

Adolfo Laviña Gómez

Identificación de la delección FecXR
del gen ovino BMP15 en la Raza Rasa
Aragonesa: Su implicación en la
mejora genética de la prolificidad y
su difusión en la cabaña ganadera

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es
Monteagudo Ibáñez, Luis Vicente

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN FECXR DEL GEN OVINO
BMP15 EN LA RAZA RASA ARAGONESA: SU IMPLICACIÓN
EN LA MEJORA GENÉTICA DE LA PROLIFICIDAD Y SU
DIFUSIÓN EN LA CABAÑA GANADERA

Autor

Adolfo Laviña Gómez

Director/es

Monteagudo Ibáñez, Luis Vicente

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2012



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**Identificación de la delección $FecX^R$
del gen ovino BMP15 en la Raza Rasa
Aragonesa: su implicación en la
mejora genética de la prolificidad y su
difusión en la cabaña ganadera.**

TESIS DOCTORAL

**Doctorando:
Adolfo Laviña Gómez**

**Director:
Dr. Luis V. Monteagudo Ibañez**

Zaragoza, 2012

AGRADECIMIENTOS

Desde que se empezó a gestar la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, hace ahora algo más de dos años, siempre he pensado que lo que hacía era recoger el trabajo de mucha gente.

En primer lugar quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a Luis V. Monteagudo, Director de la Tesis Doctoral, por haber confiado siempre en la posibilidad de hacerla y finalmente haber hecho posible la realización de la misma.

Asimismo hay que honrar el tributo que se merecen otras dos personas más que, junto a Luis, pusieron en marcha la idea inicial con la certeza de que se descubriría algo: Isidro Sierra y Ricardo Ponz.. Una vez que los hechos les han dado la razón hay que decirlo como se merecen.

A continuación tengo que agradecer todo el trabajo realizado por la familia de ANGRA. Gracias a Angel, Elena, Pablo, Pilar y Alicia por el trabajo en el campo haga frío o calor y por el trabajo en la oficina. Gracias sobre todo a Luis Marcén. Tendría que dárselas por muchas cosas personales y profesionales pero se la voy a dar aquí por que fue él quien me dio el impulso definitivo que necesitaba para embarcarme en el proyecto.

Quiero acordarme también de dos personas: Teresa Tejedor involucrada desde el principio con el trabajo y cuyos conocimientos de estadística han sido imprescindibles para esta tesis y Sheila Murillo, ex compañera de ANGRA, que sacó adelante el análisis del mayor volumen de muestras en los momentos fundamentales del proyecto.

Finalmente pero no por eso menos importante, querría agradecer en las personas de José Luis Ubeda y Luis Casasnovas el trabajo diario de todos los ganaderos a los que servimos y de los que tanto aprendemos.

Para Blanca

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.A. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA PROLIFICIDAD OVINA Y OTROS CARACTERES.

1.A.1. CARACTERES CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS.....	2
1.A.2. HEREDABILIDAD DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS.....	4
1.A.3. PROLIFICIDAD OVINA.....	6
1.A.4. GENES MAYORES.....	7
1.A.4.1. <u>Genes mayores y lana</u>	8
1.A.4.2. <u>Genes mayores y producción cárnica ovina</u>	9
1.A.4.3. <u>Genes mayores y resistencia a enfermedades ovinas</u>	9
1.A.4.4. <u>Genes mayores y caracteres reproductivos ovinos</u>	10
1.A.4.4.1. Ovulación y Prolificidad.....	10
1.A.4.4.2. Estacionalidad	21

1.B. LA RAZA RASA ARAGONESA.

1.B.1. ORIGENES Y DESCRIPCION HISTORICA	24
1.B.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA. CENSOS Y SITUACIÓN ACTUAL....	24
1.B.3. DESCRIPCIÓN RACIAL.....	25
1.B.4. DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS DE EXPLOTACIÓN Y SU IMPACTO ECOLÓGICO	26
1.B.5. DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS.....	27
1.B.6. DESCRIPCIÓN DE LAS REPERCUSIONES SOCIALES ACTUALES Y POTENCIALES	27

<u>1.C. EL ESFUERZO DE LA MEJORA EN LA RAZA RASA ARAGONESA</u>	29
---	----

<u>1.D. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO</u>	32
--	----

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

<u>2.A. MATERIAL ANIMAL</u>	35
--	----

2.A.1. FASE DE DETECCIÓN DEL ALELO MUTANTE.....	35
---	----

2.A.2 FASE DE DIFUSIÓN DEL ALELO MUTANTE.....	35
---	----

2.A.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ALELO MUTANTE SOBRE LA PROLIFICIDAD.....	35
---	----

<u>2.B. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN DEL DNA</u>	36
--	----

<u>2.C. PLAN DE DIFUSION DEL ALELO FecX^R</u>	38
--	----

2.C.1. ETAPA PRELIMINAR.....	38
------------------------------	----

2.C.2. ETAPA INICIAL.....	38
---------------------------	----

2.C.3. ETAPA DE MANTENIMIENTO Y DIFUSION INTERNA	38
--	----

<u>2.D. INSEMINACION ARTIFICIAL</u>	39
--	----

<u>2.E. ESTUDIO DE LA CALIDAD SEMINAL DE LOS MACHOS PORTADORES</u>	40
---	----

<u>2.F. RECOGIDA DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE LOS ANIMALES PORTADORES</u>	41
--	----

<u>2.G. IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES PORTADORES</u>	42
--	----

<u>2.H. ESTUDIO ESTADÍSTICO</u>	43
--	----

3. RESULTADOS

<u>3.A. HALLAZGOS INICIALES</u>	45
--	----

<u>3.B. RESULTADOS DE LA BUSQUEDA EN OTRAS GANADERÍAS</u>	50
--	----

<u>3.C. ESTABLECIMIENTO DEL PLAN DE DIFUSIÓN DEL ALELO FecX^R</u>	52
--	----

3.C.1. DESARROLLO	53
--------------------------------	----

3.C.2. INSEMINACIONES ARTIFICIALES	54
---	----

3.C.3. MUESTRAS ANALIZADAS Y RESULTADOS DEL CONTROL DE LA HERENCIA DE FecX^R	59
---	----

<u>3.D. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ALELO MUTANTE SOBRE LA PROLIFICIDAD</u>	62
---	----

3.D.1. EFECTO SOBRE LA PROLIFICIDAD GENERAL	62
--	----

3.D.2. EFECTO SOBRE LA PROLIFICIDAD EN EL PRIMER PARTO	63
---	----

3.D.3. EFECTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL TIPO DE PARTO EN TODA LA SERIE HISTÓRICA DE DATOS RECOPIADOS	67
---	----

3.E. <u>OTROS EFECTOS: MORTALIDAD DE LOS CORDEROS Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LAS MADRES</u>	68
3.F. <u>DIFUSIÓN DE FecX^R EN OTRAS RAZAS</u>	73
4. <u>DISCUSIÓN SOBRE LA APLICACION PRACTICA DE FecX^R</u>	76
5. <u>CONCLUSIONES</u>	83
6. <u>RESUMEN</u>	86
7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	90
8. <u>ANEXO: TRABAJOS REALIZADOS</u>	103

1. INTRODUCCION

1.A ASPECTOS GENETICOS DE LA PROLIFICIDAD OVINA

1.A.1. CARACTERES CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS

De acuerdo con Falconer (1986), en genética se diferencian dos tipos de caracteres: caracteres cualitativos y caracteres cuantitativos o métricos.

Un carácter cualitativo es aquel que permite clasificar los individuos en diferentes categorías o clases fenotípicas (variabilidad discontinua). Es, por ejemplo, el caso de los diferentes grupos sanguíneos a los que se asignan los individuos de las especies animales.

Por el contrario, los caracteres cuantitativos varían sin discontinuidades (variabilidad continua). Como ejemplo podemos tomar la alzada a la cruz o el peso vivo de los diferentes individuos.

Las diferencias entre ambos tipos de caracteres son evidentes:

Caracteres cualitativos	Caracteres cuantitativos
<ol style="list-style-type: none"> 1. Caracteres de clase. 2. Variación discontinua, diferentes clases fenotípicas. 3. Efectos patentes de un solo gen. Genes mayores. 4. Se estudian apareamientos individuales y su progenie. 5. El análisis es por medio de cálculos de proporciones y relaciones. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Caracteres de grado. 2. Variación continúa. Las determinaciones fenotípicas muestran un espectro o gama. 3. Control poligénico, los efectos de los genes individuales son difícilmente detectables. Genes menores. 4. Se estudian poblaciones y todos los tipos de cruzamientos. 5. El análisis es de tipo estadístico, proporcionando cálculos aproximados de los parámetros de las poblaciones

Desde comienzos del siglo XX, la diferencia entre ambos tipos de caracteres condujo a la polémica entre los científicos dedicados al estudio en caracteres cualitativos (especialistas en “mendelismo”, y por extensión en “mendelismo complejo”) y los especialistas en genética cuantitativa, continuadores de la obra de Bateson, y

responsables a lo largo de los últimos 75 años de la mejora genética animal. Hasta no hace mucho tiempo, ha sido perceptible la brecha entre ambos grupos, que sólo las nuevas metodologías en genómica han comenzado a estrechar actualmente, al permitir análisis automatizados de los genomas completos de los individuos.

¿Cómo se ha explicado tradicionalmente que la variación discontinua intrínsecamente causada por la segregación genética se tradujera en la variación continua de los caracteres cuantitativos?. Mediante dos argumentos:

-En primer lugar se consideró que los caracteres cuantitativos están determinados por un número elevado de genes aditivos no ligados con un efecto infinitesimal cada uno (Modelo Infinitesimal de Fisher). Este modelo prescindió durante más de medio siglo de la identificación de cada uno de estos genes.

-En segundo lugar, en un carácter cuantitativo la variación continua fenotípica que observamos es debida a la superposición de la verdadera variación continua producida por causas ambientales (no observada) sobre la variación discontinua genética (no observada). (Falconer, 1986) (Figura 1)

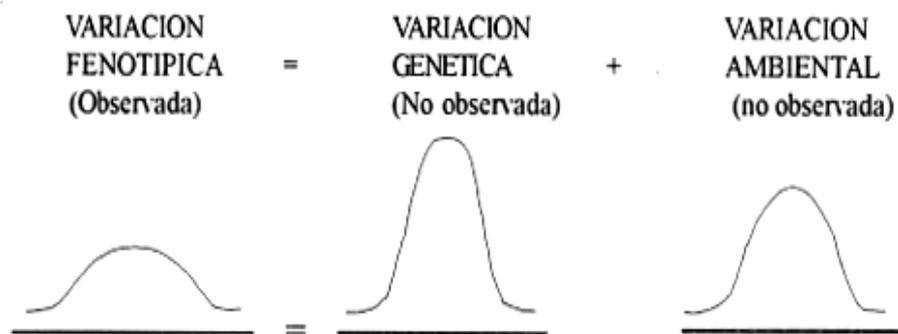


Figura 1

1.A.2. APROXIMACION A LA HEREDABILIDAD DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS.

Denominamos heredabilidad de un carácter a la importancia relativa de la herencia en determinar sus valores fenotípicos. Sin embargo, hay dos significados diferentes de heredabilidad. Un carácter puede ser hereditario por estar determinado por el genotipo o por que es transmitido de los padres a sus descendientes (valor reproductivo). Al primer significado se le conoce como heredabilidad en sentido amplio o grado de determinación genética, diferenciando exclusivamente este de los efectos ambientales. Al segundo se le conoce simplemente como heredabilidad (o heredabilidad en sentido estricto) y está definido por el cociente entre la varianza aditiva (V_A) y la varianza fenotípica (V_P), que expresa el grado en el cual los fenotipos son determinados por los genes transmitidos por los progenitores excluyendo, además de los factores ambientales, los efectos de la dominancia entre alelos y de la interacción entre loci (Falconer, 1986).

La heredabilidad de un carácter cuantitativo es por lo tanto una de sus propiedades más importantes. Expresa la proporción de varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes que es lo que determina el grado de parecido entre parientes. Por eso tiene tanta importancia en los programas de mejora de caracteres cuantitativos: su papel predictivo indica la confiabilidad del valor fenotípico (que es lo único que tradicionalmente hemos podido medir) como indicación del valor reproductivo (que determina la influencia sobre la siguiente generación). Es decir, cuando escogemos los individuos que serán los progenitores de la siguiente generación por sus valores fenotípicos, su influencia sobre ella será mayor cuanto mayor sea la heredabilidad del carácter en cuestión.

De hecho, una de las definiciones clásicas de la heredabilidad (h^2) se basa precisamente en su relación con el progreso genético alcanzado en los procesos de selección, y se centra en la interpretación de la igualdad (Nicholas, 1987):

$$R = h^2 S$$

En esta ecuación, S es el diferencial de selección o superioridad de los padres seleccionados (definida como la diferencia entre la media de los padres seleccionados y la media de la población parental antes de la selección). Por su parte, R es la respuesta a la selección y es igual a la diferencia entre la media de la descendencia y la media de la población parental antes de la selección (Nicholas, 1987). La heredabilidad puede tener en teoría valores entre 0 y 1. En su valor máximo ($h^2=1$), $R=S$, y por lo tanto todo el diferencial de selección se transmitiría a la descendencia, cuya media sería igual a la media del grupo de reproductores seleccionados.

En el extremo opuesto del rango, con $h^2=0$, la respuesta a la selección sería nula ($R=0$), independientemente del valor del diferencial de selección aplicado. Estaríamos por lo tanto ante un carácter cuya mejora por selección genética sería técnicamente imposible.

La figura 2 (tomada de Nespolo, 2003) ilustra claramente la relación existente entre la heredabilidad y la respuesta a la selección: Con valores de h^2 cercanos a 1 la descendencia presenta valores muy cercanos a los del grupo selecto, mientras que con los cercanos a 0, el valor de la descendencia es similar al de la media de toda la población en la generación anterior.

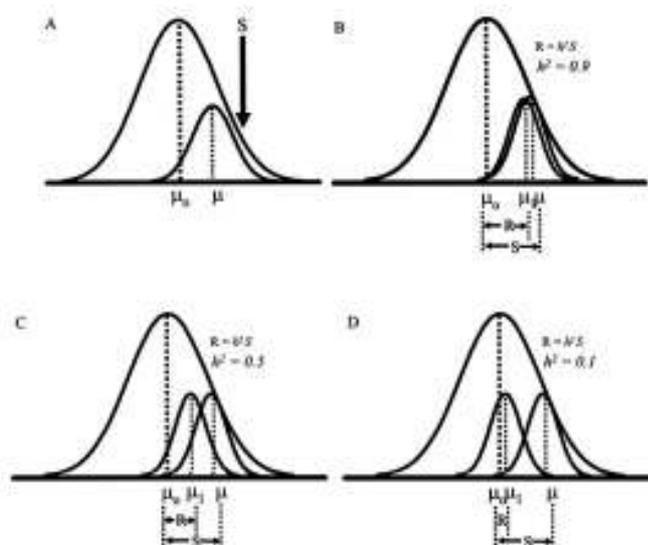


Figura 2 (Tomada de Nespolo, 2003): μ_0 = media de la población parental antes de selección; μ = media del grupo de reproductores seleccionados; μ_1 = media de la descendencia.

Ciertamente la heredabilidad no depende sólo del carácter, sino también de la población y del ambiente que rodea a los individuos, por lo que la heredabilidad de un carácter se tiene que referir a una población determinada en unas condiciones ambientales particulares.

Sin embargo, en general, los caracteres más ligados con la aptitud reproductiva (prolificidad, etc.) tienen las heredabilidades más bajas y por lo tanto son más difíciles de mejorar por selección (Falconer, 1986).

1.A.3. PROLIFICIDAD OVINA

Precisamente la prolificidad ovina es un carácter de baja heredabilidad. Las estimaciones realizadas por Altarriba et al. (1998) han proporcionado un valor de 0.077 para la heredabilidad de la prolificidad en la raza ovina Rasa Aragonesa, lo que explica las dificultades de la selección genética para este carácter.

Además hay que añadir otras dos circunstancias que dificultan su mejora por selección:

1- En ovino las condiciones de manejo son muy variables (alimentación, etc.), lo que incrementa la varianza ambiental y por lo tanto reduce la heredabilidad.

2 -El carácter prolificidad en la especie ovina tiene su expresión fenotípica en una escala categórica, no continua. En efecto, la prolificidad de una oveja en un parto determinado es de 1, 2 ó 3 corderos nacidos, siendo además desigual la incidencia de cada categoría. Por tanto se trata de un carácter cuya manifestación aporta menor información acerca de las causas determinantes, ambientales y genéticas, que un carácter continuo. Este hecho dificulta el análisis genético de los datos y explica el hecho de que tanto el desarrollo metodológico de esta parcela de la genética cuantitativa, como su aplicación a la mejora animal, se encuentren con mayores dificultades (Altarriba et al., 2001).

El elemento básico para el análisis genético de un carácter categórico es la asunción del modelo umbral. Según este, el conjunto de causas genéticas y ambientales originan una continuidad subyacente (invisible), con un umbral que impone una discontinuidad en la expresión visible. Cuando la variable subyacente se encuentra por debajo de este nivel umbral, el individuo tiene una forma de expresión fenotípica, por ejemplo de un cordero; cuando se encuentra por encima del umbral, el individuo tiene otra expresión fenotípica, dos corderos, etc. Este es un planteamiento realista que permite estudiar genéticamente un carácter categórico con las bases generales de la herencia cuantitativa y por tanto del modelo infinitesimal (Altarriba et al., 2001).

Sin embargo, el planteamiento del modelo umbral conlleva limitaciones:

-En primer lugar, es imposible conocer la distribución de la variable subyacente.

-En segundo lugar, todos los valores se estimarán referidos a un umbral, que únicamente será localizable a partir de las incidencias de las distintas categorías en términos de desviaciones típicas residuales. La consecuencia final de estos requisitos del modelo umbral es que los valores genéticos (y ambientales) no permitirán una interpretación directa en la escala categórica (Altarriba et al, 2001).

1.A.4. GENES MAYORES

La principal diferencia entre genes relacionados con los caracteres mendelianos (o cualitativos) y los relacionados con los caracteres métricos (o cuantitativos) reside en la magnitud de sus efectos respecto a otras fuentes de variación.

De hecho, un gen con un efecto lo suficientemente grande para causar una discontinuidad identificable en un carácter cuantitativo, a pesar de las segregaciones de otros genes y de la variación ambiental, puede ser estudiado usando métodos mendelianos. Este tipo de gen es lo que se conoce con el nombre de gen mayor. (Falconer, 1986)

¿Cómo se detecta un gen mayor?

Mediante experimentos de segregación, analizando los datos de cruzamientos y su descendencia respecto a un carácter concreto. La segregación de un gen mayor debe provocar a su vez una segregación en el valor de ese carácter en los individuos de la progenie, de modo que los valores observados permitan probar la hipótesis de la existencia de un gen mayor que explique gran parte de las variaciones de dicho carácter.

Desde 1982 cuando se descubrió el primer gen mayor que controla un carácter cuantitativo (Piper and Bindon, 1982), se han descubierto numerosos genes de este tipo que afectan a distintos caracteres de interés económico en ganado ovino.

1.A.4.1. Genes mayores y lana:

La búsqueda de genes mayores que afecten a caracteres de importancia económica también se ha desarrollado en el sector de la lana ovina, identificándose genes mayores en caracteres tales como la pigmentación (gen agouti) (Parsons et al., 1999), la calidad de la lana y el tipo de queratina (muy importante para la morfología de la fibra de lana).

Desde un punto de vista económico, los dos genes mayores más importantes que actúan sobre las características de las fibras son los genes HH1 y HH2 (“halo-hair1 y halo-hair 2”), implicados en la medulación extrema de las fibras, idónea para la fabricación de alfombras. Una raza en Nueva Zelanda, la Drysdale (con alrededor de 600000 cabezas) ha multiplicado el alelo HH1N, implicado en esta medulación, siendo el mejor ejemplo de uso a gran escala de un gen mayor que controla un carácter productivo en ovino (Purvis and Franklin, 2005)

Recientemente se ha sugerido la existencia de un gen mayor que controlaría la capacidad de algunas razas ovinas de desprenderse de la lana en primavera, carácter que puede ser importante en lugares donde el coste del esquila sea elevado. (Pollott, 2011)

1.A.4.2. Genes mayores y producción cárnica ovina:

Existen varios ejemplos:

1.A.4.2.1.- Gen Callipyge: se localiza en el cromosoma 18 con una herencia muy compleja. Encontrado en la raza Dorset Americana, provoca hipertrofia muscular, lo que origina un rendimiento mayor de la canal, núcleo de chuleta más grande, mayor porcentaje de magro, área de la pierna más desarrollada, mayor eficiencia de la alimentación del animal con menor consumo diario de pienso. Sin embargo la carne es dura, lo que anula comercialmente buena parte de esas ventajas (Georges et al., 2003; Cockett et al., 2005).

1.A.4.2.2.- Gen Carwell o REM (rib-eye muscling): también se localiza en el cromosoma 18 y también con una herencia que liga la expresión del gen al sexo que lo trasmite. Fue encontrado en la población de Poll Dorset de Australia y Nueva Zelanda. Afecta a las dimensiones del músculo longissimus dorsi y al área del núcleo de la chuleta. (Cockett et al. 2005)

1.A.4.2.3.- Gen Texel: existe en varias poblaciones de la Raza Texel de Bélgica, Australia y Nueva Zelanda. Es codominante y provoca una hipertrofia muscular generalizada (Broad et al. 2000; Marshall et al. 1999; Charlier et al. 1996). Posteriormente se identificó la mutación causal en el gen que codifica la miostatina (Gen GDF8) situado en el cromosoma 2 cuya consecuencia es la inhibición de la expresión de la miostatina resultando una hipertrofia muscular. (Clop et al, 2006)

1.A.4.3. Genes mayores y resistencia a enfermedades ovinas:

El caso paradigmático es el gen PrP (Prion Protein) que controla la sensibilidad o resistencia a scrapie. Descubierta en los años 90, es sin duda el gen tipificado en más ejemplares ovinos (Dawson et al 1998).

Respecto a la resistencia a otras enfermedades infecciosas y parasitarias, se han encontrado QTL's (Quantitative Trait Locus) pero no genes mayores (San Primitivo et al. 2006).

Sí que se han conocido mutaciones causales que provocan enfermedades genéticas y que conociéndolas permiten su detección. Es el caso de la microftalmia que produce corderos ciegos debido a un gen recesivo (Becker et al. 2010).

1.A.4.4. Genes mayores y caracteres reproductivos ovinos:

1.A.4.4.1. Genes mayores implicados en la ovulación y la prolificidad ovina.

En 1980, Piper y Bindon presentan un trabajo en un congreso de genetistas con la transmisión de la prolificidad observada en un rebaño de Merinos Booroola. Concluían que la elevadísima prolificidad de esos animales podría deberse en parte a la acción de un gen mayor que afectaba la tasa de ovulación. Por primera vez, se sugería la existencia de un gen mayor sobre la prolificidad.

Hicieron falta veinte años para identificar la mutación causal. (Piper and Bindon 1982; Crawford et al. 1993; Lanneluc et al. 1994; Montgomery et al. 1993; Souza et al. 2001; Wilson et al, 2001; Mulsant et al. 2001). Se trata de una mutación en el gen que codifica el receptor tipo 1B de la 'Bone Morphogenetic Protein' (BMPR-1B) que se localiza en el cromosoma 6 ovino. Concretamente en la base 746 de la región codificante (A746G) cuyo resultado es un cambio en la secuencia aminoacídica, en la posición 249 de la proteína madura (dominio quinasa intracelular del receptor), pasando de glutamina en el tipo salvaje a arginina en los animales portadores de la mutación.

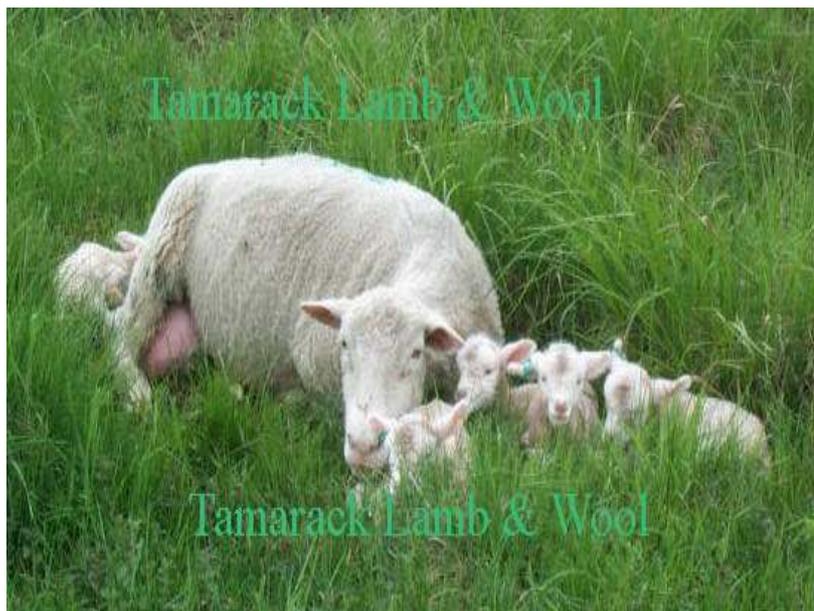


Figura 3: oveja Merino Booroola con una camada de cinco corderos

Junto a la tasa de ovulación, la mortalidad embrionaria es el otro componente principal de la prolificidad. Sin embargo, y aunque existe una variabilidad fenotípica importante, la heredabilidad de la mortalidad embrionaria es muy baja y no se ha encontrado ningún gen mayor ni QTL's para este carácter (Bolet, 1986).

Debido a la no linealidad de la relación entre tasa de ovulación y mortalidad embrionaria, el efecto de un gen mayor de ovulación sobre la prolificidad es más fuerte en razas de bajo nivel de ovulación. De hecho en este caso, el análisis del tamaño de camada es suficiente para demostrar inicialmente una herencia mixta (poligénica más gen mayor) mientras que en razas más prolíficas se hacen necesarios datos de ovulación (Bolet, 1986).

En función del estado actual de los conocimientos sobre cada uno de ellos, podemos clasificar los distintos genes mayores con efecto sobre la ovulación ovina en cuatro grupos:

1.- Genes localizados con mutaciones causales identificadas.

Por el momento se conocen tres genes: el gen que codifica el receptor tipo 1B de la 'Bone Morphogenetic Protein (BMPR1b), el gen de transformación del crecimiento

denominado Proteína morfogenética del hueso 15 (Bone Morphogenetic protein 15 ó BMP15) y el gen del factor 9 de diferenciación de crecimiento (Growth Differentiation factor-9, GDF9).

Los tres genes pertenecen a la misma vía metabólica de control de la ovulación. BMP15 y GDF9 son de la familia de los TGF β (factores de transformación del crecimiento β , o transforming growth factor β) y BMPR1b codifica precisamente un receptor de TGF β .

Aunque no se ha llegado a esclarecer completamente el papel biológico de los genes BMP15 y GDF9, se sabe que intervienen en la regulación de las funciones de las células de la granulosa ovárica (McNatty et al., 2005).

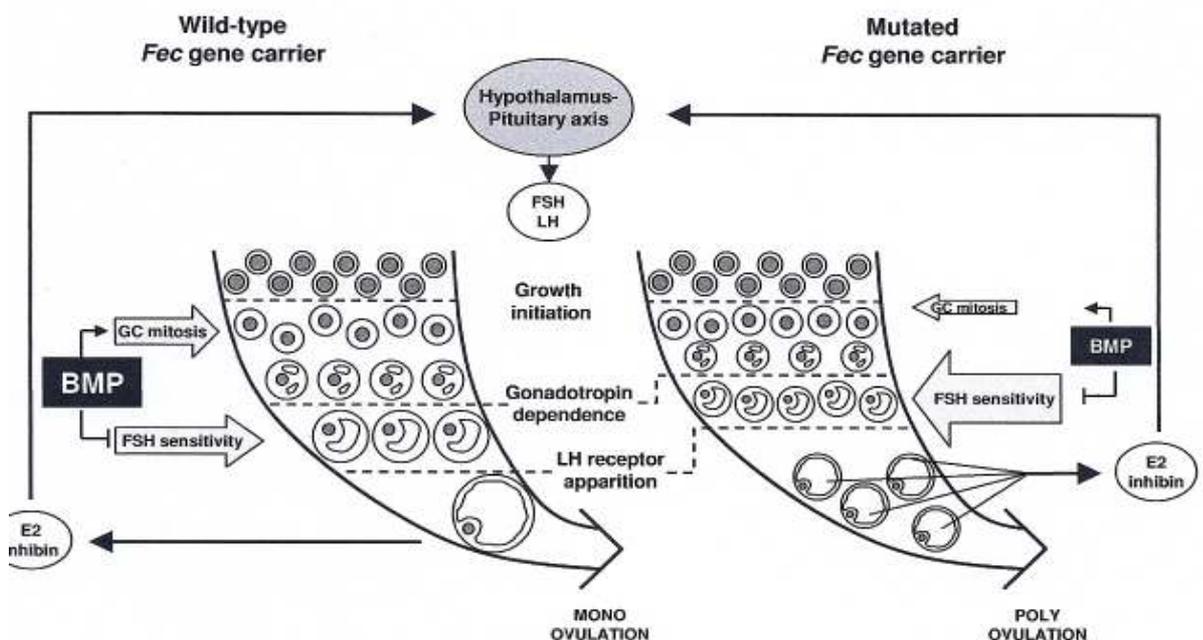


Figura 4: (Tomada de Fabre et al., 2006) Representación esquemática de los efectos de una mutación en un gen *Fec* en la foliculogénesis y tasa de ovulación en ovino.

BMPR1b se sitúa en el cromosoma 6 y en el que se conoce la mutación Booroola. El gen BMP15 está ligado al cromosoma X y se han localizado en el diferentes variantes implicadas en incrementos de prolificidad en las razas Inverdale, Hanna, Belclare, Cambridge y Lacaune. Por su parte, GDF9 está localizado en el cromosoma 5, existiendo en la raza Galway una mutación del mismo que se asocia igualmente a

incrementos de la prolificidad (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001; Davis et al, 2001; Galloway et al., 2000; Hanrahan and Owen, 1985; Hanrahan *et al.*, 2004).

2.- Genes localizados por su estrecho ligamiento a marcadores genéticos pero no identificados todavía.

Es el caso del gen Lacaune autosomal localizado en el cromosoma 11 y para el cual hay 7 marcadores próximos que permiten definir el haplotipo de los animales portadores de la mutación. (Bodin et al., 2002; Lecerf et al., 2002)

3.-Genes señalados por resultados de análisis estadísticos.

Como ejemplos los genes Woodlands, Metherell, Thoka y Wishart. Se ha podido deducir que Woodlands y Metherell están en el cromosoma X pero son distintos de BMP15 aunque no se sabe si son distintos entre ellos o son el mismo. (Davis et al., 2001; Jonmundsson et al. 1985; Davis et al 2006).

4.- Genes sugeridos por observaciones de altas tasas de ovulación o de tamaños de camada extremos y por una transmisión particular entre animales emparentados.

Son los casos de los genes Olkuska, Loa, Belle-Ile, Chios, Davis, Booroola2. (Radomska et al., 1988; Jonmundsson et al., 2003; Malher and LeChere, 1998; Davis, 2005)

Sin ánimo de presentar una descripción exhaustiva, pasamos a continuación a señalar los aspectos más importantes de estos genes:

1. BMPR1B. Este es el gen comúnmente llamado Booroola (FecB). Fue el primer gen mayor descubierto (Piper and Bindon 1982; Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001). Corresponde a una mutación en un único nucleótido en un receptor del 'Bone Morphogenetic Protein' (BMPR-1B), que puede ser detectada por varios procedimientos.

Actualmente existen diferentes métodos para su genotipado en Australia, Francia o Nueva Zelanda. En Nueva Zelanda el genotipado se realiza mediante un kit de detección de varios genes mayores, QTLs y marcadores para el test de paternidad. (Genomz DNA Testing Laboratory).

En los últimos años, muestras de varias razas prolíficas (entre ellas la Gallega), fueron genotipadas para esa mutación, que se encontró en segregación en las poblaciones Booroola-Merinos (Australia – Nueva Zelanda), Javanesa (Indonesia) y Han (China), y casi fijada en las poblaciones Garole (India) y Hu (China) (Polley et al., 2009; Hua and Yang, 2009).

Su efecto es aditivo sobre la tasa de ovulación. Cada copia sucesiva del gen aumenta la tasa de ovulación en aproximadamente 1,5 óvulos de media, pero solamente entre 1 y 0,5 corderos al nacimiento, respectivamente, para la primera y la segunda copia. En “Booroola Mérimos d’Arles” donde se introdujo el gen por introgresión, la prolificidad superior de las hembras heterocigotas, comparadas con las que no llevan el gen, resulta en un aumento de 0,6 corderos vivos por parto a setenta días, lo que se traduce en un 40% más de peso de cordero comercializado por oveja, a pesar de que los pesos individuales de los corderos son más bajos. La frecuencia de partos triples (o mayores) inducida por el aumento de prolificidad, tiene consecuencias obvias sobre el peso al nacimiento, el crecimiento y la viabilidad de los corderos y obliga a usar lactancia artificial. Sin embargo, no hay ningún efecto del genotipo sobre los caracteres de la canal (Fogarty, 2009).

Aunque la diseminación del gen Booroola, por su interés para estudios genéticos y fisiológicos, fue muy extensa (por lo menos 13 países – España incluida) al principio de los años noventa, el uso a nivel privado de ese gen es escaso.

En muchas situaciones el genotipo homocigoto no es económicamente rentable, puesto que el aumento de ovulación de esas ovejas es demasiado grande y resulta en un aumento inaceptable de partos triples, y de la mortalidad global. Mantener un rebaño de ovejas heterocigotas (para cualquier gen) es difícil sin genotipar un gran número de corderas (el doble de lo necesario para la reposición) y actualmente el coste de ese genotipado es demasiado elevado.

En las poblaciones Garole y Hu, el efecto del gen es posiblemente menos intenso, y quizás las ovejas homocigotas serán suficientemente rentables para explicar el mantenimiento de ese alelo a un nivel casi fijado. (Walkden-Brown et al, 2008).

2.- El gen de transformación del crecimiento denominado Proteína Morfogénica del Hueso 15 (Bone Morphogenetic Protein 15 ó BMP15).

La implicación de un gen ligado al cromosoma X, en la modulación de la ovulación, se demostró por primera vez en la raza Inverdale (FecX^I) aunque la identificación de una mutación que introduce un codón de parada en este gen de transformación del crecimiento se publicó anteriormente, hace ya más de una década (Galloway et al., 2000). Lógicamente, la mutación impide la normal traducción de la proteína codificada por este gen.

BMP15 se sitúa en la región no recombinante del cromosoma X, por lo que está totalmente ligado al sexo: Los machos (por su dotación XY) son hemicingotos y sólo pueden presentar una copia del gen, mientras que las hembras (XX) presentan dos, y pueden por lo tanto portar las variantes de BMP15 en homocigosis o en heterocigosis.

Esto condiciona el modo de herencia y el efecto de las mutaciones del gen. Al estar situado en el cromosoma X, un macho mutado transmite la mutación a todas sus hijas, pero a ninguno de sus hijos; mientras que una hembra heterocigótica pasa su mutación a la mitad de sus descendientes.

Es muy importante destacar que, si bien en heterocigosis, el gen aumenta la tasa de ovulación (alrededor de 1 óvulo), en homocigosis esta mutación induce una esterilidad funcional: los ovarios detienen su desarrollo en un nivel infantil.

Otras cuatro mutaciones en el mismo gen fueron descubiertas posteriormente en otras poblaciones ovinas (Hanna: FecX^H, Belclare: FecX^B, Galway: FecX^G, Lacaune: FecX^L). Originan o bien sustituciones de aminoácidos (caso de FecX^I, FecX^B y FecX^L), o codones de parada prematuros (caso de FecX^G y FecX^H). Todas las mutaciones de este tipo han recibido nombres que comienzan con las siglas FecX, por modificar la

fecundidad y por situarse BMP15 en el cromosoma X. La última letra, con formato de superíndice, corresponde a la inicial de la raza en la que se hallaron: Inverdale, Belclare, Lacaune, Galway, Hanna. En todos los casos, los efectos fenotípicos de estas mutaciones en las ovejas dependen de la dosis génica: Mientras que las tasas de ovulación se incrementan notablemente en las heterocigotas, las homocigotas presentan fallo ovárico primario que origina esterilidad completa. (Galloway et al., 2000; Montgomery et al., 2001; Hanrahan et al., 2004; Davis, 2005; Bodin et al., 2007).

El aumento de tasa de ovulación que provocan las diferentes mutaciones en heterocigosis es variable, mientras que en homocigosis todos inducen el mismo fenotipo de esterilidad.

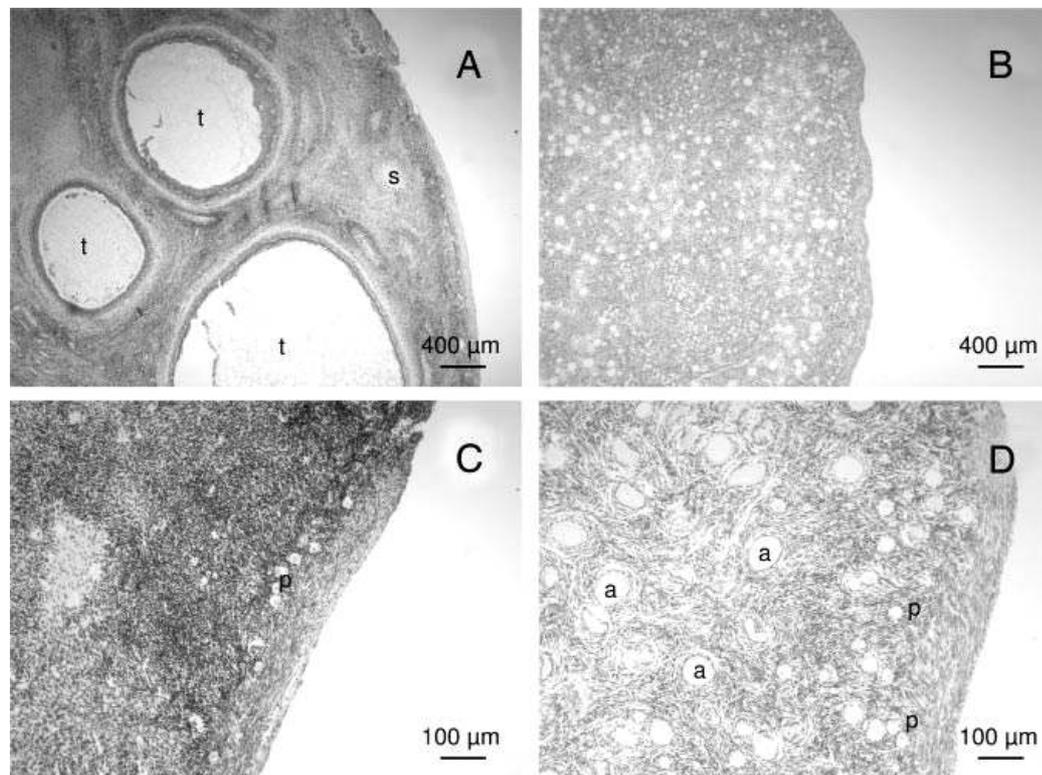


Figura 5 (Tomada de Bodin et al., 2007). A y C: sección histológica de un ovario de una oveja no portadora del gen $FecX^L$ con crecimiento folicular normal, con la presencia de folículos secundarios (s) y terciarios (t). B y D: sección histológica de un ovario de oveja portadora homocigota $FecX^L$ con numerosos folículos primordiales y estructuras foliculares anormales (a)

La mutación Inverdale, encontrada también en la raza Romney, fue rastreada en un gran número de otras razas prolíficas, pero no fue encontrada en ninguna. La mutación Galway FecX^G de ese locus es, hasta ahora, la única común a distintas poblaciones: razas Belclare y Cambridge que son pequeñas poblaciones y, sobre todo, la raza Leyen que cuenta con más de 230.000 cabezas.

En Lacaune, el núcleo de selección cuenta alrededor de 10.000 ovejas también con una prolificidad de 2. La frecuencia de esta mutación, estimada alrededor de 7%, ocasiona una baja proporción de hembras homocigotas, lo que explica los escasos casos de esterilidad mencionados por los ganaderos. En esta raza, por existir procedimientos alternativos para incrementar la prolificidad, los ganaderos han decidido erradicar poco a poco este gen. (Bodin et al., 2007).

El manejo de las mutaciones de BMP15 por los ganaderos no es fácil y puede crear problemas de viabilidad comparables a los del gen Booroola, puesto que la producción de animales homocigotos debe ser evitada.

El mantenimiento de una frecuencia alta del gen en heterocigosis de forma estable y con pocos animales estériles, implica una gestión precisa de los apareamientos. Sin embargo, utilizando un porcentaje constante de machos heterocigotos al azar en una población, se mantiene la frecuencia de ovejas heterocigotas que se reproducen. Así con 50% de machos portadores de la mutación, la frecuencia de ovejas heterocigotas se estabilizaría alrededor de 60%, con el 15% de las corderas nacidas estériles, aún cuando no se aplicasen procedimientos de genética molecular para identificar los portadores de la mutación (Gray and Davis, 1995).

3. El factor 9 de diferenciación de crecimiento (Growth Differentiation factor-9, GDF9).

Una mutación de este gen fue encontrada por primera vez en una familia muy prolífica de ovejas Belclare (Irlanda) y luego en la raza Cambridge (Hanrahan *et al.*, 2004). GDF9 está localizado en el cromosoma 5 y una mutación en su secuencia origina la sustitución de un aminoácido con efectos sobre la prolificidad.

Por el momento, se conocen dos alelos funcionales: *FecG*⁺ (*alelo salvaje*) y el mutante *FecG*^H. El gen GDF9, como BMP15, pertenece a la superfamilia de los “transforming growth factor β ” y codifica una proteína expresada en el ovario, de forma particular en los folículos. En estado heterocigoto, la mutación de este gen proporciona un aumento de la tasa de ovulación (+1,4 óvulos), pero en homocigosis se observa una esterilidad funcional.

En las razas Belclare y Cambridge segregan simultáneamente dos mutaciones de BMP15 (*FecX*^G y *FecX*^B) y una de GDF9 (*FecG*^H). En ellas se ha comprobado que la presencia en el mismo animal de una mutación BMP15 y de otra en el gen GDF9, tiene efectos multiplicativos sobre la tasa de ovulación. Sin embargo, ovejas con dos copias de alguna de estas mutaciones o una copia de *FecX*^G junto a una copia de *FecX*^B son estériles. En la actualidad no hay datos sobre la prolificidad y mortalidad embrionaria de las ovejas que porten las dos mutaciones.

Recientemente se han encontrado mutaciones del gen GDF9 en la raza Small-tailed Han sheep, (Chu et al, 2011) en la raza india Garole, en las que también se ha detectado el llamado “gen Booroola” (*FecB*) (Polley et al., 2010), en razas de cola grasa donde coexisten polimorfismos de GDF9 y BMP15 (Javanmard et al., 2011; Barzegari et al., 2010) y en la raza iraní Baluchi (Moradband et al, 2011)

También se ha descubierto en la raza ovina brasileña Santa Inés un nuevo alelo de GDF9 llamado *FecG*_E, debido a la sustitución de una fenilalanina por una cisteína en el péptido maduro. De acuerdo con los autores, este alelo tendría la particularidad de que los animales homocigotos no son estériles. (Silva et al., 2011).

4. El gen Lacaune.

El gen Lacaune (Bodin et al., 2002; Lecerf et al., 2002) fue encontrado en una población seleccionada desde 1.976 para prolificidad. El progreso genético rápido, la aparición de tamaños de camada muy altos (más de 5), la estimación de la heredabilidad demasiado elevada para este carácter ($h^2=0.4$), las anomalías de transmisión entre los valores genéticos de unos machos y los de sus hijos, fueron dudas que incitaron a

diseñar en una granja experimental un protocolo específico para la detección de un gen mayor.

Como en el protocolo diseñado para localizar el gen Booroola, este método se basó en las observaciones de ovulación de medias hermanas, seguido por un barrido genómico o “genome scan”. En poco tiempo se localizó el gen en una pequeña región (~2 cM) del cromosoma 11. Aunque se desconoce la mutación causal, existe un haplotipo, constituido por siete marcadores microsatélites, que permite identificar, con una probabilidad aceptable, a todos los animales portadores de la mutación en la población.

El efecto sobre la tasa de ovulación es aditivo y próximo a 1,6 óvulos. El tamaño de camada en las ovejas heterocigotas es próximo a 2, lo que constituye el óptimo económico para la mayoría de los ganaderos; sin embargo el porcentaje de partos cuádruples o mayores es superior a 10%. La frecuencia de hembras heterocigotas en las ganaderías de selección, pudo ser estimada en un 45%; al mismo tiempo se estimó la prolificidad de las ovejas que no llevan el gen en 1,6, o sea la prolificidad de esos rebaños hace 20 años. Por esos dos resultados los ganaderos decidieron mantener el gen y adoptar un manejo en consecuencia.

En la práctica, es preciso que el manejo limite en lo posible el número de genotipados a realizar y que maximice el porcentaje de ovejas heterocigotas, minimizando el de homocigotas. El uso exclusivo de machos salvajes y la estricta selección de las corderas de reposición entre las hijas de las mejores hembras, permitiría llegar a 50% de heterocigotas y mantener esa proporción con el único genotipado de los machos. Para alcanzar más rápidamente este objetivo, se ha propuesto también producir durante algunas generaciones, corderas heterocigotas mediante la inseminación de madres salvajes con machos homocigotos para la mutación Lacaune (Mulsant et al., 2002)

5. Woodlands.

Entre los genes mayores de ovulación descubiertos hasta ahora, el llamado gen $FecX2^W$, tiene los efectos más bajos. Aumenta la tasa de ovulación en 0,39 óvulos y el

tamaño de la camada en 0,25 corderos. Su otra particularidad es su tipo de transmisión complejo (Davis et al., 2001). Como el BMP15, se encuentra en el cromosoma X, lo que significa que un macho lo trasmite a todas sus hijas, pero a ninguno de sus hijos.

Por otra parte ese gen está sometido a impronta materna; es decir que la expresión de ese gen está desactivada cuando se hereda de la madre (hija silenciosa), y está activada cuando se hereda del padre (hija expresadora). Pero esta impronta materna es particular, puesto que su abolición se produce únicamente cuando un macho hereda el gen de una hembra silenciosa. Debido a la complejidad no totalmente elucidada de esa transmisión, no se espera que esta mutación tenga un gran uso a nivel comercial. Sin embargo, su presencia en una población seleccionada puede afectar notablemente el cálculo de los valores genéticos (Davis et al., 2001; Davis et al., 2002) y conducir a errores.

6. Thoka.

En los años 80 surgieron en Islandia sospechas sobre la posible existencia de otro gen mayor implicado en la prolificidad cuyo origen pudo rastrearse hasta una oveja de nombre propio Thoka. De hecho, el análisis de segregación, sobre datos acumulados durante 14 años proporcionó evidencias estadísticas de la existencia de un gen autosómico de carácter aditivo (Walling et al., 2002).

Un alelo de este gen induciría un incremento de alrededor de 1,03 óvulos y 0,7 corderos en las hembras heterocigotas. El incremento de prolificidad es, técnica y económicamente interesante, lo que favorece su difusión en las ganaderías. Un gran número de rebaños cuenta con ese gen para mantener una buena prolificidad. Aunque se han visto casos de infertilidad, la esterilidad de las hembras homocigotas no está confirmada todavía. La localización del gen no se conoce, pero se sabe que el locus Booroola no está implicado.

Para los genes de ovulación encontrados en otras razas o poblaciones (Olkuska, Chios, Belle-Ile, Metherell, Loa, Wishart, Davis, Booroola2), hay menos información (Davis, 2005) y, sobre todo, no se puede descartar la posibilidad de que sean

mutaciones ya conocidas, al no haberse realizado suficientes estudios para corroborarlo o descartarlo.

1.A.4.4.2. Estacionalidad

La estacionalidad de la reproducción del ganado ovino provoca importantes fluctuaciones en el suministro de leche y carne a lo largo del año, mientras que la demanda es constante.

Muchos estudios han permitido identificar los factores determinantes de las variaciones de actividad sexual en ovino. La variación de la duración del día a lo largo del año es el factor principal de la estacionalidad de la reproducción, pero otros factores son también determinantes, lo que hace posible un control artificial de la estacionalidad.

Se utilizan con este fin desde hace 30 años tratamientos hormonales, tratando de minimizar el problema de la estacionalidad, lo que ha permitido facilitar de manera importante el manejo en las ganaderías. Sin embargo, en pleno período de anestro, esos tratamientos permiten tener solamente un ciclo fértil para monta natural o inseminación artificial. Por otra parte, el uso de hormonas será probablemente reglamentado, o incluso prohibido, en el futuro. La variabilidad de la estacionalidad observada entre diferentes razas indica que hay factores genéticos también implicados. (Hanocq et al, 1999)

Los parámetros genéticos de la fertilidad en primavera han sido estimados por varios autores, entre otros, Notter (Notter et al., 2003) que inició una selección de una línea sintética. Sin embargo, el criterio de selección (partos de otoño) no permitía distinguir entre las hembras que presentaban actividad sexual antes del período de monta y las que respondían al efecto macho. Por lo tanto, la selección que operaba sobre los dos criterios dio resultados limitados, sobre todo para las corderas más sensibles al efecto de la estación sexual.

Estudios alternativos consideran la actividad ovárica espontánea en primavera, midiendo la tasa de progesterona en dos tomas de sangre, tomadas antes del período de monta y en ausencia total de los machos. Los parámetros genéticos de ese carácter, estimados en Merinos d'Arles, Latxa y Chios, son muy parecidos y muestran que la

selección sobre ese carácter sería posible y eficaz. Unas líneas divergentes sobre la actividad ovárica espontánea (AOE) en primavera se están seleccionando, sobre una parte de un rebaño experimental, en Merinos d'Arles (Teyssier et al., 2002).

Otros estudios alternativos se han referido a la melatonina, que es el mediador más directo del fotoperiodismo en el organismo. El uso de implantes está generalizado y, al igual que los tratamientos con luz, permite “engañar” al organismo de los animales sobre la estación en la cual están. (Forcada et al., 2000; Abecia et al., 2002). Los primeros estudios genéticos sobre la melatonina (hormona secretada únicamente durante la noche) mostraron que su nivel de secreción es altamente repetible noche tras noche y que existe una variabilidad genética importante, pero no se pudo relacionar ese nivel de secreción con la estacionalidad de los animales. Los estudios de fisiología y genética molecular dieron entonces un nuevo impulso a esas investigaciones. Dos receptores específicos de la melatonina Mel_{1A} y Mel_{1B} fueron identificados y los correspondientes genes fueron secuenciados hace cerca de diez años. (Von Gall et al., 2002).

Desde entonces se han diseñado varios experimentos en Merinos, Ile de France, Latxa y OOS (línea sintética desarrollada por Notter) para estudiar la relación entre el polimorfismo del gen del receptor Mel_{1A} y la estacionalidad de las ovejas.

En el rebaño experimental de 900 ovejas Merinos d'Arles, varios resultados indican una fuerte asociación entre estacionalidad y una mutación del tipo SNP en el exon 2 del gen de Mel_{1A}. En primer lugar, es de señalar que no se encontró el genotipo -/- en el grupo de hembras que presentó una actividad ovárica espontánea en primavera tres años seguidos, mientras que sí existía en el resto del rebaño. Además, se observó una diferencia significativa de frecuencia genómica en los animales de las líneas divergentes. Finalmente, los animales de esas líneas presentan diferente de AOE en función de su genotipo en ese gen. (Pelletier et al., 2000)

Otros resultados refuerzan la hipótesis de una implicación de ese gen en la variabilidad de la estacionalidad. Observaciones de las frecuencias de ese gen en distintas razas, muestran que la frecuencia del genotipo -/- cambia en función de su grado de estacionalidad y de la latitud donde se encuentran.

Por otra parte, en las líneas de OOS seleccionadas sobre fertilidad de primavera, Notter (Notter et al., 2003) encontró un ligero efecto significativo del polimorfismo de Mel_{1A} sobre la fertilidad de las ovejas adultas. Para las corderas que tienen una muy baja fertilidad en esa época, ese efecto no es significativo, pero eso podría ser debido, más que al criterio de selección, a una interacción con la respuesta al efecto macho. Finalmente, observaciones en distintas razas chinas muestran también que el mismo genotipo -/- no ha sido detectado en la raza Small Tail Han conocida por no tener verdadera estación sexual (Chu et al., 2003; Chu et al., 2006).

Esos resultados independientes revelan claramente una asociación entre el polimorfismo del gen del receptor a la melatonina y la estacionalidad; sin embargo la naturaleza de esta asociación no queda muy clara. De hecho, en las razas Ile de France y Latxa, donde se observó la estacionalidad en familias de medias hermanas de padre, no se ha podido comprobar por análisis de ligamiento que exista una relación genética entre la estacionalidad y el polimorfismo de Mel_{1A} . Hasta ahora, con esos análisis intra-familias, no se ha podido mostrar ni siquiera que esa zona del genoma participe en la variabilidad de la estacionalidad. La discrepancia entre los resultados de análisis de ligamiento y la observación de una simple asociación demuestran la debilidad de esa última metodología para detectar genes mayores, y la necesidad de diseños específicos. (Hernández et al., 2005)

Si en Estados Unidos se comercializa un kit para genotipar los animales y facilitar la selección sobre estacionalidad, en Francia las investigaciones están reorientadas hacia otros protocolos para detectar genes mayores de estacionalidad (Fremont, 2001)

1.B LA RAZA RASA ARAGONESA

1.B.1. ORÍGENES Y DESCRIPCIÓN HISTÓRICA

De forma tradicional, se ha considerado a las razas ovinas españolas de lana entrefina, como la Rasa Aragonesa, como originadas por el cruce entre las agrupaciones de lana fina (Merina) y basta (Churra y Lacha). Este planteamiento es en realidad excesivamente simplista. El origen de la Raza Rasa Aragonesa hay que buscarlo en el *Ovis Aries Ligeriensis*, tipo ovino primitivo originado en Europa Central, que se extendió hacia la Cuenca del Loira, los Alpes franceses y suizos, etc. Esta agrupación ovina descendió a través de Francia, atravesó los Pirineos, acompañando a las penetraciones pirenaicas de indoeuropeos del siglo I a de J.C., y en su viaje hacia el sur de la península, se distribuyó por la Cuenca del Ebro, donde evolucionó según las zonas en función del ambiente para dar lugar a la Rasa aragonesa con sus distintos ecotipos. Además de este tipo ovino, parece ser que también influyó en la formación de la raza otro tipo ovino primitivo semejante, el *Ovis Aries Auverniensis* que procedente del Macizo Central, Sur y Sureste de Francia penetró en Aragón a través de los Pirineos, acompañando a una serie de pueblos celtas. (Altarriba y Lamuela, 1983; Sierra, 2002).

1.B.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA. CENSOS Y SITUACIÓN ACTUAL.

El área de ocupación de la Rasa Aragonesa es amplia. Comprende la casi totalidad de las tres provincias de Aragón (Zaragoza, Huesca y Teruel); la amplia zona de Navarra que no es ocupada por la Lacha; llega al sur de Álava, Este de Logroño, Soria y Guadalajara y ocupa el oeste de Lérida, gran parte de la provincia de Tarragona y el Noroeste de Castellón. En resumen, se extiende por la mayor parte de la Cuenca del Ebro.

Todo este medio de ubicación de la Rasa se caracteriza por la presencia de un clima continental, con una pluviometría escasa (próxima a los 400 mm/año) y mal distribuida, con heladas de octubre hasta abril, tierras de muy variada orografía (valles, mesetas, somontanos, sierras y montañas) en cuyos secanos predomina el cereal y a cuyos regadíos sólo acude la oveja en otoño – invierno. Pastos xerofíticos de tipo

mediterráneo, monte bajo de carrascas, llanuras y mesetas con tomillo, romero, esparto y aliagas terminan de componer el medio duro y difícil en donde se explota la raza Rasa Aragonesa.

El censo actual se sitúa en torno a los 1,3 millones de cabezas, de las que 400.000 están inscritas en el Libro Genealógico, y con una ligera tendencia ascendiente.

1.B.3. DESCRIPCIÓN RACIAL.



Fig. 6: cabeza macho Rasa Aragonesa



Fig. 7: cabeza hembra Rasa Aragonesa

Animales de perfil subconvexo, longitud corporal media y peso medio aunque variable según las zonas que puebla. Acusado dimorfismo sexual. Aptitud cárnica.

Cabeza de tamaño medio, sin lana y sin cuernos. Orejas medianas y horizontales y ojos poco destacados.

Cuello proporcionado y tórax de longitud media, profundo y horizontal. Grupa amplia y ligeramente inclinada.

Extremidades adecuadas a una raza rústica que debe andar para proporcionarse el alimento. Bien aplomadas, en armonía al tamaño corporal.

Espalda, nalga y muslos proporcionados y bien unidos al tronco. Cañas finas y pezuñas duras.

Piel rosácea, con las zonas desprovistas de lana cubiertas de pelo fino, brillante y de color cremoso. Mucosas sin pigmentaciones.

Lana entrefina y vellón, de color blanco uniforme, que cubre el tronco alcanzando el cuello hasta la nuca como máximo; las extremidades anteriores hasta mitad del antebrazo y en las posteriores no baja del corvejón.

Cualidades destacables de la raza Rasa Aragonesa son: elevada rusticidad, instinto gregario, buen instinto maternal, capacidad lechera suficiente, capacidad de pastoreo y adaptación al medio difícil en que se explota.

1.B.4.- DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS DE EXPLOTACIÓN Y SU IMPACTO ECOLÓGICO EN LA ZONA

Todas las características anteriormente descritas, que se pueden resumir en la palabra rusticidad, hacen de la Rasa Aragonesa el único animal que puede aprovechar los recursos de las zonas áridas de la región de una forma totalmente sostenible, representando la principal fuente de ingresos para un elevado número de familias del medio rural.

Dentro de esta filosofía general, podríamos describir la explotación tipo en la Rasa Aragonesa como una explotación en régimen semiextensivo (o semiintensivo), basado en el pastoreo conducido pero que suplementa nutricionalmente a los animales en los momentos de mayores necesidades, muchas veces con productos producidos en la misma explotación, siendo general la estabulación de las ovejas durante la lactación hasta el destete (unos 45 días). El cordero se finaliza con piensos comerciales (en 75-90 días).

La reproducción también se ha intensificado. Está completamente desechada la monta continua y se ha sustituido por sistemas más intensivos con tres, cuatro y hasta cinco épocas de parto al año, apoyándose en tratamientos hormonales en las épocas de mayor anoestro estacional.

1.B.5.- DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS.

Se trata de una raza de aptitud cárnica, que produce un tipo de cordero característico de la región denominado Ternasco, de una edad entre 70 a 100 días, con un peso vivo entre 20-24 Kg. y con una canal perfectamente acabada en cuanto a tejido adiposo y con una calidad de carne totalmente reconocida por su terneza y sabor. Esta calidad de la carne queda reconocida a nivel europeo por la Indicación Geográfica Protegida "Ternasco de Aragón", que controla la calidad de los ternascos calificados.

Las características del Ternasco de Aragón son:

- Peso canal: 8.5-11.5 Kg.
- Grasa: cubierta grasa blanca de consistencia firme. Grasa interna blanca, cubriendo al menos la mitad del riñón, pero nunca todo.
- Conformación: canales de perfil rectilíneo o algo subconvexo.
- Color de la carne: rosáceo
- Características de la carne: carne tierna con infiltración grasa a nivel intermuscular. Muy sabrosa. Textura suave y excelente bouquet.

1.B.6.- DESCRIPCIÓN DE LAS REPERCUSIONES SOCIALES ACTUALES Y POTENCIALES.

La raza Rasa Aragonesa no queda al margen de la situación que atraviesa el sector ovino en general y por lo tanto se ve afectada por una crisis que tiene su origen en una alarmante falta de rentabilidad de las explotaciones, con una caída de los ingresos por venta de corderos y por ayudas comunitarias y un aumento de los gastos de alimentación, carburantes, etc.

A ello se añade un grave problema de mano de obra por la falta de personal cualificado y por la falta de relevo generacional en el caso de la mano de obra familiar.

Todo esto hace que la calidad de vida del ganadero haya disminuido y una parte de ellos sopesen el abandono del sector, lo que además sería muy negativo para el

mundo rural, puesto que el ganado ovino por un lado fija población en el medio rural y por otro permite el desarrollo sostenible del medio ambiente donde discurre su actividad.

Las soluciones no parecen fáciles en un futuro próximo, en tanto en cuanto no se potencie la rentabilidad de las explotaciones. La mejora genética es precisamente una parte vital para poder alcanzar un incremento de la rentabilidad.

1.C. EL ESFUERZO DE LA MEJORA EN LA RAZA RASA ARAGONESA

La raza Rasa Aragonesa ha tenido siempre la rusticidad como característica fundamental. A partir de mitad de los años 80 surge el interés en los ganaderos por conseguir mayores producciones de ternascos con lo que se plantea la necesidad de desarrollar un esquema de selección para la raza que considera la prolificidad como el principal carácter a mejorar. El Esquema comienza en 1990, pero es a partir del año 1998 cuando se desarrolla de forma importante, siempre apoyado por convenios de colaboración con el Departamento de Agricultura del Gobierno de Aragón. Adicionalmente, desde el año 2003, en cumplimiento de la legislación vigente, se ha incluido en este esquema la resistencia al Scrapie como nuevo e importante parámetro de selección, lo que conlleva aplicar un planteamiento de selección mixta junto al carácter prolificidad, evitando que el programa de mejora de la prolificidad sufra un retroceso importante. El objetivo de selección frente al scrapie es triple: aumentar frecuencia del alelo ARR, eliminación total del alelo VRQ y reducción del alelo ARQ.

La identificación de la prolificidad como en principal objetivo de mejora se realizó mediante un estudio económico para identificar los principales factores que afectaban a la producción (economía) de las explotaciones. Entre sus resultados, se destacó uno de especial importancia: en esta raza, el número de corderos vendidos influye de manera notable en el resultado final de la empresa ganadera. Por lo tanto, aumentar el número de corderos nacidos favorecería una mejor cuenta de resultados.

Desde 1990 se ha llevado a cabo la mejora genética de la prolificidad de una forma que podríamos denominar "clásica". Durante los primeros años se seleccionaban los mejores machos y las mejores hembras para la obtención de los posibles machos mejorantes donantes de semen de la siguiente generación, mediante índices sintéticos elaborados por técnicos de la propia Asociación Nacional de Ganaderos de Rasa Aragonesa (ANGRA).

No es hasta 1998 cuando ANGRA entró en contacto con D. Juan Altarriba, profesor de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza que inició el desarrollo del esquema de selección de la Raza mediante la realización de evaluaciones genéticas siguiendo el siguiente modelo animal (Altarriba et al., 1998; Altarriba et al., 2001):

$$y_{ijklmn} = E_i + T_j + Ep_k + H_l + a_m + ep_n + e_{ijklmn}$$

donde:

E_i = efecto edad de la oveja

T_j = efecto tratamiento hormonal

Ep_k = efecto época de parto

H_l = efecto explotación

a_m = valor genético aditivo del individuo

ep_n = valor ambiental permanente asociado al individuo

e_{ijklmn} = residuo

La conexión con la escala categórica se estableció asumiendo distribuciones normales con esperanzas referidas al umbral y componentes de varianza conocidos.

La resolución del modelo se realizó mediante la técnica de muestreo de Gibbs con aumento de datos. Esta técnica es un método numérico de marginalización que permite el desarrollo y la utilización práctica de técnicas de inferencia bayesiana. Por muestreo repetido a través de cadenas con elementos al azar se obtienen observaciones de la distribución incógnita, que permiten estimar todos los parámetros del modelo, tanto los sistemáticos como los aleatorios. La cadena utilizada se compuso de 140000 elementos y el descarte inicial se fijó en 25000 puntos. Los componentes de varianza asumidos fueron los obtenidos en un trabajo publicado en esta raza (Altarriba et al., 1998). Esos componentes, asumiendo una varianza residual = 80, fueron: varianza genética = 7,14 y varianza ambiental permanente = 5,94, que equivale asumir una heredabilidad = 0,077 y una repetibilidad = 0,141.

En la actualidad las evaluaciones genéticas se realizan con todos los datos existentes en el Libro Genealógico tanto de producciones, ANGRA ha recopilado los datos de más de 1.500.000 partos de diferentes explotaciones de todo Aragón, como de genealogías con casi 700.000 animales evaluados y de ellos 350.000 con partos propios. De resultas de este esfuerzo, se dispone de una base de datos informatizada, la mayor de una raza ovina española, que ha resultado clave en la ejecución del presente trabajo.

Esta vía clásica de mejora de la prolificidad está condicionada por la dificultad de llevarla a cabo por las características implícitas del propio carácter. A saber:

- La prolificidad es un carácter que no se expresa en machos.
- Está muy influenciada por el ambiente, alimentación y manejo
- Presenta baja heredabilidad
- Se expresa como parto simple o múltiple, es decir, como un carácter umbral.
- Intervalo generacional largo
- Su mejora es difícil de apreciar. El progreso genético es muy lento y difícil de conseguir si se trata de una herencia totalmente poligénica

Por ello, como ya se ha indicado, muchos investigadores han tratado de descubrir genes mayores para prolificidad en diferentes razas comerciales. En este sentido, el carácter prolificidad tiene una ventaja que es que el tamaño de camada es muy fácil de medir y se pueden observar valores extremos de prolificidad muy llamativos que pueden hacer sospechar la existencia de fenómenos no achacables a una herencia poligénica aditiva.

1.D. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El primer objetivo de este trabajo es estudiar la posible existencia de genes mayores para ovulación en la Raza Aragonesa. Se ha hecho evidente a lo largo de la introducción que el objetivo queda totalmente justificado dado el gran impacto positivo que supondría en el Esquema de mejora de la raza el descubrimiento de un gen mayor.

Desde un inicio se descartó el estudio de mutaciones de BMPR1b, similares a la mutación Booroola, al demostrarse que el origen de la misma eran razas del sureste asiático (Davis et al., 2002) muy alejadas filogenéticamente de la Raza Aragonesa.

Por el contrario, los estudios realizados en razas ovinas extranjeras han demostrado que, sobre todo en razas europeas, diferentes mutaciones del gen BMP15 y del gen GDF9 incrementan las tasas de ovulación en ovejas. De hecho, causan incrementos de partos dobles y triples en las hembras heterocigotas, y fallo ovárico completo en las homocigotas, que son por tanto infértiles.

La experiencia de la raza francesa Lacaune fue muy orientadora en esta tarea. Como se puede ver en el apartado de bibliografía, los trabajos sobre las mutaciones FecX ovinas se vienen publicando desde hace una década. Pero hay que destacar que desde el 12 de Octubre de 2006 estaba disponible on-line el trabajo de Bodin et al. que finalmente apareció en forma impresa en 2007. Desde nuestro punto de vista, la idea más importante recogida de este trabajo es la siguiente: Tras décadas de mejora genética de la prolificidad, se averiguó que una elevada proporción de las ovejas Lacaune más prolíficas portaban la mutación de BMP15 que se denominó FecX^L. En los comienzos del esquema de selección de dicha raza nada se sabía sobre la existencia de dicho gen mayor, por lo que no pudo aplicarse ningún criterio de selección directamente basado en el mismo. De hecho, la elevada frecuencia de FecX^L en los núcleos experimentales constituidos con las hembras más prolíficas de la raza, se alcanzó por selección a su favor, realizadamente indirectamente al escoger las ovejas de mayor prolificidad.

Partiendo de esta idea, un equipo conjunto de ANGRA y de los Departamentos de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos y de Anatomía, Embriología y Genética

Animal de la Universidad de Zaragoza, coordinado inicialmente por el Profesor D. Isidro Sierra, decidió abordar la tarea. Se planteó como primer objetivo del presente trabajo la localización de posibles mutaciones de GDF9 y de BMP15 con efecto sobre la prolificidad de la raza Rasa Aragonesa.

El punto de partida de nuestro trabajo debía por tanto ser una exhaustiva revisión de la base de datos descrita anteriormente. Se trataba de enfocar nuestra atención sobre ejemplares con alta probabilidad de presentar un gen mayor con efectos sobre la prolificidad. De este modo se pretendía optimizar el esfuerzo personal y económico que requería esta tarea, manteniendo la posibilidad de obtener resultados significativos en un periodo de tiempo relativamente breve.

El segundo aspecto del trabajo de gran importancia fue evaluar las posibles repercusiones que la difusión de la mutación puede tener sobre la prolificidad.

Una vez detectada la mutación que más adelante se describe, el tercer objetivo del trabajo fue la creación y desarrollo de un Plan que permita la difusión de la mutación a todas las ganaderías que se consideren técnicamente aptas para la gestión de la misma dentro del Libro Genealógico. Posteriormente se podría estudiar la difusión en ganaderías no inscritas en el Libro Genealógico e incluso la inserción de la mutación en otras razas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.A. MATERIAL ANIMAL

2.A.1.-FASE DE DETECCIÓN DEL ALELO MUTANTE

Inicialmente, se seleccionaron en la base de datos de ANGRA un total de 12 ovejas de alta prolificidad y cinco moruecos, pertenecientes a explotaciones de toda la geografía aragonesa. Entre ellas estaban la oveja con la máxima prolificidad en la historia del programa de mejora, con una media de 3,67 corderos/parto a lo largo de tres partos, y cuatro de sus hijas. Cuatro ovejas de rendimientos medios se incluyeron también como control.

Con posterioridad se analizaron animales de toda la base de datos del Libro Genealógico con un historial productivo y reproductivo compatible con la existencia de procesos de segregación mendeliana que afectaban a la prolificidad (posibles genes mayores)

2.A.2- FASE DE DIFUSIÓN DEL ALELO MUTANTE

Animales que cumplen las condiciones adecuadas para su posible inseminación en cuanto a morfología, edad, condición corporal, etc y convertirse en madres de las futuras hembras portadoras.

2.A.3.- ANALISIS DEL EFECTO DEL ALELO MUTANTE SOBRE LA PROLIFICIDAD

La información utilizada acerca de los partos procede del Control de Producciones de las ganaderías del Libro Genealógico de la Rasa Aragonesa gestionado por ANGRA en las que se ha detectado y/o difundido la mutación. En cada ganadería se han considerado dos grupos de ovejas según sean portadoras heterocigotas de la mutación $FecX^R$ (mutantes) o no (salvajes). Dentro de cada grupo se han analizado los partos de forma global y los primeros partos de forma particular.

2.B. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN DEL DNA.

El DNA se obtuvo a partir de muestras estériles de sangre periférica por incubación de 25 µl de sangre en 200 µl de una solución al 5% de resina Chelex en buffer TE a 100° C durante 20 minutos.

El primer exon de GDF9 se amplificó de acuerdo a la reacción propuesta por Hanrahan et al. (2004). Para ello se utilizaron los cebadores G-1: (5'-GAATTGAACCTAGCCCACCCAC-3'), y G-4: (5'-AGCCTACATCAACCCATGAGGC-3').

Para el segundo exon de GDF9 no se aplicó la propuesta de Hanrahan et al. (2004) al observarse problemas de inespecificidad de las amplificaciones. Por ello se diseñaron dos parejas de cebadores cuyos productos se solapaban y facilitaban una buena cobertura de toda su secuencia utilizando el software Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La primera pareja de cebadores para este segundo exón de GDF9 la formaban IIGDF9AF (5-GGGAGAAAAGGGACAGAAGC-3) y IIGDF9AR (5-TTCAGAGCTGGCACTCTC CT-3). La segunda pareja estaba formada por IIGDF9BF (5-AGATTGATGTGACGGCTCCT-3) y IIGDF9BR (5-CTCCCAAAGGCATAGACAGG-3). En ambos casos la amplificación se realizó a 58°C de temperatura de annealing y 2,5 mM de concentración final de Mg²⁺.

Los dos exones de BMP15 se amplificaron inicialmente de acuerdo a la propuesta de Hanrahan et al. (2004). Para el primer exón se utilizó la pareja formada por los cebadores B-13 (5'-CATGCTGCCTTGTCCCAC) y B-28 (5'-AGGCAATGTGAAGCCTGACA). En este caso, la temperatura de annealing fue de 58°C y la concentración final de Mg²⁺ fue de 1,5mM. El segundo exón se amplificó con los cebadores B-25 (5'-CAGTTTGTACTGAGCAGGTC), y B-4 (5'-TTCTTGGGAAACCTGAGCTAGC), utilizando una temperatura de annealing de 52°C, y concentración final de Mg²⁺ de 2,5 mM.

Una vez que se detectó la posible delección de 17 pares de bases en el segundo exón de BMP15, se diseñó un segundo juego de cebadores que incluía la zona afectada dentro del producto de PCR esperado. Los cebadores se denominaron MP15F (5'-CTCTGAGACCAAACCGGGTA) y MP15R (5'-CATGCCACCAGAACTCAAGA-3'). En este caso la PCR requería 57°C de temperatura de annealing y 2,5 mM Mg²⁺. El producto esperado tenía una longitud de 312 pares de bases en el caso del alelo salvaje, y de 295 en el caso de alelo con delección, lo que permitía una sencilla diferenciación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Todos los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% de agarosa en tampón TBE1x) con anterioridad a su secuenciación (Sambrook y Russell 2001). En el caso del diagnóstico de la presencia de la delección de BMP15 arriba referida, los geles utilizados contenían 2,3% de agarosa.

Es importante destacar que en la tinción de los geles no se ha utilizado Bromuro de Etidio (Bret). Si bien este compuesto se ha aplicado desde hace casi 40 años a la coloración y detección de DNA por su capacidad de intercalarse entre los pares de bases del DNA y de absorber luz ultravioleta (330 nm de longitud de onda) emitiendo en espectro visible (color naranja), se ha comprobado sobradamente su capacidad mutagénica (Singer et al., 1999). Para reducir los riesgos de la manipulación en el laboratorio y simplificar la eliminación de residuos, el colorante aplicado ha sido GelRed™ (Biotium, Hayward, California, USA) un sustitutivo del Bret que emite en la misma longitud de onda pero carece de su toxicidad

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad de Zaragoza, por medio de un equipo automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences). Las secuencias se analizaron por medio de los programas informáticos BLASTn (Altschul et al., 1997) y Bioedit (Hall, 2004).

2.C. PLAN DE DIFUSIÓN DEL ALELO FecX^R

También conocido comúnmente como Plan de Explotación del Gen Santa Eulalia. El plan de actuación se dividió en tres etapas:

2.C.1. ETAPA PRELIMINAR.

Se basó fundamentalmente en la inseminación artificial con machos portadores en las ganaderías asociadas a ANGRA con adecuado manejo reproductivo. Se trataba de aumentar el número de machos portadores, a partir de las hembras en las que ya se ha descrito la presencia de FecX^R y mediante cruzamientos con machos salvajes. Los machos obtenidos se destinaron fundamentalmente a los centros de selección y testaje para la obtención de dosis seminales

2.C.2. ETAPA INICIAL

Progresivamente se puso en práctica la reposición de hembras portadoras en el máximo de ganaderías adheridas posible, incorporando machos portadores para su cruzamiento con las hembras de las propias explotaciones.

2.C.3. ETAPA DE MANTENIMIENTO Y DIFUSIÓN INTERNA

Las ganaderías del Libro Genealógico dispondrán ya de hembras portadoras a partir de las cuales, por cruzamiento con machos exentos, se obtienen hembras y machos portadores para incrementar y/o mantener la reposición propia y para suministrar machos portadores a otros rebaños del Libro Genealógico. En esta fase se evita en estas ganaderías el uso de machos portadores para evitar las hembras homocigotas estériles.

2.D. INSEMINACION ARTIFICIAL

El protocolo de realización de las inseminaciones que permiten la difusión del alelo FecX^R es el mismo que se sigue en el Esquema de Valoración de Sementales de ANGRA:

- Colocación de esponja vaginal (Chronogest de MSD Animal Health) con 20 mg. De FGA (Acetato de Fluorogestona)
- Retirada de la misma a los 12-14 días e inyección de 480 U.I. de eCG. (Gonadotropina coriónica equina) (Foligon 6000 de MSD Animal Health)
- Inseminación vía cervical con semen refrigerado a las 54 horas post retirada de la esponja.
- A los cuatro días introducción en el lote de ovejas inseminadas de los machos de la explotación para recuperar celos de las ovejas que no hayan quedado gestantes con la inseminación (Ponz et al, 2000)
- Un mes antes del comienzo de la época de partos se entrega al ganadero un listado (en soporte físico o informático) de las ovejas que componen el lote de inseminación
- Entre una y dos semanas después del fin del intervalo de partos calculado para la inseminación se recogen los resultados.

2.E. ESTUDIO DE LA CALIDAD SEMINAL DE LOS MACHOS PORTADORES.

La calidad seminal se valoró según los procedimientos estandarizados aplicados en el Area Técnica de Producción, Selección y Reproducción Animal (ATPSYRA, antiguo CENSYRA) del Gobierno de Aragón en Movera (Zaragoza) y en el Centro de Inseminación Artificial “El Chantre” de Teruel, propiedad de la Diputación Provincial de Teruel.

Los parámetros controlados fueron tres: concentración de espermatozoides, motilidad de los espermatozoides y proporción de espermatozoides útiles.

2.F. RECOGIDA DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE LOS ANIMALES PORTADORES

Las muestras de las hembras nacidas de las inseminaciones con machos portadores son extraídas por el Equipo Técnico de ANGRA aprovechando la recogida de los datos de fertilidad de la inseminación (como indica el apartado 2.D). Se recoge una muestra de sangre entera periférica en un tubo de 5 ml con un aditivo anticoagulante (EDTA) que lleva un número de serie con un código de barras. A este número de serie se hace corresponder con el crotal auricular amarillo de nacimiento que el ganadero le ha colocado. Para mayor seguridad el técnico lo marca con otro crotal blanco con otro número, con el fin de no perder la identificación si el crotal inicial se pierde.

Cuando se trata de animales nacidos de hembras portadoras es el ganadero quien avisa a los técnicos de este hecho y estos desarrollan el mismo proceso recogiendo muestras tanto de las hembras como de los machos nacidos de esos partos.

2.G. IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES PORTADORES

Los animales, machos y hembras, de los que se ha verificado en laboratorio su condición de portadores de la mutación FecX^R se identifican de la siguiente manera:

- 1.- Mediante un crotal auricular y un identificador electrónico según indica la normativa vigente (Real Decreto 947/2005, de 29 de julio, por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina)
- 2.- Se añade un segundo crotal auricular de color verde con el logotipo comercial del alelo mutante (obligatoriamente) (ver figura X)
- 3.- Opcionalmente se pueden identificar mediante tatuaje
- 4.- Hay ganaderos que recurren a marcas específicas auriculares para diferenciar sus animales portadores



Figura 8: detalle del crotal identificador



Figura 9: lote de corderas portadoras identificadas con los dos crotales

2.J ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para los estudios estadísticos se ha utilizado el paquete informático, SPSS 14.0, para el que la Universidad de Zaragoza cuenta con licencia legal de utilización.

Las comparaciones de porcentajes de partos sencillos y dobles se han realizado mediante el test de Chi cuadrado de Pearson y el estadístico exacto de Fisher, así como el test U de Mann-Whitney y el W de Wilcoxon, también aplicados al análisis de la diferencias en prolificidad. El estadístico exacto de Fisher se ha aplicado también al estudio de las diferencias entre el porcentaje de partos deseables y no deseables en cada grupo de hembras. (Petrie et. al, 2000)

Las posibles diferencias en el tiempo de supervivencia de las ovejas salvajes y mutantes se han analizado aplicando el test de Breslow (Generalized Wilcoxon generalizado). (Elandt et. al, 1980)

La comparación entre las concentraciones, motilidad y utilidad de espermatozoides de los diferentes sementales, se efectuó mediante a prueba de Levene de comparación de varianzas y el test de t de comparación de medias.

3. RESULTADOS

3.A. HALLAZGOS INICIALES

La recopilación de las muestras de sangre comenzó a finales de Noviembre de 2006 y en enero estaba completada. Mientras tanto, se optimizaron los protocolos de análisis de ADN publicados en la bibliografía y se diseñaron otros con vistas a aumentar la eficiencia de los procesos de secuenciación de DNA en los dos genes objeto del estudio.

El análisis de la secuencia GDF9 no reveló datos de especial interés.

Por el contrario, el segundo exón del precursor de BMP15 ofreció interesantes resultados. En todos los animales excepto cuatro, las secuencias podían alinearse con la depositada en GenBank bajo el código AF236078S2 (Galloway et al., 2000). Sin embargo, en la oveja con record de prolificidad y en tres de sus hijas, los cromatogramas presentaban una imagen similar a la esperada en individuos heterocigotos para una mutación de alrededor de 17 bp. Usando los cebadores MP15F y MP15R arriba descritos, se esperaba de la secuencia salvaje un producto de 312 bp y otro de 295 de la secuencia portadora de la delección.

La electroforesis de agarosa confirmó que las cuatro ovejas indicadas eran heterocigotos (Figura 10). Un segundo rastreo entre los animales adultos del rebaño permitió localizar otras tres ovejas heterocigotas para la delección, y lo que es más importante, dos corderos machos recién nacidos (Abril de 2007) que la portaban en hemicigosis y facilitaron la obtención de la secuencia. (Figura 11). Uno de los corderos era hijo de una de las cuatro ovejas heterocigotas detectadas en primer lugar, y el otro de una de las que se acababan de localizar. En principio, no hay evidencias directas de parentesco entre las cuatro primeras ovejas halladas y las otras. Ninguno de los sementales de la explotación era portador de la delección, por lo que la transmisión de la misma se ha producido por vía materna, cosa que ya era evidente en el caso de los corderos machos, que lógicamente habrían heredado de sus padres el cromosoma Y.

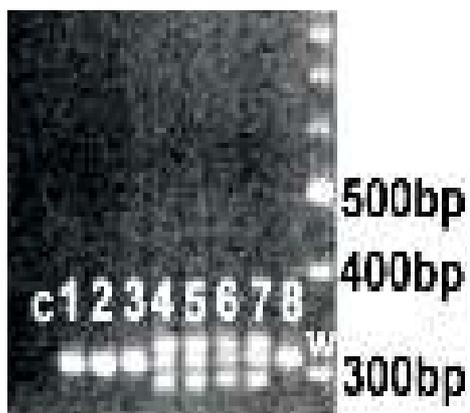


Figura 10: Resultados de la amplificación por PCR de un fragmento del segundo exón de BMP15 mediante los cebadores MP15F y MP15R . Calles 1, 2 y 3 ejemplares salvajes. Calle 4: imagen obtenida de la oveja que ostentaba el record de prolificidad en la base de datos. Calles 5, 6 y 7: tres ovejas hijas de la anterior, también hiperprolíficas. Calle 8: otra hija de la oveja de la calle 4, pero en este caso de prolificidad normal, por haber heredado la forma salvaje de BMP15. Calle W: marcador de pesos moleculares. Calle C: Control negativo de PCR (tomada de Monteagudo et al., 2008).

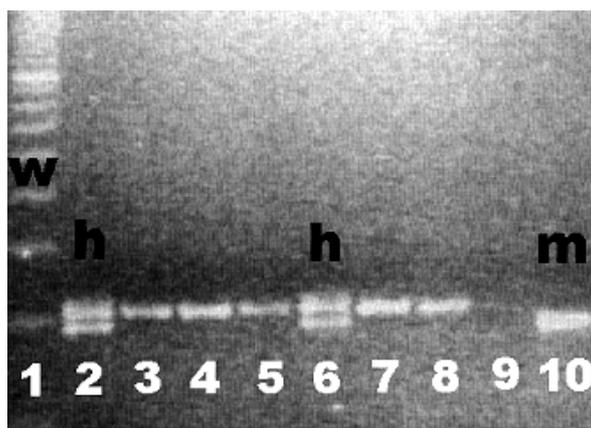


Figura 11: En las calles denominadas h se muestra la imagen en electroforesis de dos hembras portadoras en heterocigosis de FecX^R. La calle m muestra la imagen de uno de los machos heterocigotos localizados. El resto son ejemplares salvajes, salvo 9 (control negativo de PCR) y W (marcador de pesos moleculares). (Tomada de Monteagudo et al., 2008).

Los corderos machos portadores hemicigotos de la delección facilitaron la muestra de DNA ideal para obtener sin margen de dudas la secuencia de la zona implicada en la variante. Se pudo así comprobar que la delección afectaba a 17 nucleótidos del segundo exón de BMP15, precisamente los situados entre la posición 525 y 541 (ambas incluidas) en la numeración original de la secuencia AF236078S2 , depositada por Galloway et al. (2000).(Figura 12)

		
	525	535	545
Macho 1	GTGGAGCCC-	-----	-----AACC
Tipo salvaje	GTGGAGCCCT	GGGTCCAGAA	AAGCCCAACC
Macho 2	GTGGAGCCC-	-----	-----AACC

Figura 12: Posición exacta de la delección FecXR, de acuerdo a la numeración de la secuencia AF236078S2 (tomado de Monteagudo et al., 2008b)

Por los motivos ya arriba expuestos, se decidió continuar con la tradición científica al respecto y denominar esta mutación con las siglas FecX^R. En homenaje a la localidad de Santa Eulalia (Teruel) en la que se localizaron los primeros ejemplares portadores, se decidió a los efectos de las tareas de difusión entre los ganaderos denominarla también mutación “Santa Eulalia” o “gen Santa Eulalia”.

Las secuencias obtenidas de los dos corderos hemicigotos sin parentesco cercano fueron totalmente coincidentes, lo que implica la existencia de un ancestro común. Como quiera que en uno de los pedigríes ya se había confirmado su presencia en tres generaciones diferentes, pudo afirmarse desde ese momento que el alelo existía al menos desde hace cuatro generaciones en la explotación. Más adelante, como se verá, se localizó en otra ganadería un ejemplar nacido en 1998 y portador de la delección.

Los efectos de la delección sobre la cadena de aminoácidos codificada en BMP15 se estudiaron aplicando el software Bioedit. En condiciones normales, la forma salvaje del exón codifica una secuencia de 245 aminoácidos, que forman una proproteína inmadura. De esos 245 aminoácidos, sólo los últimos 125 se conservan en la proteína madura, que es la que tiene verdadera función biológica.

La delección FecX^R modifica totalmente la secuencia codificada por el exón. De hecho, sólo los primeros 45 aminoácidos se corresponden con la forma salvaje, y pronto, en la posición 100 y 101 aparecen codones de parada, que interrumpen la adición de nuevos aminoácidos. De esta forma, la proproteína ni siquiera contiene la región que debería permanecer en la proteína madura. Su inactividad biológica es por lo tanto totalmente segura, y a efectos fenotípicos la forma FecX^R equivale a la ausencia total del gen BMP15.

La información científica acumulada en los últimos años acerca de las mutaciones de BMP15 nos permite explicar el efecto que FecX^R tiene sobre la prolificidad. Aunque en aquel momento no se disponía de hembras homocigotas para esta mutación, podía considerarse evidente que su efecto acumulativo debía seguir los patrones bien conocidos en casos similares en otras razas. Por lo tanto, las hembras homocigotas presentarían esterilidad primaria, como en todas mutaciones de BMP15 que han provocado codones de parada prematuros o modificaciones sustanciales de la secuencia de la proteína madura.

Esta circunstancia añade matices especiales a la aplicación práctica de la mutación: Si bien es cierto que la utilización de las hembras heterocigotas, puede reportar importantes beneficios, debe evitarse la acumulación de FecX^R en homocigosis. Ello obliga a proporcionar adecuado soporte técnico a los productores, incluida la existencia de un laboratorio que permita confirmar con un coste razonable la condición heterocigota de las hembras de reposición, confirme la condición genética exacta de los machos utilizados, etc.

Deben además tenerse en cuenta todas las necesidades que van a surgir en los aspectos de nutrición, cuidados post-natales etc, que originarán ovejas de estos niveles de producción.

Desde el primer momento, aún siendo conscientes de que la selección precisamente de los animales más prolíficos para la ejecución de este trabajo pudo introducir un sesgo de mayor o menor importancia que nos llevó a una primera estimación de 2.66 corderos /parto, las experiencias acumuladas en otras razas con las mutaciones $FecX^H$, $FecX^I$ y $FecX^L$ nos señalaban en todo caso prolificidades medias en torno a 2 corderos/parto o incluso claramente por encima de ese valor (Bodin et al., 2007; Montgomery et al., 2001). No podían descartarse, por ejemplo, los partos triples con la consiguiente disminución del peso de cada cordero al nacimiento, aunque es bien sabido que, con los cuidados adecuados, estos corderos experimentan crecimientos compensatorios tras el destete.

El Julio de 2007, estos resultados se remitieron a la revista *Animal Reproduction Science* para su publicación, tras haber sido comunicados el mes anterior al Director del Esquema de Mejora Genética de la Rasa Aragonesa.

Poco después, de forma independiente, el hallazgo de $FecX^R$ fue confirmado por otro equipo de investigación (Martinez-Royo et al., 2008).

En resumen, $FecX^R$ suponía desde su descubrimiento una nueva herramienta zootécnica para incrementar la productividad de las explotaciones, al tiempo que planteaba un nuevo reto profesional para nuestros ganaderos y para los técnicos que les prestan su apoyo. Debe tenerse en cuenta que $FecX^R$, como el resto de las mutaciones $FecX$, podía introducirse en cualquier población ovina sin modificar las características fundamentales de las mismas (Davis, 2005). Esa es precisamente la política que han adoptado otros países de gran tradición en la producción ovina, y que más adelante se planteó en este caso.

3.B. RESULTADOS DE LA BUSQUEDA EN OTRAS GANADERÍAS

En septiembre de 2008 se localizaron ocho nuevas hembras con el gen Santa Eulalia en otra ganadería independiente de la primera, en la provincia de Huesca. A la vista de las genealogías de dichos animales se sospechó que también hubiera algún macho portador. Por ello se estudió todo el plantel de machos de la explotación y el 6 de noviembre de 2008 se localizaron tres nuevos machos portadores de la mutación FecX^R, uno de los cuales llevaba cinco años en activo.

Por ello se decidió analizar todo el ganado de la explotación para localizar más hembras portadoras puesto que era muy factible que hubiera más. Esta tarea permitiría al mismo tiempo que la ganadería para localizase posibles hembras homocigotas (por lo tanto estériles) que también podrían existir al haber coincidido hembras y machos portadores.

El resultado fue la identificación de 45 hembras reproductoras adultas portadoras (una de ellas homocigota estéril) y un número importante de corderas y corderos también portadores. Una de estas hembras adultas había nacido en el año 1998 (concretamente el 10 de febrero de 1998). Aunque nos es imposible conocer si la mutación le llegó vía padre o vía madre, este dato permite verificar que la mutación está presente en la explotación al menos en el año 1997, momento del inicio de la gestación de esta oveja. Incluso sería lógico que llevara mucho tiempo atrás si descartamos la posibilidad que la mutación se generara en esa propia hembra. Por lo tanto se puede descartar la introducción de la mutación en la ganadería en época reciente. En el momento de su detección, con 11 años de edad, la oveja había tenido 16 partos con 29 corderos.

A partir de entonces se lleva en esta explotación un control propio para el manejo reproductivo de los machos portadores de la delección y se verifica sistemáticamente su presencia entre los descendientes de las hembras portadoras.

Posteriormente también se descubrió la mutación en otra ganadería de Huesca en 7 hembras adultas.

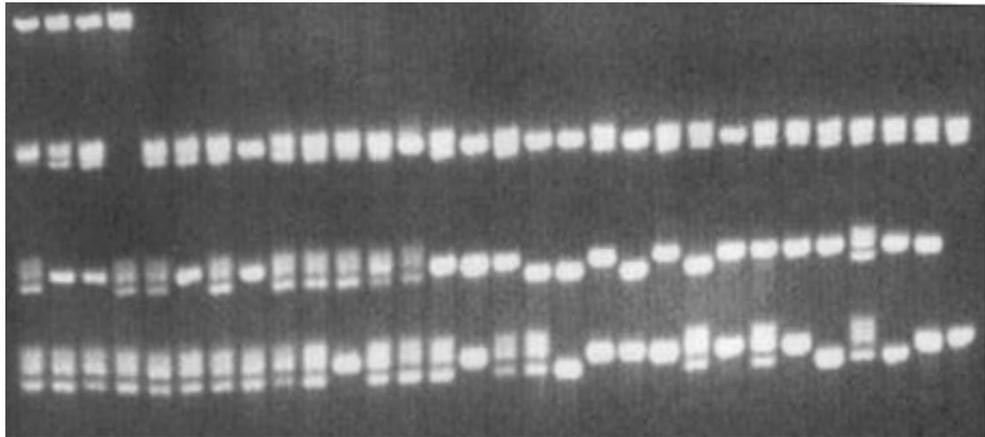


Figura 13: Búsqueda en masa de animales portadores en gel. Cada 15-20 minutos se cargan nuevas muestras en los pocillos, de forma que con un solo gel se pueden diagnosticar entre 120 y 150 muestras, reduciendo los costes.

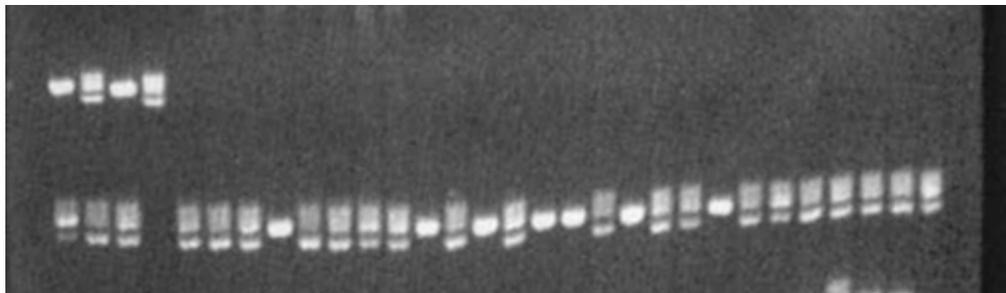


Fig 13b: Imagen del mismo gel tras 50 minutos adicionales de migración: Las muestras de la última fila son ya perfectamente diagnosticadas.

3.C. ESTABLECIMIENTO DEL PLAN DE DIFUSIÓN DEL ALELO FECX^R.

Una vez descubierta la existencia de un gen mayor, el siguiente objetivo fue establecer un mecanismo para su difusión sobre la cabaña ovina en general.

El 25 de septiembre de 2008 quedó aprobado en Asamblea Extraordinaria de ANGRA el Plan de Explotación del Gen Santa Eulalia realizado conjuntamente por D. Juan Altarriba, evaluador genético de la raza; D. Eduardo Vijil, director de la misma y el Equipo Técnico de ANGRA.

Las directrices del Plan que se estableció son las siguientes:

Objetivo

- *Disponer de hembras portadoras del gen.*
- *Evitar las hembras homocigotas estériles.*

Características del plan

- *Planificar con todo detalle los apareamientos selectivos (adecuada gestión genética) empleando la inseminación artificial como principal método para la difusión del Gen*
- *Evitar la consanguinidad*
- *Se necesita un laboratorio que analice al menos todas las hembras que sean candidatas a la reposición*
- *Mantenimiento de la morfología como criterio imprescindible. No se crea una nueva Rasa Aragonesa.*

Calendario

- *Se prevé desarrollar este plan a lo largo del, periodo comprendido entre 2009 y 2012*

3.C.1.- DESARROLLO

A finales de agosto de 2008 se comenzó un nuevo plan específico de entrenamiento en el Centro de Inseminación Artificial El Chantre, propiedad de la Diputación Provincial de Teruel, para el macho 27560-UZ, único macho, en esa fecha, portador de la mutación. Dicho plan permitió obtener dosis seminales a finales de octubre de 2008, aspecto clave para la difusión del alelo mutante FecX^R. Se cuidó especialmente la elección de las ovejas a inseminar para conseguir una buena fertilidad y prolificidad que nos permitiera obtener el mayor número posible de hembras portadoras. Además se intentó que dichas hembras tuvieran un buen historial reproductivo, que hubieran llevado satisfactoriamente hasta el destete todos los corderos de sus partos dobles, sobre todo si procedían de IA. De esta forma intentamos asegurar que la futura madre de las corderas portadoras tuviera una buena capacidad lechera, que pudiera transmitir en parte a sus hijas portadoras, para las que será imprescindible ante la elevada probabilidad de partos múltiples. Fruto de dichas inseminaciones, a finales del mes de marzo de 2009 comenzamos a obtener las primeras hembras portadoras.

Continuando con la etapa preliminar, se fue aumentando el número de hembras portadoras principalmente mediante la inseminación en las ganaderías seleccionadas aprobadas por el Equipo Técnico de ANGRA. También se incrementó el número de machos portadores disponibles, al detectarlos entre los hijos nacidos de las hembras portadoras ya conocidas.

De este modo nacieron y se identificaron 30 machos portadores de la mutación (sobre 58 analizados), parte de los cuales pasaron a entrenarse en los Centros de Inseminación, para seguir incorporando machos donantes al Plan de difusión

Finalmente, como indicamos en el apartado 3.B, el descubrimiento de la delección FecX^R en otras dos ganaderías, además de la inicial donde se detectó, significó un impulso muy importante para esta etapa preliminar del plan. Permitted conseguir muy rápidamente nuevos machos portadores, de diferente origen, para poder incorporar a los centros de testaje, lo que aumentó nuestra velocidad de transmisión del alelo mutante y redujo sensiblemente el posible problema de consanguinidad que se nos podría generar

con un solo macho donante, el cual, cuando se fueron incorporando los nuevos machos donantes, fue disminuyendo su actividad difusora. Además de esos machos incorporados al programa de IA, los ganaderos de las ganaderías iniciales mantuvieron machos portadores en su poder para practicar montas dirigidas con hembras salvajes de sus explotaciones y se incorporaron transitoriamente machos portadores a la ganadería propiedad de ANGRA. Esta incorporación de machos supuso la entrada de estas ganaderías en la siguiente fase del plan de explotación, la denominada “etapa inicial”. Por lo tanto, el 2010 fue el año de la etapa inicial de la explotación del gen Santa Eulalia, con la primera incorporación de los machos portadores que se estaban generando en varias explotaciones con un manejo reproductivo muy fiable.

Ese mismo año comenzaron los primeros partos de las primeras hembras portadoras de la mutación obtenidas por IA. Se realizó un seguimiento de dichos partos para la obtención de más machos y hembras portadoras.

Desde comienzos del mes de junio de 2011 se han incorporado seis machos portadores en otras tantas ganaderías, con el fin de que puedan ir creando su propia reposición de hembras portadoras mediante montas controladas de hembras propias de las explotaciones carentes hasta la fecha de FecX^R.

3.C.2.- INSEMINACIONES ARTIFICIALES

Uno de los elementos fundamentales para el desarrollo del Plan de Explotación del alelo FecX^R han sido las inseminaciones artificiales.

Desde finales de octubre de 2008 hasta la actualidad se han realizado 4694 inseminaciones en 102 ganaderías según se detalla en la Tabla 1:

	2008	2009	2010	2011	TOTAL
27560-UZ	210	782	94	9	1095
43221-CR		62	836	237	1135
43222-CR		78	334	154	566
48667-CR		154	363	168	685
94835-CR			86	247	333
94850-CR			102	331	433
06137-CR				85	85
06138-CR				148	148
06148-CR				224	224
TOTAL	210	1076	1805	1603	4694

Tabla 1: inseminaciones realizadas por los machos portadores de la mutación

El número de machos donantes ha pasado de uno en 2008 a nueve en el año 2011, de forma que se ha podido ir dejando fuera de servicio los sementales con mayor número de dosis para evitar los posibles efectos indeseados de la consanguinidad.

Los machos en servicio y en entrenamiento se encuentran en las instalaciones del ATPSYRA en Movera (Zaragoza) y en el Centro de Inseminación Artificial “El Chantre” de Teruel.

Aun cuando no es un objetivo de esta tesis, se ha querido comprobar si había diferencias entre los machos portadores y no portadores de la mutación respecto a la calidad seminal y a la fertilidad de las inseminaciones.

Para el estudio de la calidad seminal se ha aprovechado los análisis espermáticos rutinarios realizados en ambos centros de inseminación para la correcta elaboración de las dosis seminales.

El análisis estadístico de los mismos demuestra que no hay diferencias significativas entre ambos tipos de sementales en cuanto a volumen de eyaculado, número de espermatozoides totales, porcentaje y número de espermatozoides motiles y porcentaje y número de espermatozoides útiles. La Tabla 2 refleja las concentraciones de espermatozoides obtenidas en los ejemplares salvajes y portadores de la delección FecX^R.

Tabla 2: Recuento de espermatozoides en miles /mililitro (M/ml)

MILES DE ESPERMATOZOIDES / ml			Estadístico	Error típ.
S A L V A J E S	Media		4321.8933	371.46701
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3367.0069	
		Límite superior	5276.7796	
	Media recortada al 5%		4275.8578	
	Mediana		4052.2612	
	Varianza		827926.459	
	Desv. típ.		909.90464	
	Mínimo		3499.50	
	Máximo		5972.92	
	Rango		2473.42	
Amplitud intercuartil		1402.89		
F E C X^R	Media		3515.6182	91.49920
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3261.5757	
		Límite superior	3769.6607	
	Media recortada al 5%		3513.3974	
	Mediana		3586.5332	
	Varianza		41860.515	
	Desv. típ.		204.59842	
	Mínimo		3291.73	
	Máximo		3779.48	
	Rango		487.74	
Amplitud intercuartil		379.00		

La prueba de Levene no ha detectado diferencias significativas entre las varianzas de los dos grupos ($F=4,495NS$; $p=0,063$). El test de t no ha detectado diferencias significativas entre las medias de los grupos ($t=1,924 NS$, $gl=9$, $p=0,086$).

Otra valoración rutinaria en los procesos de inseminación artificial es la de de la motilidad de los espermatozoides. La tabla 3 muestra las observaciones realizadas en cada uno de los grupos:

Tabla 3: Motilidad de los espermatozoides en machos salvajes y FecX^R

Porcentajd de motilidad de los espermatozoides			Estadístico	Error típ.
S A L V A J E S	Media		81.4286	1.53569
	Intervalo de	Límite inferior	77.4809	
	confianza para la	Límite superior	85.3762	
	media al 95%			
	Media recortada al 5%		81.6156	
	Mediana		82.4104	
	Varianza		14.150	
	Desv. típ.		3.76167	
	Mínimo		74.51	
	Máximo		84.98	
Rango		10.48		
Amplitud intercuartil		5.05		
F E C X ^R	Media		82.0435	0.98268
	Intervalo de	Límite inferior	79.3152	
	confianza para la	Límite superior	84.7719	
	media al 95%			
	Media recortada al 5%		82.0528	
	Mediana		81.6757	
	Varianza		4.828	
	Desv. típ.		2.19734	
	Mínimo		79.53	
	Máximo		84.39	
Rango		4.86		
Amplitud intercuartil		4.33		

Como era de esperar a la vista de los datos resumidos en la Tabla anterior, la prueba de Levene no ha detectado diferencias significativas entre las varianzas de los dos grupos ($F=4,378NS$; $p=0,066$) y el test de t no ha detectado diferencias significativas entre las medias de los grupos ($t=2,080 NS$, $gl=9$, $p=0,067$).

Finalmente, el último parámetro de valoración del semen (antes de la inseminación propiamente dicha) es el cálculo de la proporción de espermatozoides útiles. Los resultados más importantes se resumen en la tabla 4:

Tabla 4: Proporción de espermatozoides útiles.

Porcentaje de espermatozoides útiles:			Estadístico	Error típ.
	Media		77.2464	1.90662
S A L V A J E S	Intervalo de confianza	Límite inferior	72.3453	
	para la media al 95%	Límite superior	82.1475	
	Media recortada al 5%		77.5118	
	Mediana		78.3167	
	Varianza		21.811	
	Desv. típ.		4.67024	
	Mínimo		68.47	
	Máximo		81.24	
	Rango		12.77	
	Media		78.1751	
F E C X ^R	Intervalo de confianza	Límite inferior	74.5193	
	para la media al 95%	Límite superior	81.8310	
	Media recortada al 5%		78.2283	
	Mediana		77.8326	
	Varianza		8.669	
	Desv. típ.		2.94431	
	Mínimo		74.26	
	Máximo		81.13	
	Rango		6.87	

Como en los parámetros anteriores, la prueba de Levene no ha detectado diferencias significativas entre las varianzas de los dos grupos ($F=0,350NS$; $p=0,569$), y el test de t no ha detectado diferencias significativas entre las medias de los grupos ($t=-0,384 NS$, $gl=9$, $p=0,710$).

Respecto a la fertilidad de los sementales, se ha empleado los datos de inseminación de todo el Esquema de Mejora de ANGRA en el año 2010, Los resultados de fertilidad de los machos portadores aparecen en la tabla 5.

n° macho	n° ovejas	n° partos	fertilidad
43221-CR	836	421	0,50
48667-CR	363	167	0,46
43222-CR	334	163	0,49
94850-CR	102	39	0,38
27560-UZ	94	49	0,52
94835-CR	86	46	0,53
43225-CR	46	25	0,54
TOTAL	1861	910	0,49

Tabla 5: resultados de fertilidad de los machos portadores donantes de semen.

La fertilidad media ha sido prácticamente similar a la de los machos no portadores. (0,49 portadores vs. 0.47 no portadores).

No se ha establecido comparación entre ambos grupos porque hay que tener en consideración el elevado número de factores que, además del macho, afectan a la fertilidad de una inseminación (ganadería, estado de las hembras, intervalo parto inseminación, centro de inseminación, época del año, inseminador, etc)

3.C.3.- MUESTRAS ANALIZADAS.Y RESULTADOS DEL CONTROL DE LA HERENCIA DE FEC X^R

Junto a las inseminaciones, el otro elemento clave en el plan de explotación del alelo es la existencia de una prueba laboratorial sencilla y económica que nos permite detectar la mutación.

Desde que se puso a punto la prueba se ha llevado a cabo el análisis de 5620 muestras:

- En el año 2007 se estudiaron 123 muestras. Corresponden a los animales seleccionados como sospechosos de presentar un gen mayor que afectara a la prolificidad y a los

análisis realizados a algunos animales más de la explotación donde se descubre inicialmente.

- En el año 2008 se analizan 1380 muestras, la mayor parte de ellas corresponden a todos los animales de la explotación inicial, tras tomarse la decisión de genotiparlos todos para intentar incrementar el número de ovejas portadoras conocidas, que hasta la fecha era muy reducido
- En el año 2009 se estudian 2505 muestras. Como hemos visto en el apartado de resultados, el descubrimiento del gen en una nueva ganadería con la presencia de machos portadores que llevaban varios años en servicio en la ganadería hizo ineludible el genotipado de toda la explotación tanto los animales adultos como los corderos nacidos de algunas parideras. Los motivos de esta decisión fueron dos. Por una parte el gen se había difundido en la explotación sin control y existía el riesgo de la existencia de homocigotas estériles (se detectó una) y por otro lado era evidente que el gen estaba en una considerable proporción. Genotipar los corderos de esta ganadería nos permitió dar un salto cuantitativo muy importante para la difusión de la mutación al obtener un elevado número de machos portadores. Además comienzan los análisis de las primeras hembras portadoras nacidas de las primeras inseminaciones.
- En 2010 se analizan 591 muestras todas ellas de hembras de inseminación artificial y comienzan ya el estudio de las primeras muestras de machos y hembras descendientes de ovejas portadoras
- En 2011 se han realizado hasta la fecha 1021 muestras, parte de ellas de animales nacidos en 2010, con las mismas características que en el año anterior.

Del análisis de los datos obtenidos en el control de la descendencia se desprenden una serie de observaciones interesantes, que pudieran tener trascendencia de cara al establecimiento de todos los programas de mejora:

- Se han analizado 1290 muestras procedentes de hembras nacidas de machos portadores y que por lo tanto debían heredar con toda seguridad el alelo FECX^R paterno. La comprobación de esta circunstancia es en sí misma un verdadero control de

parentesco. Pues bien, la realidad nos indica que 155 de ellas (un 12%) carecen de la mutación, a pesar de todas las precauciones que se toman (ver el procedimiento de toma de muestras en el apartado de material y métodos). Es decir, sus progenitores no son los supuestos. A nuestro juicio, los motivos son dos principalmente: errores en la toma de los datos (tanto por el ganadero como por el técnico) y confusiones en el ahijamiento de los corderos (tanto por recoger las ovejas corderos paridos por otras hembras, como porque el ganadero en caso de duda haya asignado el cordero equivocado). Como nota curiosa, y a la vez señal de la calidad del proceso de control, cabe señalar que unos pocos errores se debieron a la equivocada asignación administrativa de un macho donante de semen como portador de la mutación cuando no lo era (ni siquiera se había analizado al respecto). La equivocación duró hasta que se comprobó que ninguna de sus hijas en la primera tanda de inseminación portaba FecX^R, y se corrigieron inmediatamente los registros.

- De las 1135 hembras nacidas en el proceso e identificadas como portadoras diagnosticadas de FecX^R, actualmente hay inscritas en el Libro Genealógico 641. Es decir, un porcentaje no desdeñable no llega a la inscripción. Las causas de esto son varias, pero las más importantes son la muerte de los animales (son recién nacidos cuando se analizan) o la inaptitud para ser dejados como reposición por defectos físicos graves o por que no cumplen con el estandar racial de la Rasa Aragonesa. En menor medida también se puede achacar a la imposibilidad de localizar el animal por la pérdida de su identificación.
- Se han analizado 380 animales nacidos de estas hembras portadoras:
 - 173 son machos. De ellos, sólo 66 eran portadores (38,15%, frente al 50% teóricamente esperable). Y sólo nueve de ellos actúan en la actualidad como donantes de semen. Esto da idea de la dificultad de obtener machos donantes, puesto que se les exige una gran morfología y además que sean de un grupo de resistencia frente a scrapie, carácter de obligado cumplimiento en el Esquema de Valoración tradicional de ANGRA y que se ha creído conveniente mantener en esta nueva vía de mejora.
 - 207 son hembras y 106 (51,2%) son portadoras, cumpliendo casi literalmente el porcentaje teórico del 50% de hembras portadoras nacidas de otra hembra portadora.

3.D. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ALELO MUTANTE SOBRE LA PROLIFICIDAD

Haciendo un resumen numérico de lo hasta ahora expuesto, se ha inseminado en 102 ganaderías, con objeto de introducir en las mismas el alelo FecX^R. En 46 de ellas ya hay hembras identificadas, nacidas de estas inseminaciones, de las que se ha comprobado que portan dicho alelo. Pero sólo en 31 de estas ganaderías se han producido partos hasta la fecha.

Estos partos provienen de:

- 61 hembras portadoras descubiertas inicialmente: 301 partos
- 174 hembras portadoras por vía macho (inseminaciones básicamente): 450 partos
- 14 hembras portadoras por vía hembra: 25 partos:

En total tenemos 776 partos, con los que vamos a analizar el efecto de la mutación en tres aspectos de capital importancia:

3.D.1. EFECTO SOBRE LA PROLIFICIDAD GENERAL.

Los 766 partos de ovejas portadoras de FecX^R registrados desde 1998 dieron como resultado 1283 corderos, lo que nos permite calcular una prolificidad media de 1,65 corderos/parto. Hay que tener en cuenta que, como se acaba de indicar que la mayor parte de los partos controlados en las ovejas FecX^R son precisamente primeros partos, en general menos prolíficos que los posteriores.

Los 301 partos de ovejas localizadas inicialmente en las explotaciones (no procedentes de nuestro esquema de difusión) proporcionan una media de 1,75 corderos/parto. Es muy difícil en este momento controlar todos los aspectos implicados en estos partos, algunos de hace 13 años (tratamientos hormonales, momento de la implantación de los controles, etc). Por ese motivo, ante el riesgo de sesgos

importantes, se ha descartado realizar un análisis estadístico de estos datos. No obstante, queda señalada la cifra.

Como punto de comparación, la prolificidad de las ovejas de genotipo salvaje en la misma base de datos se sitúa en una media de 1,35 corderos/parto.

Las dificultades a las que nos hemos enfrentado para controlar todas las posibles fuentes de variación del carácter en el pasado, nos han mostrado la necesidad de establecer un programa de control sistemático, explotación por explotación, a partir del momento en el que hemos podido controlar la introducción de FecX^R.

3.D.2.-EFECTO SOBRE LA PROLIFICIDAD EN EL PRIMER PARTO.

Este dato es un muy buen indicador de la mejora de la prolificidad. La Tabla 6 resume los datos disponibles para los primeros partos de ovejas FecX^R nacidas dentro del esquema de difusión de la mutación y los compara con los obtenidos por ovejas de primer parto elegidas al azar en las mismas explotaciones y en la misma temporada, con objeto de eliminar los posibles sesgos inducidos por estos factores. La prolificidad de las ovejas portadoras de la delección en su primer parto alcanza una media de 1,49 corderos/parto, mientras que en las ovejas salvajes con las que se comparan ese valor es de 1,21.

TABLA 6 PROLIFICIDAD EN EL PRIMER PARTO

Condición para BMP15			Estadístico	Error típ.	
TIPO DE OVEJA FecX ^R	SALVAJES		Media	1.21	0.027
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1.16		
		Límite superior	1.26		
			Mediana	1.00	
			Varianza	.166	
			Desv. típ.	0.407	
	Media		1.49	0.040	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1.41		
		Límite superior	1.57		
			Mediana		
		Varianza	0.344		
		Desv. típ.	0.587		

La distribución de los partos simples, dobles triples y cuádruples se presenta en la Tabla 7

Tabla 7. Distribución de los tipos partos en ovejas del primer parto salvajes y portadoras de FecX^R.

			Condición en BMP15		Total
			Salvajes	FecX ^R	
TIPO DE PARTO	SENCILLO	Recuento	182	119	301
		%	79.1%	55.1%	67.5%
	DOBLE	Recuento	48	89	137
		%	20.9%	41.2%	30.7%
TRIPLE	Recuento	0	7	7	
	%	0.0%	3.2%	1.6%	
CUADRUPLE	Recuento	0	1	1	
	%	0.0%	0.5%	0.2%	
Total		Recuento	230	216	446
		%	100.0%	100.0%	100.0%

La representación gráfica de esta distribución de partos se presenta en la Figura 14:

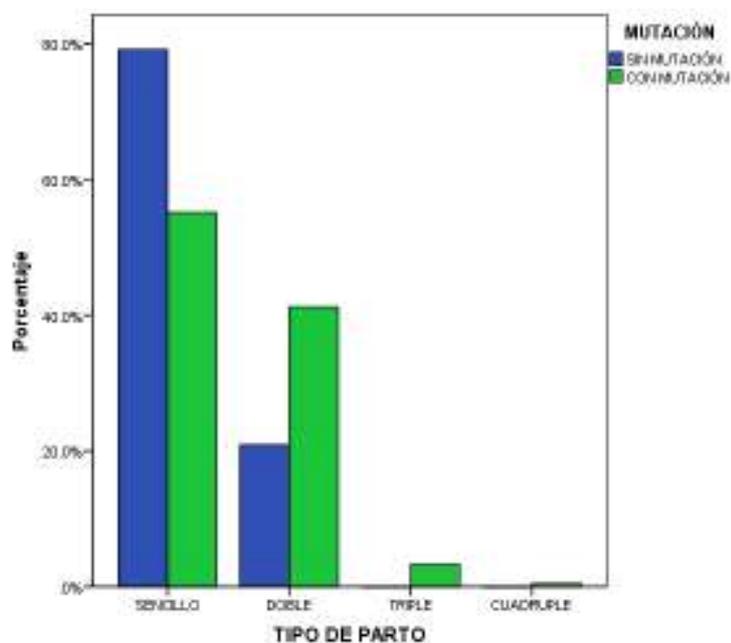


Figura 14: distribución de tipo de parto de los primeros partos

La comparación de la prolificidad en el primer parto de los dos tipos de ovejas mediante tests no paramétricos indica que la diferencia de prolificidad es altamente significativa. Se presenta en la Tabla 8:

Tabla 8: Comparación entre los dos grupos mediante una prueba no paramétrica:

Estadísticos de contraste ^a	
	TIPO_PARTO
U de Mann-Whitney	18677.000
W de Wilcoxon	45242.000
Z	-5.561
Sig. asintót. (bilateral)	0.000

a. Variable de agrupación: Condición salvaje o FecX^R

Entre las ovejas FecX^R (y no entre las salvajes) se han dado algunos primeros partos de tamaño no deseable, es decir, triples y cuádruples. Su proporción es pequeña (3.7%), como se puede apreciar en la Tabla 9, aunque da lugar a una diferencia significativa al respecto, evidenciada por el estadístico exacto de Fisher ($p=0,003$)

Tabla 9: Primeros partos deseables (sencillos y dobles) e indeseables

			CONDICION PARA BMP15		Total
			SALVAJES	FecX ^R	
PARTOS	DESEABLES	Recuento	230	208	438
	(simples y dobles)	%	100.0%	96.3%	98.2%
	NO DESEABLES	Recuento	0	8	8
	(triples y más)	%	0.0%	3.7%	1.8%
Total		Recuento	230	216	446
		% dentro	100.0%	100.0%	100.0%

Para terminar de ilustrar este apartado, la Tabla 10 muestra la distribución de las ovejas salvajes elegidas en cada explotación para comparar la prolificidad en su primer parto con la obtenida por las ovejas FecX^R de su misma explotación:

Tabla 10: Ovejas elegidas en cada explotación para la comparación de la prolificidad en primer parto.

		CONDICION PARA BMP15		Total
		SALVAJES	FecX ^R	
GANADERÍAS	AH	7	2	9
	AT	8	0	8
	BM	18	11	9
	BS	9	2	1
	CD	14	10	4
	CF	7	2	9
	CH	9	9	8
	CR	16	33	9
	DU	6	1	7
	EI	3	2	5
	FS	5	25	30
	FT	8	1	9
	GJ	3	4	7
	GN	16	1	17
	HL	8	2	10
	JR	0	8	8
	LF	7	19	26
	MP	4	2	6
	MU	3	9	12
	NP	2	26	28
	OU	6	1	7
	PB	14	8	22
	PL	3	3	6
	RZ	9	2	11
	SX	8	5	13
	TF	3	3	6
	UM	4	12	16
	UZ	3	5	8
	VS	8	2	10
	YA	13	5	18
ZG	6	1	7	
Total		230	216	446

3.D.3. EFECTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL TIPO DE PARTO EN TODA LA SERIE HISTORICA DE DATOS RECOPIRADOS.

Como ya se ha indicado, en este trabajo se trata de establecer todas las comparaciones entre corderas de primer parto y dotación FecX^R y corderas salvajes también de primer parto, de la misma edad, y de las mismas explotaciones. Se trata así de evitar en lo posible los sesgos estadísticos en la comparación de los datos, y de disponer del máximo control sobre las condiciones de manejo (sobre todo reproductivo) de todas las hembras.

No obstante, y por su interés, creemos importante destacar que los registros de ANGRA incluyen los datos de 788 partos de ovejas FecX^R desde el año 1998, mucho antes de la identificación de la mutación. Entre ellos, sólo 63 se han considerado partos no deseables por haber producido tres o más corderos, aumentando la carga de trabajo de la explotación y/o reduciendo la viabilidad de los neonatos. Es decir, que el porcentaje de estos partos es del 8%, digno por lo tanto de atención técnica, que más adelante se discutirá.



Figura 14: parto doble de una oveja de raza Rasa Aragonesa portadora de la mutación FecX^R

3.E. OTROS EFECTOS: MORTALIDAD DE LOS CORDEROS Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LAS MADRES.

Aunque no son objeto del tema principal de esta Tesis hemos querido hacer una primera aproximación a dos aspectos que suscitan interés en el aspecto técnico y preocupación en el apartado práctico de los responsables de las explotaciones ganaderas, como son los posibles efectos de la existencia de la mutación en la mortalidad de los corderos nacidos de hembras portadoras y en la longevidad de las propias hembras portadoras.

Respecto a la mortalidad de los corderos nacidos de hembras portadoras, los datos disponibles no hacen posible un análisis estadístico riguroso de la mortalidad de los corderos. En primer lugar, tal análisis requiere una toma de datos muy rigurosa y sistemática por parte de los ganaderos.

Se trata de una variable sometida a muchos y muy variables efectos ambientales, dependientes de las explotaciones, su manejo sanitario, las estaciones etc. Precisamente uno de los factores más importantes es la edad de la madre: es bien sabido que son los hijos de las ovejas primerizas los que más riesgo tienen de causar baja, hasta el punto que son no pocos los ganaderos que consideran este primer parto como una mera y deseable “prueba de fertilidad” de las hembras, asumiendo el muy elevado riesgo de que los corderos no sobrevivan.

En los momentos actuales, una muy elevada proporción de los partos de ovejas FecX^R de los que disponemos son precisamente primeros partos, de los que, como se ha visto en lo apartados anteriores, una buena parte son además dobles.

Además, no se dispone de datos precisos sobre las mortalidades de los corderos procedentes de cada tipo de parto en ovejas salvajes en todas y cada una de las explotaciones en las que se han distribuido ejemplares FecX^R.

Por estos motivos, creemos esencial avanzar en el programa de difusión y control, antes de poder elaborar comparaciones que nos lleven a conclusiones bien fundadas sobre este aspecto de la reproducción.

En relación con la longevidad de las portadoras De entrada, se podría presuponer se podría suponer una disminución de la misma por motivo de un mayor desgaste reproductivo y por lo tanto un menor periodo productivo que las ovejas no portadoras. Es evidente que para realizar una correcta aproximación a este tema habrá que esperar cuando menos una generación completa de hembras portadoras. Sin embargo para este primer acercamiento hemos podido utilizar los datos de una de las primeras ganaderías donde se localizó la mutación que ha desarrollado un ejemplar control de producciones lo que nos permite disponer de las fechas de nacimiento de casi todas las Ovejas (sean o no portadoras de FecX^R). El nacimiento más antiguo es del 17 de octubre de 1997 y el más reciente del 7 de marzo de 2011.

Para que la comparación sea correcta, se ha comparado la longevidad de las portadoras frente a las no portadoras en función de su año de nacimiento y los resultados son los que se resumen en la dos Tablas siguientes. En primer lugar, la Tabla 11 muestra el total de ejemplares estudiados en función de su condición para BMP15. En ella se indica cuántos ejemplares han causado ya baja (tiempos completos) y cuántos permanecen vivos a fecha 1 de diciembre de 2011 (tiempos incompletos, que son censurados del análisis de supervivencia).

Tabla 11 : Ovejas incluidas en el estudio de supervivencia.

Condición BMP15	Nº total	Nº de muertos (tiempos completos)	Censurado (tiempos incompletos)	
			Nº	%
Salvajes	2471	1134	1337	54.1%
FecX ^R	86	12	74	86.0%
Global	2557	1146	1411	55.2%

La Tabla 12 indica las medias y medianas del tiempo de supervivencia (medido en meses) de las ovejas en función de su genotipo para BMP15. Como se puede apreciar, en este primer estudio no se aprecia que la supervivencia de las ovejas sea FecX^R inferior a la de las ovejas salvajes, sino que, en principio, han sobrevivido 22 meses más de media. Es evidente que un estudio de estas características deberá prolongarse durante muchos años en el conjunto de todas las explotaciones implicadas en el programa de difusión, y que los datos actuales deben tomarse con precaución.

Sin embargo, en nuestra opinión, el dato de supervivencia observado se debe a que la explotación en la que se ha realizado el estudio cuenta con sistemas informáticos muy avanzados de control de la producción. Todas las ovejas portan bolos electrónicos de control, y pasan periódicamente por una manga de manejo dotada de un detector electrónico. En ese momento se accede a su ficha informática en la que se detallan todos los datos importantes de su vida productiva. La decisión de permanencia de cada oveja en la explotación o de su sacrificio se toma individualmente en función de esos datos. Un determinado ejemplar, independientemente de su edad, puede permanecer en la explotación mientras se considere que mantiene niveles aceptables de rentabilidad. En ningún caso el descarte de las reproductoras se produce de forma automática, por ejemplo en función de su edad.

A nuestro juicio es esta forma de manejo puede explicar la razón de esta mayor supervivencia, más que una mayor resistencia a enfermedades o la existencia de diferencias metabólicas que lo pudieran justificar

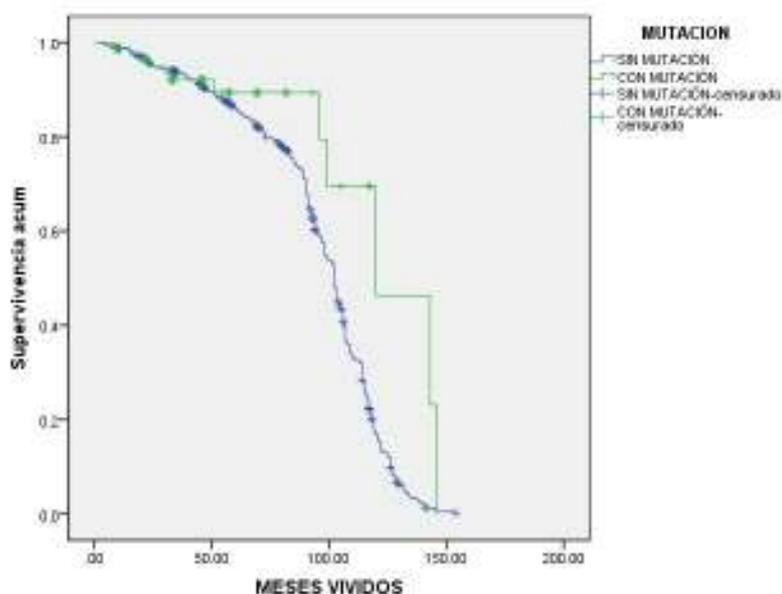
Tabla 12: Media y mediana del tiempo de supervivencia (medido en meses) de las ovejas en función de su genotipo para BMP15

CONDICION PARA BMP15	Media ^a			
	Estimación	Error típico	I. de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
SALVAJES	95.271	0.740	93.821	96.721
FecX^R	117.234	8.054	101.450	133.019
Global	95.477	0.735	94.036	96.918
	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
SALVAJES	102.000	0.779	100.472	103.528
FecX^R	120.000	19.700	81.388	158.612
Global	102.000	0.872	100.291	103.709

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

La gráfica acumulada de supervivencia de cada tipo de animal se muestra en la Figura 15. Nótese la diferencia entre las medianas del tiempo de supervivencia en cada tipo de animal

Figura 15: Gráfica acumulada de supervivencia de las ovejas salvajes y mutadas, Los jalones en las líneas muestran la posición de animales con tiempos incompletos (es decir, vivos en el momento del cierre del estudio, el 7 de diciembre de 2011)



Pese a que la tendencia de la supervivencia parece evidente, esta diferencia a favor de los animales no se traduce en una diferencia estadísticamente significativa. La Tabla 13 muestra los resultados de un test no paramétrico (test de Breslow o de Wilcoxon generalizado).

Tabla 13. Resultados del test de igualdad entre las distribuciones de la mortalidad de las ovejas salvajes y mutantes.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.235	1	0.266

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para ovejas salvajes y FecX^R de una explotación.

3.F. DIFUSION DE FECX^R EN OTRAS RAZAS.

Como ya se ha indicado en el apartado de Introducción, las mutaciones de BMP15 y otros genes mayores implicados en el incremento de la prolificidad pueden introducirse en otras razas mediante cruzamientos o inseminación artificial. Los animales descendientes de los cruzamientos pueden someterse posteriormente a cruzamiento por absorción, controlando en laboratorio el mantenimiento de la mutación en cuestión entre los descendientes seleccionados para la reproducción.

De esta forma, en el plazo de unas pocas generaciones (dos ó tres como máximo, en el caso de razas cercanas entre sí), se obtienen animales de exterior indistinguible de los propios de la raza receptora y, lo que es más importante, puede conseguirse que estos animales mantengan todas las características de adaptación a sus condiciones ambientes particulares. El ejemplo de la introducción de la mutación Booroola en merinos a partir de la raza Garole es quizá el más extremo que se puede plantear, dada la gran diferencia de morfología y aptitud entre la raza donante (Garole) y la receptora (Merino) (Davis et al., 2002). Pese a que en aquel momento no era conocida la mutación responsable de la hiperprolificidad y no era posible su identificación por análisis de DNA, se consiguió que las ovejas Booroola la adquirieran, manteniendo sus demás características, entre las que destaca su aspecto externo totalmente “amerinado”, que en nada recuerda el fenotipo Garole (Figuras 16 y 17).



Figura 16: Hembra Garole



Figura 17: Macho Garole

En el caso de la mutación detectada en la Rasa Aragonesa se llegó a un acuerdo de colaboración mutua entre ARANA (Asociación de Ovino de Raza Navarra) y ANGRA, por el que durante el año 2010 (y sucesivos según convenga) se suministraron

dosis seminales portadores de FecX^R para incorporarlo al patrimonio genético de la Raza Navarra. Técnicos de ARANA examinaron previamente los machos donantes y valoraron positivamente su conformación general. Hasta el momento se han proporcionado 250 dosis durante los meses de abril y mayo del año 2010 y 2011. Este hecho ha supuesto un gran respaldo al trabajo realizado en el Esquema de Mejora de ANGRA.



Figura 18: Corderas de raza Navarra portadoras de FecX^R y propiedad de ARANA.

Fruto de esas dosis se han conseguido más de 50 corderas portadoras de la mutación que están siendo recriadas en una finca propiedad de Instituto Técnico Ganadero de Navarra (ver figura 18) y sobre las que se va a seguir un plan reproductivo diseñado por la Asociación para la obtención de machos portadores.

4.DISCUSIÓN

A la luz de los resultados alcanzados, es evidente que FecX^R puede suponer un cambio muy notable en los esquemas productivos actualmente utilizados en la ganadería ovina española, y especialmente en la explotación de la raza Rasa Aragonesa.

Por una parte, los ejemplares heterocigotos para esta delección presentan un muy notable incremento de la prolificidad, hasta el punto de que puede considerarse que han alcanzado mejoras superiores a las obtenidas por el esquema de selección clásico. Se trata, sin duda, de un ejemplo arquetípico de las posibilidades que ofrece un gen mayor, sobre todo en la mejora de caracteres cuantitativos de baja o muy baja heredabilidad, como la prolificidad ovina.

En la XXV Evaluación Genética del Esquema de Valoración de Sementales de ANGRA realizada en junio de 2011, la elevada prolificidad de sus hijas en sus partos ha empujado al primer macho en el que se detectó la delección al primer puesto en el ranking del libro genealógico de ANGRA. Como se ha indicado en el apartado de introducción, la prolificidad era y es el principal objetivo de mejora en la raza, lo que explica esta elevada valoración. Es quizá el momento de plantear modificaciones en el funcionamiento del esquema de valoración de sementales, probablemente evaluando por separado los ejemplares portadores y no portadores de FecX^R o simplemente eliminando de la valoración poligénica a los animales portadores. Alternativamente, podría destacarse en la ficha de los ejemplares su condición respecto a este locus, como ya se hace con diferentes loci de interés, en otras especies como la bovina, en la que el genotipo de cada semental para diferentes enfermedades recesivas se indica en la ficha que cada ganadero o técnico puede consultar antes de decidir la adquisición de dosis de semen.

Pero las modificaciones que la utilización de FecX^R puede llevar aparejadas van mucho más lejos. Quizá el dato más importante es la esterilidad primaria en las hembras homocigotas para la delección. Esta circunstancia, de etiología todavía no muy clara, obliga a efectuar un control muy estricto de todo el proceso, para garantizar que machos portadores hemocigotos no cubren a hembras heterocigotas, con el resultado esperable de un 50% de las hembras descendientes estériles. Es decir, la elección (o el descarte) de reproductores depende del genotipo que para esta delección presente cada individuo.

En numerosas circunstancias, incluso, es imprescindible realizar la comprobación en laboratorio del genotipo de cada ejemplar antes de decidir su envío al cebo (y al sacrificio) o su incorporación a los lotes de reposición.

Este tipo de manejo no ha sido siquiera considerado anteriormente en la especie ovina, con la excepción del genotipado para el gen PrP (sensibilidad al scrapie) que la legislación europea hizo obligatoria para eliminar los alelos de mayor susceptibilidad a esta enfermedad. El primer reto, por lo tanto, ha sido para los técnicos, obligados a poner en marcha procedimientos eficientes y muy económicos para la determinación del genotipo FecX^R en cada ejemplar (Monteagudo et al, 2008). A fecha de hoy día, puede estimarse en 2 euros el coste por individuo de este ensayo en laboratorio (sin contar la mano de obra). Se ha renunciado expresamente a procedimientos que no puedan ejecutarse en un laboratorio dotado con el equipamiento básico de genética molecular, sin necesidad de recurrir a la externalización de los análisis por precisar de equipos y procedimientos costosos. Igualmente, se ha evitado el uso de Bromuro de Etidio en la coloración de los geles, para simplificar la gestión de los residuos peligrosos en el laboratorio y eliminar el único reactivo que presentaba algún riesgo en todo el protocolo. Un solo técnico de laboratorio con formación básica (Formación Profesional) podría realizar a jornada completa un mínimo de 2.000 determinaciones al mes.

En las páginas dedicadas a la metodología y a los resultados se presentan las imágenes reales de diferentes geles de agarosa con los resultados de algunos de estos protocolos de análisis.

Una vez garantizado el correcto genotipado de cada ejemplar, quedan por valorar las circunstancias de la explotación, sobre el terreno, de las ovejas FecX^R. El importante incremento de prolificidad, supone en sí mismo un cambio en las propias circunstancias de las explotaciones. Cada una de ellas está sometida a diferentes circunstancias, y puede requerir una diferente adaptación de cada ganadero con el apoyo de los técnicos veterinarios. Entre otras consecuencias, el incremento de prolificidad supone:

- Un mayor input de mano de obra desde el mismo momento del parto, (vigilancia de los mismos, limpieza y desinfección de más ombligos,

colocación de un mayor número de crotales...), y en todas las tareas que el cuidado de los corderos recién nacidos implica en toda explotación.

- El incremento de la proporción de partos triples o superiores, que deben limitarse mediante las adecuadas actuaciones técnicas. Es un hecho que en distintas explotaciones la proporción de tales partos es muy variable. Entre las medidas que se pueden aplicar para reducirla destaca desaconsejar el uso de tratamientos hormonales para la sincronización de celos. Hay experiencias que demuestran que el empleo en hembras portadoras de la mutación de dosis de eCG incluso a niveles inferiores a las recomendaciones standard (un tercio menos de la dosis habitual) tienden a incrementar de forma significativa el número de partos triples (Lahoz et al. 2009).

- A la vista del efecto de la presencia de la mutación sobre el primer parto se hace sumamente importante llevar a cabo un impecable manejo de las hembras portadoras de reposición hasta su cubrición inicial (Interovic, 2007). Si en todas las corderas es necesario, en éstas se considera imprescindible que lleguen a su cubrición con un adecuado desarrollo corporal, sacrificando y retrasando si es necesario el momento teórico de su cubrición por edad al momento en que tengan el desarrollo y condición corporal óptima. Si no se desea retrasar la cubrición, la alimentación de las corderas es fundamental, evitando que las corderas pastoreen en épocas de escasez en el campo. No sería descartable la opción de mantener las corderas estabuladas hasta su cubrición con machos jóvenes en un lote por separado de las ovejas y machos adultos. Igualmente será necesaria vigilancia especial en el momento del parto. Es conocido que las primíparas ahijan peor a sus corderos por falta de instinto maternal y que hay una mayor frecuencia de partos distócicos. Si a ello le añadimos una mayor proporción de partos múltiples se genera un cóctel de circunstancias que podrían comprometer seriamente la viabilidad de los corderos nacidos. Una buena opción, si fuera posible, sería el empleo de jaulas de parto para

que estas corderas parieran individualmente en confinamiento y si no es posible esto emplear al menos jaulas de ahijamiento tras el parto.

- Controlar y mejorar la capacidad maternal de las madres, empezando por su capacidad lechera para ahijar y amamantar más de un cordero. Los costes de un incremento de la lactancia artificial deben evitarse en lo posible.
- Gestión de la alimentación en la explotación de forma que se garantice la correcta nutrición de las madres en los momentos de mayores requerimientos.

El envejecimiento de los ganaderos en las últimas décadas y las dificultades para la renovación generacional en el sector pueden considerarse un problema general y adicional a todos los expuestos. En general, nuestra experiencia indica que los ganaderos de más edad manifiestan menor interés en la modificación de sistemas productivos y en inversiones económicas a medio y largo plazo.

Puede decirse que un momento crítico en la difusión de la delección FecX^R es precisamente la elección de las ganaderías en las que puede procederse a su explotación. Por una parte, y a la vista de las circunstancias arriba detalladas, no todos los ganaderos manifiestan interés por su adquisición.

Por otra parte, no todas las ganaderías que la solicitan están en condiciones de gestionarla. En todo caso, hasta la fecha, cada rebaño implicado ha incorporado, a modo de ensayo, un pequeño núcleo de reproductoras FecX^R, con vistas a evaluar en la práctica su manejo y sus producciones sobre el terreno.

Posiblemente la proporción de hembras portadoras dentro del censo total de la explotación será la que determine los distintos aspectos de manejo que se han repasado en este apartado. Mientras que, como se indica en el párrafo anterior, haya un pequeño núcleo de portadoras en las explotaciones el manejo se puede limitar a excluir tajantemente de cualquier tratamiento hormonal de sincronización de celos a estas

hembras y a procurarles una atención más individualizada en el momento del parto cosa muy factible puesto que están perfectamente identificadas. Estas dos acciones no supondrían afectaciones significativas en el manejo reproductivo y alimenticio general de la explotación.

La situación será seguramente diferente será cuando existan ganaderías con una considerable proporción de ovejas portadoras. En ese momento deberán plantearse cambios generales en el plano de la alimentación, elaborando racionamientos acordes con las necesidades de una gran proporción de gestaciones y lactaciones dobles.

Capítulo aparte merece la reflexión sobre el manejo reproductivo que una explotación comercial de este tipo pudiera tener (sin contemplar la posibilidad de manejar por separado cada tipo de hembra, lo que en la práctica serían dos explotaciones). La recomendación técnica de evitar la sincronización de celos hormonal podría comprometer las cubriciones en épocas desfavorables de las que nacen los corderos económicamente más rentables, por lo que se resentirían los resultados económicos de la explotación. Sería necesario trabajar sistemáticamente con otro tipo de estímulos en estas explotaciones, tales como un efecto macho bien realizado y sobre todo el empleo de melatonina, para poder sincronizar pero sin incrementar sustancialmente la prolificidad (Forcada et al, 2000)(Abecia et al, 2002)

En un plano puramente teórico y en aquellas ganaderías en las que los partos no deseables alcanzaran porcentajes superiores a la media, se podrían establecer métodos que favorecieran las cubriciones en épocas tempranas tras los diferentes anoestros (de lactación principalmente). De hecho, se ha establecido que la tasa de ovulación se va recuperando progresivamente tras la salida del anoestro (Forcada et al., 1992). Por lo tanto una buena estrategia sería cubrir los animales lo antes posible tras el destete (machos en los lotes de lactación que aprovecharan los primeros celos que fueran surgiendo, empleo de melatonina en hembras paridas para sincronizar una cubrición rápida post destete (Abecia et al, 2002) etc.)

Otra opción para tratar la problemática del exceso de partos no deseados en una explotación sería la retirada de la reproducción de las hembras que sistemáticamente repitieran este tipo de partos, a la vista del análisis del control de

producciones que la explotación lleve. O cuando menos manejo individualizado de esas hembras en el parto y evitar dejar animales de reposición de ellas.

5.CONCLUSIONES

1. El alelo FecX^R supone una nueva herramienta zootécnica para incrementar la productividad de las explotaciones, y al mismo tiempo un nuevo reto profesional para nuestros ganaderos y para los técnicos que les prestan su apoyo. Es perfectamente factible la difusión controlada del Gen Santa Eulalia sobre la cabaña ovina en general, aplicando una estrategia perfectamente predefinida. Debe tenerse en cuenta que FecX^R, como el resto de las mutaciones FecX, puede introducirse en cualquier población ovina sin modificar las características fundamentales de las mismas.

2. El análisis de la distribución de los partos de las ovejas mutantes pone de manifiesto la existencia de un porcentaje no desdeñable (8%) de partos triples o superiores. Esta circunstancia debe ser conocida por los gestores de las explotaciones, de forma que se mantengan bajo estricto control técnico todos los actos que puedan afectar a la reproducción de dichos animales (tratamientos hormonales, etc).

3. Dicho control debe extenderse al total de la explotación siempre que se conozca la existencia de la mutación en la misma y no se haya realizado una identificación fiable mediante análisis de ADN de los animales mutantes. De esta forma, se podrán minimizar los posibles efectos no deseados, empezando, como es lógico, por evitar la introducción en los lotes de reposición de corderas homocigotas FecX^R / FecX^R, que serán estériles a lo largo de toda su vida.

4. Teniendo en cuenta y asumiendo los riesgos expresados en los párrafos anteriores, los resultados de prolificidad histórica (1.65 corderos/parto frente a 1.35 corderos/parto oveja media) avalan las expectativas iniciales creadas con el descubrimiento del alelo FecX^R.

5. El análisis de los primeros partos de las ovejas FecX^R revela una proporción de partos dobles muy superior a la de las ovejas salvajes, que acaba resultado en prolificidades medias de 1,49 y 1,21 corderos/parto respectivamente. Sólo el 3,7% de estos primeros partos de las hembras fue indeseable por ser triple (3,2%) o cuádruple (0,5%).

6. No se ha apreciado un acortamiento de la supervivencia de las hembras FecX^R .

6.RESUMEN

La prolificidad es un carácter de gran importancia económica para mejorar la productividad numérica y en consecuencia la rentabilidad de los rebaños ovinos de aptitud cárnica. Su mejora por selección genética en nuestras razas ovinas rústicas es muy difícil y lenta, por la muy baja heredabilidad de este carácter.

Por ese motivo se exploró la vía de la posible existencia de algún gen mayor implicado en el carácter en la raza Rasa Aragonesa. Como primeros genes candidatos, se eligieron dos que ya habían demostrado su importancia en razas extranjeras: BMP15 y GDF9.

El punto de partida del trabajo fue la exhaustiva revisión de la base de datos de partos elaborada por ANGRA desde hace años, para enfocar nuestra atención sobre ejemplares con alta probabilidad de presentar un gen mayor con efectos sobre la prolificidad. De acuerdo con esta idea, se seleccionaron en la base de datos de ANGRA un total de 12 ovejas de alta prolificidad y cinco moruecos. La información obtenida del gen GDF9 fue de escasa trascendencia. Por el contrario, a mediados de febrero del 2007 se identificó la presencia de una delección en el gen BMP15 en la oveja más prolífica de la base de datos, a la que se denominó FecX^R.

Tras su secuenciación, se han evaluado las posibles repercusiones que la difusión de la mutación puede tener sobre la prolificidad de la raza y la creación y desarrollo de un Plan que permita la difusión de la mutación a todas las ganaderías que se consideren técnicamente aptas.

El alelo FecX^R supone una nueva herramienta zootécnica para incrementar la productividad de las explotaciones. Los resultados de prolificidad (1.65 corderos/parto frente a 1.35 corderos/parto oveja media) avalan las expectativas iniciales creadas con el descubrimiento del alelo FecX^R. Es perfectamente factible la difusión controlada de la mutación sobre la cabaña ovina en general, aplicando una estrategia perfectamente predefinida. De esta forma, se podrán minimizar los posibles efectos no deseados, empezando, como es lógico, por evitar la introducción en los lotes de reposición de corderas homocigotas FecX^R / FecX^R, que serán estériles a lo largo de toda su vida.

Además, el análisis de la distribución de los partos de las ovejas mutantes pone de manifiesto la existencia de un porcentaje no desdeñable (8%) de partos triples o superiores. Esta circunstancia debe ser conocida por los gestores de las explotaciones, de forma que se mantengan bajo estricto control técnico todos los actos que puedan afectar a la reproducción de dichos animales (tratamientos hormonales, etc).

Summary

Prolificacy is an extremely important trait in order to increase numeric productivity and profit in meat production ovine flocks. However, its genetic improvement in the Spanish rustic ovine breeds is very difficult and slow, due to its very low heritability.

Therefore, the existence of major genes involved in prolificacy was investigated in the Rasa Aragonesa breed. Two loci were chosen as suitable candidates, in the light of their well known importance in foreign breeds: BMP15 and GDF9.

The start point of our research was an exhaustive search in the births' database prepared by ANGRA along several years, in order to focus our attention on individuals probably bearing major genes modifying prolificacy. A total of 12 ewes and five rams were chosen. Interesting information was not obtained in these animals for the locus GDF9. On the opposite, in February 2007, a deletion in the BMP15 was identified in the most prolific ewe of the database. This deletion was named FecX^R.

After sequencing the deletion, its possible effects on the breed prolificacy have been evaluated, together with the development of a Plan to spread it in the farms considered to be technically able to manage it.

The FecX^R allele has shown to be a new tool to increase the productivity in the flocks. Prolificacy results (a mean of 1.65 lambs/birth vs. 1.35 lambs/birth in wild type ewes) have confirmed the first expectations after the discovery. The controlled diffusion of the mutation in the general ovine population is totally feasible as long as a perfectly

designed strategy is applied. This should minimize the possible undesired effects, like the occurrence of the sterile homozygous $FecX^R / FecX^R$ ewes.

Besides this, our analysis has revealed a certain proportion (8%) of triplets and quadruplets among the births obtained from the $FecX^R$ females. This fact should be known by farm managers, in order to keep any factor affecting reproduction of such individuals (hormonal treatments etc.) under strict technical control.

7.BIBLIOGRAFÍA

Abecia JA, Forcada F, Martino A, Zúñiga O, Valares JA, Ferrer LM. Posibilidades del uso de la melatonina exógena en España. *Albeitar* 2002;52: 30-31.

Abecia JA, Valares JA, Forcada F, Zúñiga O. Efecto de la colocación de implantes de Melatonina tras el parto en ovejas de Raza Rasa Aragonesa XXVI Jornadas Seoc 2002, 961-965.

Altarriba J, Lamuela M. Perspectivas Filogenéticas de la Rasa Aragonesa. Diputación Provincial. Institución "Fernando el Católico". 1983. Zaragoza.

Altarriba J, Varona L, García-Cortés LA, Moreno C. Bayesian Inference of variance components for litter size in Rasa Aragonesa Sheep. *J. Anim. Sci.* 1998;76:23-28

Altarriba J, Moreno C, García-Cortés A, Yagüe G, Ponz, R. Mejora genética para prolificidad en Rasa aragonesa. XXV Jornadas SEOC 2001, 265-270.

Altschul SF, Madden TL., Schaffer AA., Zhang J, Zhang Z., Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389-3402.

Barillet F, Arranz JJ, Carta A. 2005. Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genetics Selection Evolution.* 2005;37:S109-S123.

Barzegari A, Atashpaz S, Ghabili K, Nemati Z, Rustaei M, Azarbajani R. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 Associated with Fertility and Ovulation Rate in Moghani and Ghezel Sheep in Iran. *Reproduction in Domestic Animals* 2010;45(4):666-669.

Becker D, Tetens J, Brunner A, Bürstel D, Ganter M, Kijas J; International Sheep Genomics Consortium, Drögemüller C. Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (PITX3) gene. *PLoS One.* 2010 Jan 13;5(1):e8689.

Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. 1999. *Biol. Reprod.*;60:381-386.

Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 2007;148(1):393-400.

Bodin L. Genes mayores en Ganado ovino, implicaciones en la reproducción. pR 7 2006; 3: 38-44

Bodin L. Special Issue - International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats. 8-11 december 2003, Toulouse, France. *Genetics Selection Evolution*. 2005;37(supp. 1): S1-S123.

Bodin L, SanCristobal M, Lecerf F, Mulsant P, Bibé B, Lajous D, Belloc JP, Eychenne F, Amigues Y, Elsen JM. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genet Sel Evol*. 2002 Jul-Aug;34(4):447-64.

Bolet G. Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: genetic variability. Embryonic mortality in farm animals. Commission of the European Communities. Coordination of agricultural research. 1986

Broad TE, Glass BC, Greer GJ, Robertson TM, Bain WE, Lord EA, McEwan JC. Search for a locus near to myostatin that increases muscling in Texel sheep in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 2000;60:110-112.

Charlier C, Leroy PL. Comparison of muscular fibers of double-muscled Texel and Bleu du Maine. *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, 25-29 August 1996, Lillehammer, Norway, Session S3.20.

Chen AQ, Yu SD, Wang ZG, Xu R, Yang ZG. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: Effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicles. *Anim.Reprod.Sci*. 2009;111(2-4):391-399.

Chu MX, Ji C L, Chen G H: Association between PCR RFLP of Melatonin Receptor 1A Gene and High Prolificacy in Small Tail Han Sheep. *Asian Aust J Anim Sci.* 2003; 16 (2): 1701-1704.

Chu MX, Cheng DX, Liu W Z, Fang L, Ye SC: Association between melatonin receptor 1A gene and expression of reproductive seasonality in sheep. *Asian Aust J Anim Sci.* 2006;8:1079-1084.

Chu M. X.; Yang J.; Feng T.; et al. GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Mol Biol Rep* 2011;38(8): 5199-5204,doi: 10.1007/s11033-010-0670-5

Clop A., Marcq F., Takeda H. et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics.* 2006; 38: 813–8.

Cockett NE, Smit MA, Bidwell CA, Segers K, Hadfield TL, Snowden GD, Georges M, Charlier C. The Callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. *Genetics Selection Evolution.* 2005;37: S65-S81.

Crawford AM, Swarbrick PA, Buchanan FC, Doods KG. DNA fingerprinting analysis of Booroola pedigrees: a search for linkage to the Booroola gene. *Theor Appl Genet.* 1993;87:271-277

Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution* 2005;37:S11-S23.

Davis GH. Fecundity genes in sheep. *Anim.Reprod.Sci.* 2004;82(3):247-253.

Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden BM, Hanrahan JP, Mullen M, Mao XZ, Wang GL, Zhao ZS, Zeng YQ, Robinson JJ, Mavrogenis AP, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdottir E, Arranz JJ, Notter DR. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim.Reprod.Sci.* 2006;92(1-2):87-96.

Davis GH, Dodds KG, Wheeler R, Jay NP. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction*. 2001;64(1):216-221.

Davis GH, Dodds KG, Wheeler R, Bruce GD. Further evidence of non-Mendelian inheritance at the FecX2 locus in a prolific sheep flock, in: *Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, 19–23 August 2002, Inra, Castanet-Tolosan, France, Vol. 30, pp. 641–644.

Davis GH, Dodds KG, Bruce GD. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecX^L) and Hanna (FecX^H) sheep. *Proc. Assoc. Adv. Anim Breed. Genet.* 2001;14:175-178

Davis GH, Farquhar PA, O'Connell AR, Everett-Hincks JM, Wishart PJ, Galloway SM, et al. A putative autosomal gene increasing ovulation rate in Romney sheep. *Anim.Reprod.Sci.* 2006;92(1-2):65-73.

Davis GH, Galloway SA, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, et al. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol.Reprod.* 2002;66(6):1869-1874.

Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid in the control of clinical scrapie. *The Veterinary Record*. 1998; 142:623-625

Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am.J.Hum.Genet.* 2004; 75(1):106-111.

Drouilhet L, Lecerf F, Bodin L, Fabre S, Mulsant P. Fine mapping of the FecL locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. *Anim.Genet.* 2009; 40(6):804-812.

Elandt- Johnson R.C.& Johnson N.L. *Survival Models and Data Analysis*. John Wiley and Sons, Inc., 1980.

Elsen JM, Barillet F, Khang JVT, Schelcher F, Amigues Y, Laplanche JL, Poivey JP, Eychenne F. Genetics of susceptibility to scrapie in sheep: current research and prospect. *Productions Animales*. 1997; 10(2):133-140.

Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, DiPasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4:20

Falconer DS. *Introducción a la genética cuantitativa*. CECSA. 1986

Feary ES, Juengel JL, Smith P, French MC, O'Connell AR, Lawrence SB, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. Patterns of expression of messenger RNAs encoding GDF9, BMP15, TGFBR1, BMPR1B, and BMPR2 during follicular development and characterization of ovarian follicular populations in Ewes carrying the Woodlands FecX2(w) mutation. *Biol.Reprod*. 2007;77: 990-998.

Fogarty NM. A review of the effects of the Booroola Gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*. 2009; 85(2-3): 75-84

Forcada F., Abecia JA y Sierra I. Seasonal changes in Oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Rumin. Res*. 1992, Volume 8, Issue 4, Pages 313-324

Forcada F, Abecia JA, Zúñiga O, Martino A. Posibilidades de aplicación práctica de la melatonina en el control de la actividad reproductora del ganado ovino. *OVIS*. 2000;71: 65-86.

Fremont A. *Determinisme et variabilité genetique du poids de l'épiphyse et de la concentration plasmatique de melatonine chez les ovins*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2001, 77 p.

Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, et al. Bmp15 mutations and ovarian function. *Mol.Cell.Endocrinol*. 2002;191(1):15-18.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat.Genet.* 2000;25(3):279-283.

Gemmell NJ, Slate J. Heterozygote Advantage for Fecundity. *Plos One* 2006;1(2).

Georges M, Charlier C, Cockett N. The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends in Genetics.* 2003;19(5): 248-252.

Grasa R. Recopilación Bibliográfica del Ganado Ovino en Aragón. 1989.

Gray AJ, Davis GH. Commercial performance of sheep carrying the inverdale gene (FecX). *Proceedings Of The New Zealand Society Of Animal Production* 1995; 55: 294-295.

Guo W, Chu MX, Deng XM, Feng JD, Li N, Wu CX. Association of a single codon deletion in bone morphogenetic protein 15 gene with prolificacy in small tail han sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2004;17(11):1491-1495.

Hall, T., 2004 BioEdit. <www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Hanocq E, Bodin L, Thimonier J, Teyssier J, Malpoux B, Chemineau P. Genetic parameters of spontaneous spring ovulatory activity in Mérinos d'Arles sheep. *Genetics Selection Evolution* 1999, 31:77-90

Hanrahan JP, Owen JB. Variation and repeatability of ovulation rate in Cambridge ewes. *Anim Prod* 1985; 40:529

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol.Reprod.* 2004;70(4):900-909.

Haycock HL, Hanrahan JP, Roche JF, Crowe MA. Effects of GDF9 and BMP15 on follicle number and hormonal levels in anoestrous sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2006;41(4):371-371.

Hernandez X, Bodin L, Chesneau D, Guillaume D, Allain D, Chemineau P, Malpoux B, Migaud M. Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Ile-de-France ewes. *Reprod Nutr Dev.* 2005 Mar-Apr;45(2):151-62

Hua GH, Yang LG. A review of research progress of FecB gene in Chinese breeds of sheep. *Anim.Reprod.Sci.* 2009;116(1-2):1-9.

INTEROVIC. Guía de Prácticas Correctas de Higiene. M.A.R.M. 2007

Javanmard A, Azadzadeh N, Esmailizadeh AK: Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Vet Res Commun;* 2011 Mar;35(3):157-67

Jonmundsson JV, Adalsteinsson S. Single genes for fecundity in Icelandic sheep. In: Land RB, Robinson DW (eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. London: Butterworths; 1985:159–168.

Jónmundsson, JV, Eythórsdóttir, E. Loa – a new fecundity gene in the Icelandic breed of sheep. *Proc. Int. Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat*. Toulouse 8-11 December 2003, France, CDROM communication 210.

Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim.Reprod.Sci.* 2004;82-3:447-460.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol.Reprod.* 2002;67(6):1777-1789.

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol.Reprod.* 2004;70(3):557-561.

Lahoz B, Alabart JL., Martí JI, Echegoyen E., Calvo JH, Martínez-Royo A., Vijil E, Folch J. ¿Es necesario reducir la dosis de eCG en corderas prolíficas portadoras del alelo

FecX^r (roa)?: Efecto de dos dosis diferentes sobre la fertilidad y prolificidad SEOC 2009 Barbastro. pp. 351-355

Lanneluc I, Drinkwater RD, Elsen JM, Hetzel DJS, Nguyen TC, Piper LR, Thimonier J, Harrison B, Gellin J. Genetic markers for the Booroola fecundity (*Fec*) gene in sheep. *Mammalian Genome*. 1994;5:26-33.

Laviña A, Macias AM, Martin E, Arellano P, Murillo S, Ponz R, Monteagudo LV, Tejedor T, Sierra I, Vijil, E. Analisis de la distribucion de partos de ovejas portadoras del alelo *Fec X^r* del gen BMP 15. SEOC 2009 Barbastro. pp. 408-412

Laszlo Z. Genetic aspects of prolificacy in mammalian domestic animals. Literature review. *Magy.Allatorv.Lapja* 2006;128(4):246-254.

Lecerf F, Mulsant P, Elsen JM, Bodin L. Localisation and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 19-23 août 2002, Com.08-31.

Mahler X, Lechere AK. High prolificacy in Belle-Ile sheep (Brittany-France)-major effects of a putative single gene and a (wh) colour gene on ovulation rate and litter size. *Reprod. Nutr. Dev.* 1998;38:473-484.

Marshall K, Henshall J, Banks RG, Van der Werf J. Finding major gene effects in Australian meat sheep – feasibility study for a Texel dataset, *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 1999;13:86–89.

Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JI, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, Folch J, Calvo JH. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. 2008. *Animal Genetics* 39:294-297.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005;129(4):473-480.

Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Laviña A, Sierra I. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Anim.Reprod.Sci.* 2009;110(1-2):139-146.

Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Laviña A, Sierra I. Una delección de 17 pares de bases en el gen BMP15 (ligado al cromosoma X) incrementa la prolificidad en la raza ovina Rasa Aragonesa. 2008. *Pequeños Rumiantes* 9, Num.2: 24-31.

Montgomery GW, Crawford AM, Penty JM, Doods KG, et al. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genetics* 1993;4: 410-414

Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 2001;121(6):843-852.

Moradband F.; Rahimi G.; Gholizadeh M. Association of Polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. *Asian Australas J Anim Sci.* 2011;24(9):1179-1183, doi: 10.5713/ajas.2011.10453

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L., Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen JM. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(9):5104-5109.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Bodin L, Thimonier J, Monget P, Lanneluc I, Monniaux D, Teyssier J, Elsen JM. Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. *Reproduction* 2002. Suppl. 61: 353-359.

Nespolo RF. Evolution by natural selection: more evidence than ever before. *Revista Chilena de Historia Natural* 2003; 699-716.

Notter DR. Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2008;43:122-128.

Notter DR, Cockett NE, Hadfield TS. Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *Journal of Animal Science*. 2003;81(4): 912-917.

Parsons YM, Fleet MR, Cooper DW. Isolation of the ovine agouti coding sequence. *Pigment Cell Res*. 1999;12: 394-397

Pelletier J, Bodin L, Hanocq E, Malpoux B, Teyssier J, Thimonier J and Chemineau P. Association Between Expression of Reproductive Seasonality and Alleles of the Gene for Mel1a Receptor in the Ewe. *Biology of Reproduction*. 2000;62:1096-1101

Petrie A. & Watson, P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Blackwell Science, 2000.

Piper LR, Bindon BM. Genetic segregation for fecundity in Booroola Merino sheep. *Proc. World Congr. Sheep and Beef Cattle Breeding*. Palmerston North, N.Z. 1982;Vol I, pp 395-400.

Ponz R.; Tejedor MT.; Monteagudo LV.; Arruga MV. y Barrao R. Análisis estadístico de la duración de la gestación como criterio para el cálculo de la fertilidad de la inseminación artificial en raza aragonesa. *Reproducción* • 2000 • XXV: Comunicación 11

Polley S, De S, Batabyal S, Kaushik R, Yadav P, Arora JS, Chattopadhyay S, Pan S, Brahma B, Datta TK, Goswami SL. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. *Small Ruminant Research* 2009;85(2-3):122-129.

Polley S, De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh PV, Batabyal S, Arora JS, Pan S, Samanta, AK, Datta TK, Goswami SL. Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Trop.Anim.Health Prod*. 2010;42(5):985-993.

Pollott GE. A suggested mode of inheritance for wool shedding in sheep. *J Anim Sci*. 2011; 89(8):2316-2325, doi: 10.2527/jas.2010-3713

Purvis IW, Franklin IR. Major genes and QTL influencing wool production and quality: a review. *Genetics Selection Evolution*. 2005;37: S97-S107.

Radomska MJ, Martyniuk E, Klewiec J, Knothe A. Inheritance of high prolificacy of the Olkuska sheep (preliminary results). *J Agric Sci Finland* 1988; 60:597–598.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000:pp 365-386

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York (USA)

San Primitivo F, Arranz JJ, Bayón Y, Gutiérrez B. QTL detectados en el ganado ovino *Ovis*, 2006;103: 29-46

Sierra I. Razas Aragonesas de Ganado. Departamento de Agricultura. Gobierno de Aragón. 2002: 26-36.

Sierra I. 1972. Study of the natural prolificacy and effect of mating season in Aragonese ewes. VII International Congress on Animal Reproduction and A.I. (Munich), 1972: 2061-2064.

Sierra I. Sistema práctico de mejora de los caracteres reproductivos y otros en la oveja: Índices de selección. IV Jornadas SEOC. Zaragoza, 1979:122-135.

Sierra I. Influencia del color en la prolificidad de la especie ovina: Posibilidad de un “major gen”. V Jornadas Internacionales sobre reproducción e Inseminación Artificial. Zaragoza. 1990 Actas III: 239-245.

Silva BD, Castro EA, Souza CJ, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, Azevedo HC, Silva TA, Vieira AM, Neves JP, Melo EO: A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim Genet*; 2011 Feb;42(1):89-92.

- Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat Res* 1999; 439:37-47
- Souza CJH, MacDougall C, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology* 2001; 169, R1-R6
- Teyssier J, Canepa S, Chemineau P, Malpoux B, Migaud M, Bodin L. Preliminary results on selection lines for spontaneous spring ovulatory activity in Merinos d'Arles sheep. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 19-23 août 2002, Com.08-14, 685-688.
- Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002 Jul;309(1):151-62. Epub 2002 May 18.
- Walkden-Brown SW, Van der Werf JHJ, Nimbkar C, Gupta VS. Use of the FecB (Booroola) gene in sheep-breeding programs. Proceedings of the Helen Newton Turner Memorial International Workshop held in Pune, Maharashtra, India, 10-12 November 2008
- Walling GA, Bishop SC, Pong-Wong R, Gittus G, Russel AJF, Rhind SM. Detection of a major gene for litter size in Thoka Cheviot sheep using Bayesian segregation analyses. *Animal Science.* 2002;75:339-347.
- Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol.Reprod.* 2001;64(4):1225-1235.
- Wu, R.; Ma, CX, Casella, G. Statistical genetics of quantitative traits: linkage, maps, and QTL. Springer. 2007

8. ANEXO: TRABAJOS REALIZADOS

Monteagudo, L. V., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A. & Sierra, I. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP 15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Ani. Repro. Sci.* 110: 139-146.

Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Laviña A, Sierra I. Una deleción de 17 pares de bases en el gen BMP15 (ligado al cromosoma X) incrementa la prolificidad en la raza ovina Rasa Aragonesa. 2008. *Pequeños Rumiantes* 9, Num.2: 24-31.

Laviña, A.; Macías, A. M.; Martín, E.; Arellano, P.; Murillo, S.; Ponz, R.; Monteagudo, L.V.; Tejedor, T. ; Sierra, I. y Vijil, E. 2009. Analisis de la distribución de partos de ovejas portadoras del alelo Fec X^r del gen BMP 15. *SEOC 2009 Barbastro*. pp. 408-412 (Premio mejor trabajo sección Genética)

Laviña, A, A. Macías, E. Cuartero, P Arellano, S. Murillo, L. Marcén, I. Garitano, E. Feliz de Vargas y E. Vijil. Desarrollo del programa de inseminación artificial ovina de ANGRA durante el año 2009. *SERGA 2010 Gijón*.

Laviña, A, A. Macías, E. Cuartero, P Arellano, S. Murillo, L. Marcén, I. Garitano, E. Feliz de Vargas y E. Vijil. Desarrollo de un programa de inseminación artificial ovina en la raza Rasa Aragonesa gestionado por ANGRA durante el año 2009. *II Congreso Nacional de Zootécnia. 2010 Lugo*.