando su eliminación o transformación en compuestos menos tóxicos, lo que contribuye a mantener niveles adecuados de colesterol plasmático y el equilibrio lipídico en el organismo. Además, *CYP7B1* interviene en la modulación de rutas metabólicas que conectan el metabolismo hepático con la inflamación sistémica, al afectar la producción de mediadores lipídicos bioactivos. Por último, diversos estudios han demostrado que la inhibición o deficiencia de este gen puede conducir al desarrollo de hígado graso, al alterar la síntesis y degradación normal de lípidos en los hepatocitos, provocando acumulación de triglicéridos y disfunción hepática (Dai et al., 2014).

Por ello, su implicación en la regulación del metabolismo lipídico lo convierte en un candidato relevante para explicar diferencias en crecimiento y CC en ovino.

## 2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar la relación entre el gen *CYP7B1* y el peso al nacimiento (PN) y la ganancia media (GM) desde el nacimiento al destete en corderos de Rasa Aragonesa y Roya Bilbilitana. Este polimorfismo podría ser utilizado en selección asistidas por marcadores (SAM) para preseleccionar futuros reproductores más eficientes, portadores de alelos favorables a los citados fenotipos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Genotipar el SNP (-63) localizado en la región promotora del gen *CYP7B1* en corderos de las razas Rasa Aragonesa y Roya Bilbilitana, utilizando la técnica de PCR competitiva alelo-específica (KASP).
- Evaluar la asociación entre los genotipos del SNP (-63) del gen *CYP7B1* y caracteres productivos relacionados con el crecimiento, concretamente el PN y la GM desde el nacimiento hasta el destete.

En el marco de la Agenda 2030 de la ONU, los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) a los que contribuye este TFG son:

- ODS 2. Hambre Cero: la mejora y selección genética de animales más resistentes a entornos cambiantes favorece el aumento de producción, favoreciendo la reducción del hambre y la seguridad alimentaria.
- ODS 12. Producción y Consumo Responsables: una ganadería adaptada al medio y el clima produce haciendo un uso más eficiente de los recursos naturales.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material animal y fenotipos

El presente estudio se ha llevado a cabo en el laboratorio de biología molecular animal del Departamento de Ciencia Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Los estudios de genotipado y asociación se han realizado con 579 corderos de Rasa Aragonesa y 397 de la raza Roya Bilbilitana dentro del proyecto Grupo Operativo Autonómico “Validación de los efectos de variantes génicas asociadas a la prolificidad y estacionalidad en raza aragonesa y roya bilbilitana (GEN3OVI)” cuyo coordinador es UPRA (UNIÓN DE PRODUCTORES DE LA RAZA "RASA ARAGONESA")- Grupo Pastores.

Las muestras de ADN, pertenecientes a 2 y 1 paridera en Rasa aragonesa y Roya bilbilitana respectivamente, habían sido extraídas con anterioridad, y almacenadas en condiciones adecuadas en el laboratorio del CITA.

Los fenotipos recogidos por los ganaderos y técnicos de UPRA, para ambas razas, son el sexo, el tipo de parto (simple, doble, triple o cuádruple), la paridera o mes de nacimiento, el PN (en kg), el peso al destete (en kg), los días desde el nacimiento hasta el destete, la GM en este periodo (en kg) y, la edad de la madre.

**Tabla 1.** *Ejemplo de datos de los corderos Rasa Aragonesa.*

Nº cordero	Sexo	Tipo Parto	Mes	GM	Dias_crec	Peso Nto	Peso destete	Edad madre
685	H	D	A	12,10	56	5,20	17,3	48,6
686	H	D	A	14,45	56	4,95	19,4	48,6
693	H	D	A	11,50	55	3,90	15,4	85,1
694	H	D	A	13,00	55	4,40	17,4	85,1
771	H	T	A	7,45	53	4,35	11,8	48,8
829	H	D	A	11,70	51	4,10	15,8	48,9
831	H	D	A	10,30	51	4,60	14,9	48,9
861	H	D	A	10,35	50	3,25	13,6	24,2
1883	H	C	B	6,1	54	2,9	9	68,5
1898	H	T	B	8,1	54	2,9	11	81,0
1868	H	D	B	5,9	55	3,1	9	105,0
1997	H	D	B	8,4	51	3,1	11,5	68,0
1900	H	T	B	8,25	54	3,25	11,5	81,0
1963	H	D	B	11,7	52	3,3	15	32,0

### **3.2. Extracción de ADN y genotipado mediante PCR competitiva alelo-específica (KASP: Kompetitive Allele Specific PCR)**

Como se ha indicado en el apartado anterior, las muestras de ADN que se han utilizado en este trabajo habían sido extraídas en el CITA previamente, mediante un proceso de extracción rápido. El proceso de extracción se realizó con el reactivo de lisis DirectPCR específico para extracciones de cola de ratón (VIAGEN, IBIAN, Zaragoza, España), el cual se adaptó en laboratorio para muestras de sangre entera con anticoagulante EDTA. El ADN que se libera con esta extracción presenta una cantidad y calidad compatible con el genotipado por PCR a tiempo real y lectura de fluorocromos específicos de alelo, ya que estos reactivos contienen inhibidores de ciertos compuestos presentes en los tejidos animales que, a su vez, inhiben las reacciones PCR. El primer paso de este procedimiento es realizar dos lavados consecutivos de 100 µl de sangre con 400 µl y 1 ml de buffer TE (TRIS 10 mM, EDTA 10 mM, pH = 8), y precipitado, en ambos lavados, de los glóbulos blancos mediante centrifugación a 3000 g durante 8 minutos, que permite eliminar el anticoagulante y otras impurezas que pueden inhibir posteriormente la PCR. El precipitado se vuelve a suspender en 85 µl del reactivo de lisis DirectPCR y 5 ml de solución de proteinasa K (20 mg/ml), incubando durante 1 h a 55°C, y posteriormente a 85°C durante 45 minutos, inactivando con esta última incubación la proteinasa K. Finalmente se centrifuga a 14000g durante 4 minutos y se recupera el sobrenadante dónde estará el ADN en suspensión. Los lisados crudos se pueden conservar a -20°C durante un año o a 4°C durante una semana sin perder eficacia.

En este trabajo se llevó a cabo el genotipado del polimorfismo SNP (-63), el cual se localiza en la región promotora del gen *CYP7B1*. El genotipado se ha llevado a cabo mediante discriminación alélica utilizando la técnica KASP (Kompetitive allele specific PCR), que es una PCR competitiva específica de alelo que se lleva a cabo en un termociclador a tiempo real, y que permite la identificación de SNPs inserciones y deleciones en *loci* específicos. Para realizar esta técnica de genotipado se necesitan dos cebadores directos específicos (cada cebador directo está marcado con un fluorocromo diferente en función del alelo a detectar y que se diferencian sólo en un nucleótido que corresponderán a cada uno de los alelos del polimorfismo a estudiar), y uno reverso común para los dos alelos de la secuencia, para amplificar la región que contiene el polimorfismo. Los cebadores directos disponen de una secuencia marcadora específica de alelo que es complementaria

a la secuencia marcadora específica de dos casetes FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente), que se encontrarán en la mezcla de reacción. Estos casetes FRET disponen de un fluorocromo alelo específico en el extremo 5', y de una molécula inhibidora de fluorescencia o "*quencher*". Cuando el cebador hibrida con el ADN durante la PCR la secuencia marcadora específica se habrá unido con su casete FRET correspondiente que tendrá el fluorocromo correspondiente (hibridarán porque son complementarios), incorporándose en el producto amplificado y separándose irreversiblemente del "*quencher*" en el casete FRET, y emitiendo la fluorescencia correspondiente. Los fluorocromos más comúnmente utilizados son HEX (emite a una longitud de onda de 556 nm) y FAM (emite a una longitud de onda de 510 nm).

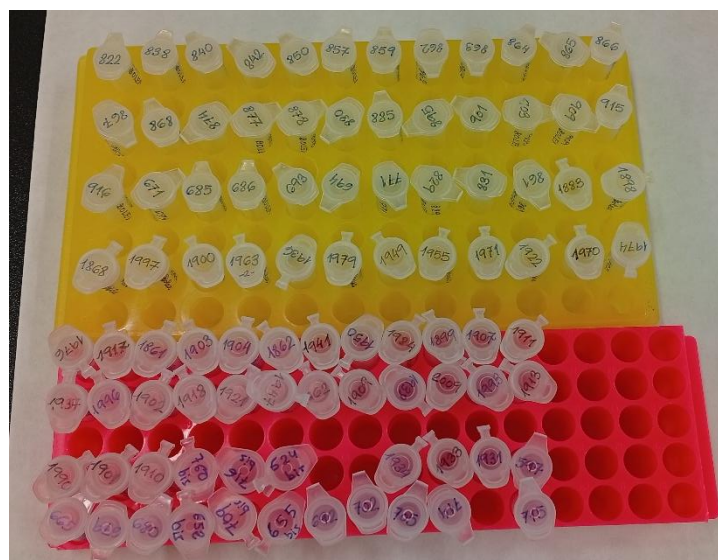
En resumen, la técnica se basa en la extensión de cebador específico de alelo, y la liberación de una fluorescencia al hibridar los cebadores, que será posteriormente detectada por el sistema óptico del termociclador a tiempo real. En este trabajo, la discriminación alélica mediante la tecnología KASP se llevó a cabo en el termociclador a tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Madrid, España).

El diseño de cebadores fue llevado a cabo por LGC Genomics, proveedor de los ensayos KASP, mediante el envío de las secuencias flanqueantes al SNP. La empresa proveedora de los cebadores envía los ensayos premezclados para cada SNP, sin detallar la secuencia de los cebadores.

A continuación, se explican los pasos que se llevaron a cabo en el laboratorio para el genotipado:

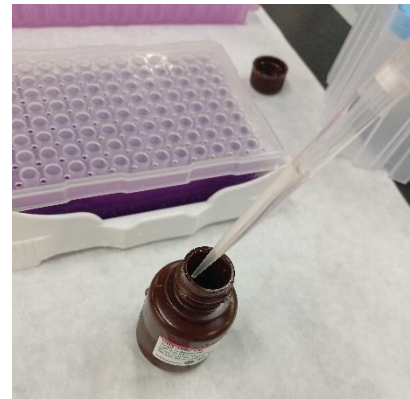
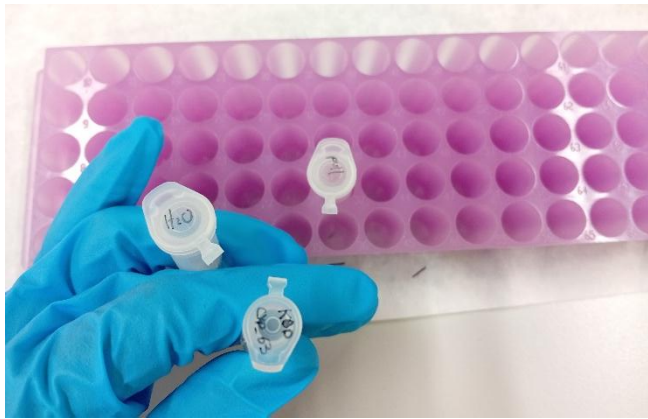
El primer paso fue preparar los tubos de las muestras de ADN y los controles positivos en una gradilla. Los controles positivos son muestras de ADN (con genotipo conocido) extraído su ADN mediante columnas, método que purifica ácidos nucleicos utilizando columnas con una matriz de sílice, obteniéndose este con mayor pureza. Se utilizaron dos muestras por genotipo (AA, AG y GG). En cuanto a controles negativos utilizados para detectar posibles contaminaciones, consistentes en agua y la mezcla de reacción, que no deberían mostrar amplificación, se incluyeron dos réplicas.





**Figura 6.** Ejemplo de una de las gradillas montadas con las muestras de ADN y controles.

La amplificación se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l conteniendo 1  $\mu$ l de DNA (50-100 ng), 5  $\mu$ l de la mezcla de reacción KASP V4.0 2x con ROX estándar (LCG Genomics, Beverly, MA, USA), 0,14  $\mu$ l de la mezcla de cebadores optimizada para la discriminación alélica (KASP-by-Design assay mix; LGC Genomics, Beverly, MA, USA), y 3,86  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura. La mezcla maestra contiene todos los demás componentes necesarios, incluyendo los casetes FRET con la secuencia marcadora alelo específico complementaria a la del cebador directo para cada alelo (marcados con los fluorocromos FAM y HEX dependiendo del alelo), los nucleótidos, y la polimerasa Taq, modificada especialmente para PCR, en una solución tampón optimizada. Como fluorocromo de referencia pasivo la mezcla maestra contiene 5-carboxi-X-rodamina, éster succinimidílico (ROX). El ROX permite normalizar los datos dividiendo los valores FAM y HEX por el valor de referencia pasivo para ese pocillo en particular, eliminando así la variable del volumen.

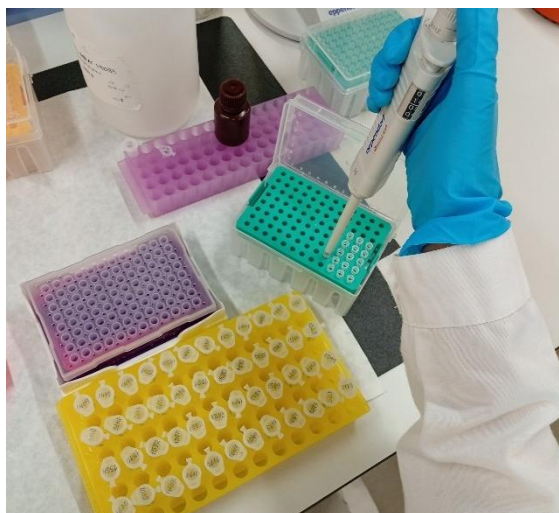


**Figuras 7 y 8.** Alícuotas de la mezcla de ensayo y el agua. Mezcla maestra para preparación de la mezcla de reacción (KASP V4.0 2x con ROX estándar).

La PCR se realizó en placas de 96 pocillos.

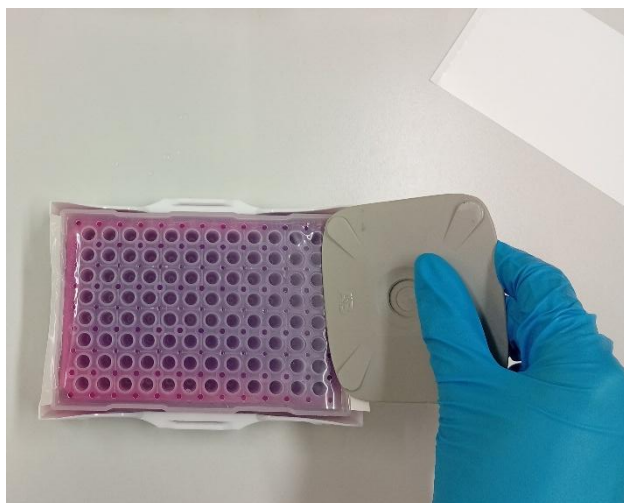


**Figuras 9, 10 y 11.** Agitado de la mezcla de reacción. Programación de la pipeta automática. Dispensación de la mezcla de reacción en la placa.



**Figura 12.** *Dispensación del ADN en los pocillos correspondientes.*

Las placas de PCR se sellaron con un film ópticamente transparente y se centrifugar las mismas brevemente a 4000g para precipitar al fondo de cada pocillo la mezcla.



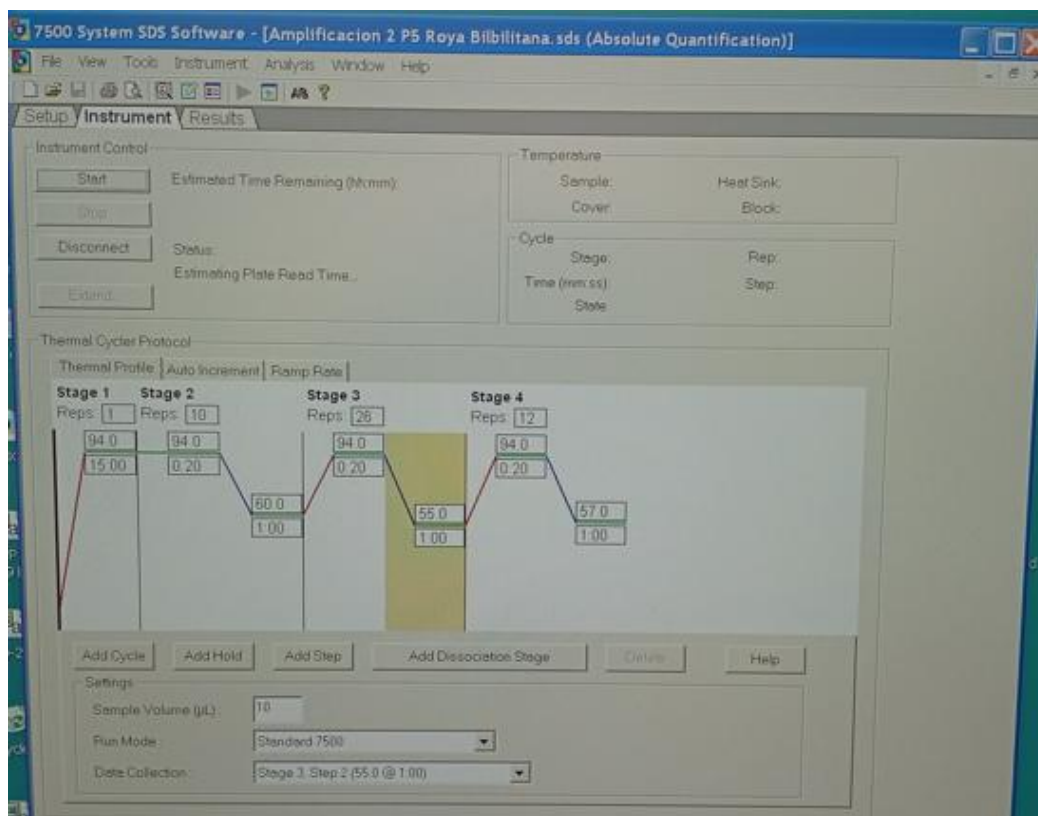
**Figuras 13 y 14.** *Sellado de la placa. Centrifugado.*

La PCR se llevó a cabo en un termociclador a tiempo real Applied Biosystems 7500, introduciendo la placa en el mismo. Las condiciones de amplificación fueron: una fase de activación a 94 °C durante 15 minutos; 10 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, de hibridación y elongación a 60°C durante 1 minuto; 26 ciclos de desnaturalización durante 20 segundos a 94 °C e hibridación y elongación a 55 °C durante 1 minuto; 12 ciclos de desnaturalización durante 20 segundos a 94 °C e hibridación y elongación a 57 °C durante 1 minuto; y finalmente un ciclo a 30 °C durante 1 minuto. Tras este ciclo se hace una lectura de la fluorescencia a tiempo final, para poder discriminar el genotipo. Los ciclos de

la amplificación se pueden observar en la figura 16. Para finalizar se recogieron los datos de los genotipos de cada muestra de ADN como se muestra en la figura 17.

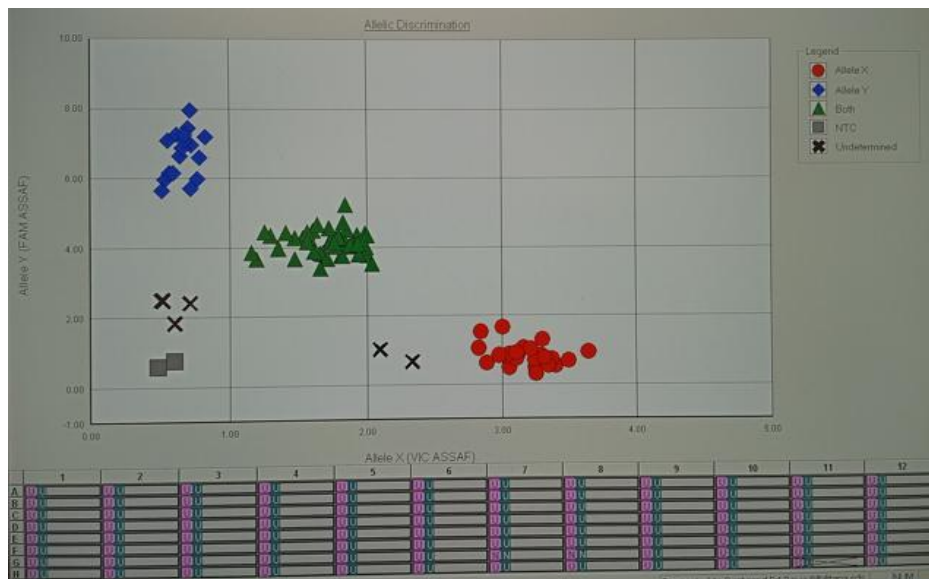


**Figura 15.** *Introducción de la placa en el termociclador.*



**Figura 16.** *Programación de los ciclos de la amplificación.*





**Figura 17.** Ejemplo de resultados de genotipos de una placa.

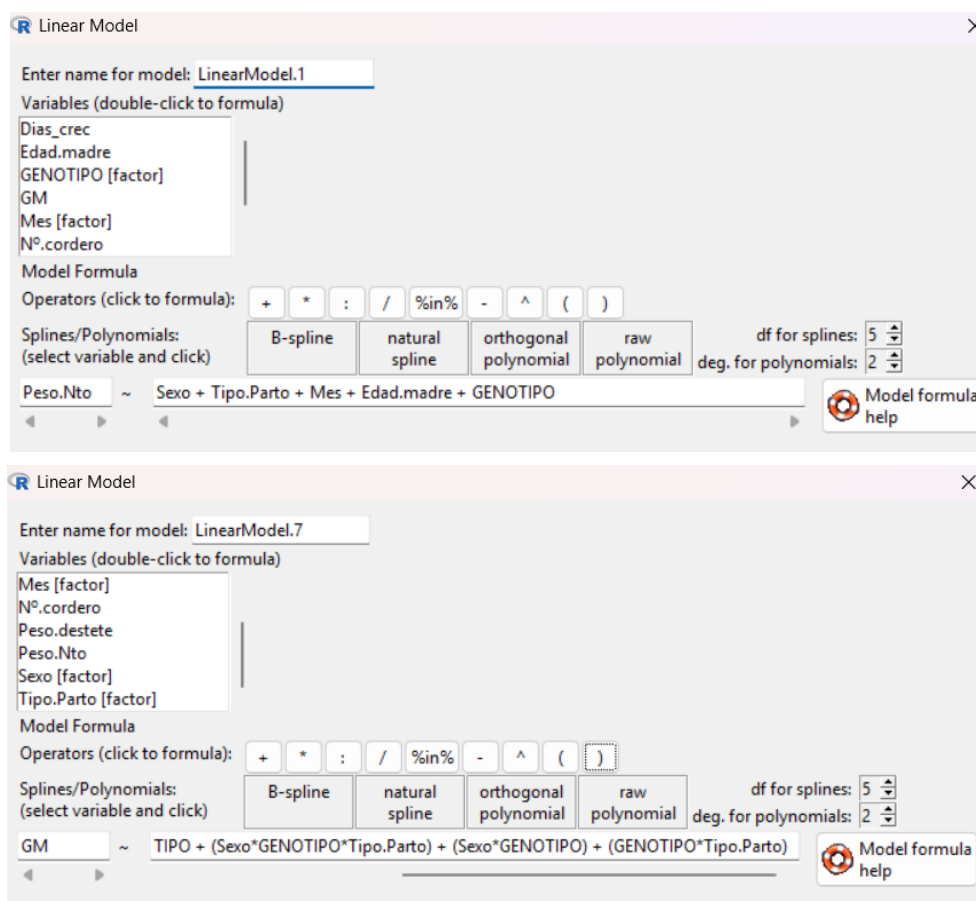
Es destacable, la inclusión de un cuarto ciclo de la amplificación con 12 repeticiones. Esto se modificó al apreciar en la primera placa genotipada que, con los 6 ciclos que se programó inicialmente, había un número importante de muestras con resultado indeterminado, mejorando al incrementarlo a 12 repeticiones. Por último, al finalizar el genotipado de todas las muestras, se repitieron las muestras de ADN con un resultado indeterminado y se recuperaron muchas de ellas. Entre las mejoras planteadas en las muestras que fallaron, destacó en incrementar la cantidad de ADN inicial molde, subiendo a 2 µl de ADN, y ajustando la mezcla de reacción a 8 µl, reduciendo la cantidad de agua ultrapura añadida.

Como se ha descrito con anterioridad la fluorescencia es detectada por el sistema óptico del termociclador a tiempo real. El software de la PCR a tiempo real discrimina los genotipos en función de las unidades de fluorescencia relativas para cada uno de los fluorocromos.

### 3.3. Análisis estadístico de asociación

El análisis estadístico se realizó mediante el ajuste a un modelo lineal usando el paquete RCommander (Rcmdr) del software R (Fox y Bouchet-Valat, 2020). Este modelo estadístico busca explicar una variable dependiente a partir de una o más variables independientes. Las dos variables dependientes analizadas fueron el PN y la GM hasta el destete.

Tanto para corderos de Rasa Aragonesa como de Roya bilbilitana el modelo incluyó como factores fijos el sexo, tipo de parto, mes y año de paridera y genotipo para el PN. En cuanto al modelo lineal llevado a cabo para la GM desde el nacimiento hasta el destete, se añadieron los factores fijos del modelo anterior. Como covariable se incluyó la edad de la madre en ambos casos, y los días desde el nacimiento al destete para la GM. Se estimaron las medias mínimo cuadráticas (LSMeans) y error estándar mediante el paquete de R emmeans para cada nivel de los factores y covariables. Además, se llevó a cabo un modelo más completo con interacciones entre sexo, genotipo y tipo de parto para el PN, y crecimiento medio, utilizando el criterio BIC (Criterio de Información Bayesiano) para comparar ambos modelos y seleccionar el mejor considerando la bondad del ajuste y la complejidad del mismo.



**Figuras 18 y19.** Ejemplos de uso del software R. Modelo lineal para el PN de corderos de Rasa Aragonesa. Modelo lineal más complejo para la GM hasta el destete de corderos de Roya Bilbilitana.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha genotipado un SNP que puede tener implicación en los caracteres de crecimiento. Estudios previos demostraron la asociación de este polimorfismo con dichos caracteres en hembras adultas de la raza Rasa Aragonesa. El SNP se localiza en la región promotora del gen y, en corderos de esta raza, se ha relacionado con una mayor o menor expresión génica. Estos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de que este polimorfismo podría estar implicado en el peso al nacimiento y en el crecimiento de los corderos. Así pues, en este trabajo nos propusimos validar el efecto del polimorfismo SNP (-63), localizado en la región promotora del gen *CYP7B1*, en corderos de las razas Rasa Aragonesa y Roya Bilibilitana. A continuación, pasamos a describir los resultados de los estudios de genotipado y asociación por raza.

### 4.1. Rasa Aragonesa

En la Tabla 2 se pueden ver las frecuencias génicas y genotípicas observadas para el SNP. El SNP se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La ley de Hardy-Weinberg establece que, en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra. Es decir, en la población estudiada este gen no se encuentra sometido a fuerzas como la selección natural o artificial, migración o deriva genética, que cambiaría la composición alélica o genotípica de la población, y que debería ser considerada en los estudios de asociación.

**Tabla 2.** Frecuencia genotípica y alélica del SNP analizado del gen *CYP7B1* en Rasa Aragonesa.

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTÍPICA	FRECUENCIA ALÉLICA (A)
<i>CYP7B1</i>	SNP (-63)	AA	0,21	0,47
		AG	0,52	
		GG	0,27	

Para los análisis de asociación se partió de un modelo que incluía todos los efectos que podían influir sobre los fenotipos de crecimiento. Igualmente, se valoraron otros modelos que incluían diversas interacciones como sexo x genotipo, tipo de parto x genotipo, sexo x tipo de parto, y sexo x genotipo x tipo de parto.

Estos modelos incluyeron estas interacciones por separado y combinándolas. El modelo que presentó el valor de BIC menor, y que por lo tanto ajustaba mejor, fue el modelo sin interacciones para los dos fenotipos y ambas razas, por lo que sólo se presentarán los resultados de este modelo.

En la Tabla 3 se pueden ver los resultados de asociación, y la significación para cada efecto sobre los fenotipos de crecimiento en Rasa Aragonesa. Es destacable que el SNP no resultó significativo para el peso al nacimiento, ni el crecimiento hasta el destete. Sin embargo, el resto de variables sí fueron significativas para el peso al nacimiento.

**Tabla 3.** *Prueba de tipo II para los efectos del sexo, tipo de parto, edad de la madre, días de lactación, paridera y SNP (-63) sobre los fenotipos de crecimiento en Rasa Aragonesa.*

Fenotipo	P-Value (Valor de p)					
	Sexo	Tipo de parto	Edad de la madre	Días en lactación	Paridera	SNP
Peso al nacimiento (kg)	<0, 01	<0,001	0,04	-	< 0,001	0,13
Crecimiento hasta el destete (kg)	0,02	<0,001	0,28	0,80	< 0,001	0,32



**Tabla 4.** Medias de cuadrados mínimos (LSMeans) y errores estándar correspondientes a los diferentes niveles de los efectos fijos (sexo, tipo de parto, paridera y SNP (-63)) sobre los fenotipos de crecimiento en la raza ovina Rasa Aragonesa. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Fenotipo	Efectos			
	Sexo			
	Macho	Hembra		
Peso al nacimiento (kg)	3,97 ± 0,01a	3,78 ± 0,01b		
Crecimiento hasta el destete (kg)	9,51 ± 0,32a	9,03 ± 0,32b		
	Paridera			
	Noviembre 2023	Julio 2024		
Peso al nacimiento (kg)	3,73 ± 0,10a	4,02 ± 0,10b		
Crecimiento hasta el destete (kg)	10,56 ± 0,34a	7,97 ± 0,31b		
	Genotipo			
	AA	AG	GG	
Peso al nacimiento (kg)	3,78 ± 0,11	3,88 ± 0,10	3,97 ± 0,11	
Crecimiento hasta el destete (kg)	9,21 ± 0,38	9,11 ± 0,31	9,48 ± 0,35	
	Tipo de parto			
	Simple	Doble	Triple	Cuádruple
Peso al nacimiento (kg)	4,96 ± 0,06a	4,17 ± 0,04b	3,58 ± 0,12c, d	2,8 ± 0,34d
Crecimiento hasta el destete (kg)	11,48 ± 0,20a	9,99 ± 0,14b, c	9,55 ± 0,44c	6,06 ± 1,09d

Los análisis de comparación de las medias de cuadrados mínimos o LSMeans (Least Squares Means) (Tabla 4) mostraron que los machos pesan, en promedio, pesan  $0,19 \pm 0,07$  kg más que las hembras. En cuanto al tipo de parto, tiene una influencia muy significativa sobre el peso al nacimiento como se puede observar en la Tabla 4. Los corderos provenientes de partos simples pesaron  $0,79 \pm 0,07$ ,  $1,38 \pm 0,14$ , y  $2,16 \pm 0,34$  más que los corderos de partos dobles, triple y cuádruples, respectivamente. Estos datos son similares a lo descrito para la mayoría de las razas ovinas. Es sorprendente que la paridera de julio de 2024 registró corderos de  $0,29 \pm 0,07$  kg más que la de noviembre de 2023. Varios estudios han mostrado que los corderos nacidos en verano presentan pesos al nacimiento mayores que los nacidos en otoño: Stritzke y Whiteman (1982) encontraron que los nacidos en verano pesaron aproximadamente 0.95 kg y 1.28 kg más que los de otoño ( $p < 0.05$ ), e invierno ( $p \leq 0.01$ ). De manera similar, en corderos de las razas Pirot y Svrlijig, los nacidos en primavera/verano fueron más

pesados que los nacidos en otoño/invierno ( $p < 0.05$ ) (P. Petrovic, Ruzic, Caro, y Maksimovical, 2011). Estos datos podrían indicar que condiciones ambientales favorables durante el verano, como mayor disponibilidad de recursos nutricionales y menor estrés medioambiental, pueden favorecer el crecimiento fetal. El SNP no resultó significativo, aunque si se observó que el genotipo GG ( $3,97 \pm 0,11$ ) tuvo un mayor peso al nacimiento que el resto.

En el trabajo de Lakhssassi et al. (2023), del que parte el presente trabajo, las ovejas portadoras del genotipo GG para el polimorfismo SNP (-63) tuvieron una tasa de crecimiento mayor que las ovejas con genotipo AA.

En cuanto a la ganancia desde el nacimiento al destete, el sexo, tipo de parto y paridera, resultaron significativas. Los días en lactación no fueron significativos, aunque presentaron datos muy homogéneos con una media de 51,96 y desviación estándar de 2,12. En la tabla 4 se puede ver que los corderos macho tuvieron un crecimiento de  $0,48 \pm 0,21$  kg más que las hembras. Igualmente, el tipo de parto presentó una influencia muy significativa en la GM desde el nacimiento hasta el destete. Los corderos de partos simples tienen una GM de  $5,42 \pm 1,11$  kg más que los de partos cuádruples. Sin embargo, la GM ajustada de la paridera de noviembre del 2023 fue  $2,59 \pm 0,22$  kg mayor que la de los animales de julio de 2024.

Destacar que también se probó un modelo incluyendo el peso al nacimiento, sin embargo, al estar muy correlacionado con el tipo de parto, este efecto no salía significativo, además de obtener valores de BIC más elevados.

## **4.2. Raza Bilbilitana**

En la Tabla 5 se pueden ver las frecuencias génicas y genotípicas observadas para el SNP en la raza Raza Bilbilitana. Se puede observar que las frecuencias fueron similares en ambas razas. Como en el caso de Raza aragonesa el SNP se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabla 5.** Frecuencia genotípica y alélica del SNP analizado del gen CYP7B1 en la raza Roya Bilbilitana.

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTÍPICA	FRECUENCIA ALÉLICA (A)
CYP7B1	SNP (-63)	AA	0,21	0,47
		AG	0,52	
		GG	0,26	

**Tabla 6.** Prueba de tipo II para los efectos del sexo, tipo de parto, edad de la madre, días de lactación, y SNP (-63) sobre los fenotipos de crecimiento en Roya Bilbilitana.

P-Value (Valor de p)				
Sexo	Tipo de parto	Edad de la madre	Días en lactación	SNP
<0,001	<0,001	0,52	-	0,66
0,02	0,09	0,76	<0,001	0,71

**Tabla 7.** Medias de cuadrados mínimos (LSMeans) y errores estándar correspondientes a los diferentes niveles de los efectos fijos (sexo, tipo de parto, y SNP (-63)) sobre los fenotipos de crecimiento en la raza ovina Roya Bilbilitana. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Fenotipo	Efectos		
	Sexo		
	Macho	Hembra	
Peso al nacimiento (kg)	4,39 ± 0,08a	4,11 ± 0,07b	
Crecimiento hasta el destete (kg)	9,13 ± 0,21a	8,66 ± 0,21b	
	Genotipo		
	AA	AG	GG
Peso al nacimiento (kg)	4,22 ± 0,10	4,3 ± 0,07	4,23 ± 0,08
Crecimiento hasta el destete (kg)	8,76 ± 0,26	8,97 ± 0,20	8,96 ± 0,24
	Tipo de parto		
	Simple	Doble	Triple
Peso al nacimiento (kg)	4,85 ± 0,07a	4,25 ± 0,05b	3,65 ± 0,17c
Crecimiento hasta el destete (kg)	9.26 ± 0.19	8.77 ± 0.13	8.66 ± 0.48

Los factores sexo y tipo de parto resultaron significativos en el modelo lineal realizado para el fenotipo peso al nacimiento (Tabla 6). Las LSMeans mostraron

que los machos pesaban  $0,29 \pm 0,08$  kg más que las hembras de la raza Roya Bilbilitana, resultado similar al obtenido en Rasa aragonesa. Además, los corderos que nacen de parto simple pesan  $0,60 \pm 0,08$  Kg más que los de parto doble y, estos a su vez,  $0,60 \pm 0,07$  kg más que los provenientes de parto triple. No aparecieron partos cuádruples en Roya Bilbilitana

Para la GM los días de crecimiento fueron muy significativos ( $p < 0,001$ ), presentando una media de 39 días y una desviación estándar de 17,54- La desviación estándar (17,54 días) representa el 44,9% de la media (39 días), lo que evidencia una alta dispersión de los datos, explicando la alta significación. Por otra parte, los machos ganan en promedio  $0,47 \pm 0,21$  kg más que las hembras. Aunque los animales de parto simple parecían estar asociados con una mayor ganancia, los resultados no fueron significativos. Por último, el SNP tampoco fue significativo en Roya Bilbilitana

Finalmente se llevó a cabo otro análisis de asociación teniendo en cuenta las dos razas y e incluyendo la raza como efecto fijo. El efecto de la paridera se eliminó del modelo porque este no convergía al incluir dicha variable, debido a que no existían los mismos niveles de paridera en ambas razas. En este caso sólo el sexo y tipo de parto resultaron significativos para el peso al nacimiento, mientras que para el crecimiento medio desde el nacimiento al destete la raza, el sexo, el tipo de parto y los días en lactación fueron significativos. Sin embargo, el SNP no fue significativo.

En este trabajo no se ha encontrado una asociación significativa entre el polimorfismo analizado en el gen *CYP7B1* y los caracteres de crecimiento en corderos de las razas Rasa Aragonesa y Roya Bilbilitana. Una posible explicación es que los caracteres de crecimiento son de naturaleza poligénica, de modo que el efecto de un único polimorfismo puede ser demasiado pequeño para ser detectado con la potencia estadística disponible. Además, el tamaño muestral empleado es limitado, lo que reduce aún más la capacidad de detectar efectos de pequeña magnitud. No obstante, los genotipos se encuentran bien distribuidos en ambas razas, lo que constituye una base adecuada para futuros estudios con un mayor número de animales que permitan confirmar estos resultados. Finalmente, como nueva línea de investigación futura, se podría ampliar el análisis a otros polimorfismos del gen *CYP7B1* y de otros relacionados con el crecimiento, así como evaluar la interacción entre factores genéticos, ambientales y de manejo.

## 5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- No se detectó en ninguna de las dos razas una asociación significativa entre el genotipo del SNP (-63) y los caracteres de crecimiento estudiados, es decir, el peso al nacimiento y el crecimiento hasta el destete. A diferencia de los resultados observados en estudios anteriores en ovejas adultas de Rasa Aragonesa, este polimorfismo no ejercería un efecto directo sobre el crecimiento en los primeros días de vida.
- En ambas razas, los factores sexo y tipo de parto tuvieron un efecto significativo sobre el peso al nacimiento y la ganancia media. Los corderos machos y los nacidos de partos simples tuvieron mayores pesos y crecimientos. En el caso de la Rasa Aragonesa también lo tuvo el mes de paridera para el peso al nacimiento, ya que los corderos nacidos en verano presentaron mayores pesos. Para la ganancia media en la Raza Bilbilitana, resultó muy significativo el factor días de lactación. Esto confirma que las variables relacionadas con el manejo y las condiciones ambientales influyen de forma importante en el crecimiento de los corderos.
- Aunque el polimorfismo estudiado no mostró efectos significativos en este estudio, su posible asociación con caracteres de crecimiento y condición corporal en etapas posteriores de desarrollo de los animales sugiere que sigue siendo un candidato de interés en programas de selección asistida por marcadores (SAM).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Mamun, H. A., Kwan, P., Clark, S. A., Ferdosi, M. H., Tellam, R., & Gondro, C. (2015). Genome-wide association study of body weight in Australian Merino sheep reveals an orthologous region on OAR6 to human and bovine genomic regions affecting height and weight. *Genetics Selection Evolution*, 47, 66. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0142-4>
- Ancín, M., & Lana, P. (2018). Sostenibilidad económica en las explotaciones de ovino de carne de Navarra. *XLIII Congreso Nacional y XIX Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*, (págs. 69-75). Zaragoza .
- Ansia , I., Cabana, R., Regueira, R., Lamosa, S., Pereira, J. M., & Barrasa, M. (2008). Estudio de las condiciones de trabajo en explotaciones de ovino y caprino en Galicia. *Comunicaciones presentadas al XII Congreso Internacional de Ingeniería de Proyectos* (págs. 149-159). Celebrado en Zaragoza: Asociación Española de Ingeniería de Proyectos (AEIPRO).
- Bernués, A., Rodríguez-Ortega, Collado, M., Casasús , I., & Olaizola, A. M. (2018). Evaluación de sostenibilidad en ovino de carne . *Actas Del XLIII Congreso de La Sociedad Española de Ovinotenia y Caprinotecnia (SEOC)*, (págs. 29-45).
- Bravo Santillana, M., Iglesias Parro, M., & Palomo Guijarro, G. (2020). Situación del sector ovino y caprino en España. En J. M. Alonso Rodríguez, A. García Sánchez , & R. Martín Pérez , *Principales enfermedades infecciosas y parasitarias en el ganado ovino y caprino extensivo* (págs. 19-40). Universidad de Extremadura.
- Cachón , Q. F. (2009). *Estudios de asociación en genes candidatos para labio y paladar hendido no sindrómico en el estado de Chiapas*. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Calvo, J. H., Chantepie , L., Serrano, M., Sarto , M. P., Iguacel, L. P., Jiménez, M. Á., . . . Lahoz, B. (2020a). A new allele in the BMP15 gene (FecXR and FecXGR in Rasa Aragonesa sheep. *Theriogenology*, 144, 107-111. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.010>
- Calvo, J. H., Serrano, M., Tortereau, F., Sarto, P., Iguacel, L. P., Jiménez, M. A., . . . Lahoz, B. (2020b). Development of a SNP parentage assignment panel in some north-

- eastern spanish meat sheep breeds. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18, 1-8. Obtenido de <https://doi.org/10.5424/sjar/2020184-16805>
- Dai, D., Mills , P. B., Footitt , E., Gissen , P., McClean , P., Stahlschmidt, J., . . . Clayton, P. T. (2014). Liver disease in infancy caused by oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase deficiency: successfull treatment with chenodeoxycholic acid. *Journal of inherited metabolic disease*, 37, 851-861.
- Delgado Román , L. C., & Gutiérrez Martínez, P. (2009). *Manual práctico de manejo de una explotación de ovino de carne*. Junta de Castilla y León: Servicio de Formación Agraria e Iniciativas.
- Duarte Silva Lupi de Ordaz Caldeira , T. M. (2016). *Caracterización de las curvas de crecimiento del ovino segureño en sistemas convencionales y orgánicos*. [Tesis Doctoral]. Universidad de Córdoba.
- Folch, J., & Alabart , J. L. (2000). Características reproductivas de la oveja Rasa Aragonesa . *Ovis*, 68, 27-36.
- Forero , F. J., Venegas , M., Alcalde , M. J., & Daza, A. (2017). Peso al nacimiento y al destete y crecimiento de corderos Merinos y cruzados con Merino Precoz y Ile de France: Análisis de algunos factores de variación. *Archivos de zootecnia*, 66 (253), 89-97.
- Fox, J. (2009). *R-4.5.0. [Rcmdr: R Commander]*. Obtenido de <https://cran.r-project.org/>
- Gabiña , D. (2006). The future of sheep and goat production in Europe: prospects within the framework of new supportregimes and market conditions. *Small Ruminant Research*, 62, 149. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.08.009>
- Garnier, J. P. (2010). Análisis del mercado mundial de la carne de ovino . *Eurocarne*, 184, 115-122.
- Ghasemi, M., Zamani, P., Vatankhah, M., & Abdoli, R. (2019). Genome-wide associatin study of birth weight in sheep. *Animal*, 13(9), 1797-1803. Obtenido de <https://doi.org/10.1017/S1751731118003610>.
- Guillemot-Legrís, O., Mutemberezi , V., Cani, P. D., & Muccioli, G. G. (2016). Obsity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma . *Scientific Reports*, 6 (1), 19694.
- Interovic . (2006). *Guías De Prácticas Correctas De Higiene Helicicultura* 4-84.

- Jiménez , M. A., & Serrano, M. (Noviembre de 2024 ). Presentación del 31 catálogo de reproductores de la raza Rasa Aragonesa . *Reunión técnica de la UPRA-Grupo Pastores*.
- Kenyon , P. R., Maloney, S. K., & Blache, D. (2014). Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 57 (1), 38-64.
- Khazaei-Koohpar, H., Gholizadeh, M., Hafezian, S. H., & Esmaeili-Fard, S. M. (2024). Weighted single-step genome-wide association study for direct and maternal genetic effects associated with birth and weaning weights in sheep. *Scientific Reports*, 14, 13120. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63974-0>
- Kizilaslan , M., Arzik , Y., White , S. N., Piel , L. M., & Cinar , M. U. (s.f.). Genetic parameters and genomic regions underlying growth and linear type traits in Akkaraman sheep. *Genes*, 13 (8), 1414.
- Lakhssassi, K., Meneses, C., Sarto, M. P., Serrano, M., & Calvo, J. H. (2023). Genome-wide analysis reveals that the cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1 gene is implicated in growth traits in Rasa Aragonesa ewes. *Animal*, 17 (10), 100975.
- LGC Genomics . (2013). *KASP genotyping chemistry. User guide and manual*. Obtenido de <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-genotyping-chemistry-User-guide.pdf>
- Li, C. L., Li, J. Y., Wang, H. F., Zhang, R., An, X. J., Yuan, C., . . . Yue, Y. J. (2023). Genomic selection for live weight in the 14th month in Alpine Merino sheep combining GWAS information. *Animals*, 13(22), 3516. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/ani13223516>
- Linamo , A. E., & Neeteson-van Nieuwenhoven, A. M. (2003). *The economic value of livestock production in the European Union*. Farm Animal Industrial Platform.
- Macé, T., González-García, E., Carrière, F., Douls, S., Foulquié, D., Robert-Granié, C., & Hazard, D. (2019). Intra-flock variability in the body reserve dynamics of meat sheep by analyzing BW and body condition score variations over multiple production cycles . *Animal*, 13 (9), 1986-1998.
- Martínez-Gil , N., Patiño-Salazar , J. D., Rabionet , R., Grinberg, D., & Balcells , S. (2003). Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 15 (1), 29-39.



- Martínez-Royo, A., Jurado, J. J., Smulders, J. P., Martí, J. I., Alabart, J. L., Roche, A., . . . Calvo, J. H. (2008). A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*, 39, 294-297. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x>
- Matika, O., Riggio, V., Anselme-Moizan, M., Law, A. S., Pong-Wong, R., Archibald, A. L., & Bishop, S. C. (2016). Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and in vivo carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs. *Genetics Selection Evolution*, 48, 11.
- Menéndez-Buxadera, A., Serradilla, J. M., & Molina, A. (2017). *Componentes de (co)varianza del efecto de estrés térmico sobre el peso al nacer y sobre la ganancia media diaria en las dos primeras semanas en ovino Merino español: resultados preliminares*. Universidad de Córdoba.
- Menéndez-Buxadera, A., Serradilla, J. M., Valera, M., & Molina, A. (2003). Parámetros genéticos del peso vivo en los primeros 75 días de edad en ovino merino español. *LTEA, Extra Nº. 24(II)*, 5 19-52 1.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023). *Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España*. Obtenido de <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas>
- (ORDEN DRS/467/2016, de 5 de mayo, por la que se adopta una decisión favorable en relación con la solicitud de modificación del pliego de condiciones de la indicación geográfica protegida "Ternasco de Aragón"). *Boletín Oficial de Aragón*, 101, de 27 de mayo de 2016. Obtenido de <https://www.boa.aragon.es/cgi-bin/EBOA/BRSCGI?CMD=VEROBJ&MLKOB=909713024444>
- P. Petrovic, M., Ruzic Muslic, D., Caro Petrovic, V., & Maksimovic, N. (2011). Influence of environmental factors on birth weight variability of indigenous Serbian breeds of sheep. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4673-4676.
- Pardos, L., Lahoz, B., Bernués, A., Alabart, J. L., & Fantova, E. (2022). Evaluación integral de la sostenibilidad de la producción ovina de carne en Aragón. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 118(4): 594-612. Obtenido de <https://doi.org/10.12706/itea.2022.003>
- Pardos, L., Fantova, E., Folch, J., Alabart, J. L., Lahoz, B., & Equipo de Veterinarios de UPR. (2012). Influencia económica de la prolificidad en ovino de carne. *Revista Albéitar*, 157, 16-17.

- Postiglioni, A., García , C. B., Rincón , G., & Arruga, M. V. (2010). ¿Qué es la impronta genética? *Albéitar: publicación veterinaria independiente*, (130), 42-43.
- Real Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto . (2023). *Roya Bilbilitana. Ganado ovino*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación .
- Real Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto. (2023). *Rasa Aragonesa. Ganado ovino*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Rodríguez-Ortega , T., Collado, D. M., Pueyo, I. C., Tolosana , A. O., & Jal, A. B. (2018). Análisis multi-actor de la sostenibilidad y viabilidad del sector ovino de carne en Aragón. *Pastoralismo y vías pecuarias: conectando tradición e innovación* (págs. 339-347). Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- Romero, O., & Bravo, S. (2012 ). *Mejoramiento genético en ovinos. Temuco: Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, nº. 245. p. 141-155. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7532>
- Safari, E., Fogarty, N. M., & Gilmour, A. R. (2005). A review of genetic parameter estimates for wool, growth, meat and reproduction traits in sheep. *Livestock Production Science*, 92(3), 271-289. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.09.003>.
- Sánchez, M. (2019). *Tierra de mujeres: Una mirada íntima y familiar al mundo rural* . Seix Barral.
- Stiles, A. R., McDonald, J. G., Bauman, D. R., & Russell , D. W. (2009). CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (42), 28485-28489.
- Stritzke, D. J., & Whiteman, J. V. (1982). Lamb growth patterns following different seasons of birth. *Journal of Animal Science*, 55 (5), 1002-1007. Obtenido de <https://doi.org/10.2527/jas1982.5551002x>
- Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2023). *CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR OVINO Y CAPRINO EN ESPAÑA: ORIENTACIÓN PRODUCTIVA CARNE*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Tao , L., He , X. Y., Pan , L. X., Wang, J. W., Gan, S. Q., & Chu, M. X. (2020). Genome-wide association study of body weight and conformation traits in neonatal sheep. *Animal genetics*, 51 (2), 336-340.

- Viagen Biotech, Inc. . (2007). *DirectPCR Lysis Reagent (Tail): Cat # 101-T, 102-T*. Obtenido de <https://www.viagenbiotech.com/>
- Wu, Z., Martin, K. O., Javitt, N. B., & Chang, J. Y. (1999). Structure and functions of human oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *Journal of lipid research*, 40 (12), 2195-2203.
- Young, J. M., Thompson, A. N., & Kennedy, A. J. (2010). Bioeconomic modelling to identify the relative importance of a range of critical control points for prime lamb production systems in south-west Victoria. *Animal Production Science* 50 (8), 748-756.
- Zhang, L., Liu, J., Zhao, F., Ren, H., Xu, L., Lu, J., . . . Du, L. (2013). Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *PloS ONE*, 8(6), e66569.
- Zygoyiannis, D. (2006). Sheep production in the world and in Greece. *Small Ruminant Research*, 62, 143-147. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.043>