

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LA CAPA EN LA RAZA DE OVEYA XALDA DE ASTURIAS

ACOXAX; Asociación de Criadores d'Oveya Xalda
Apdo. de Correos 2117 – 33080, Uviéu (Asturies)



INTRODUCCIÓN

Junto con aspectos subjetivos, como los culturales, la definición de una raza ganadera depende, especialmente, de características fenotípicas que permitan diferenciar el conjunto de sus individuos de los de otras poblaciones de la misma especie con las que comparta espacios ecológico-productivos comunes. La raza de Oveya Xalda es una raza autóctona del Principado de Asturias de gran importancia en la historia de las comunidades rurales de la región (Álvarez Sevilla, 1999) que destaca por poseer características raciales muy marcadas que la hacen única entre las razas autóctonas de la Península Ibérica (Álvarez Sevilla et al., 1982, 2003). Entre estas características destaca el patrón de color de la capa que presenta una clara segregación del color negro con diferentes matizaciones. Los criadores de animales de raza ovina Xalda seleccionan sus animales reproductores para conseguir ciertas características morfológicas en sus animales que se consideran asociadas a una mayor pureza racial (Goyache et al., 2003). Entre las características a obtener destaca la cada vez más frecuente capa negra.

Uno de los objetivos del esquema de cría y selección de ACOXA es conseguir que los animales inscritos en el Libro Genealógico de la raza Xalda presenten características morfológicas acordes con las que se desprenden de la documentación histórica tanto bibliográfica como fotográfica. En este sentido, existen notables referencias bibliográficas que permiten sostener que la variación de la capa que hoy se encuentra en los animales inscritos en el Libro Genealógico de la raza Xalda se corresponden con los que antiguamente podían observarse. Así, la cita más importante que se ha encontrado hasta la fecha relativa al color de la xalda, se localiza en la obra “**Arte General de Granjerías (1711-1714)**” cuyo autor es Fray Toribio de Santo Tomás y Pumarada que textualmente dice:

*“Primeramente, su color debe ser negro bien negro, porque es mejor la carne y de más peso, el animal hace más bulto, tiene más precio para venta y su lana es de mayor valor. Después, de este color passa el blanco bien blanco, porque aunque tienen la carne blanda y son algo fríos, dan buena lana para mantas y medias y telicas de teñir. Pero de color canoso, apardado, manchado y de **fueya seca de castañar**, nunca te enamores, que tienen ruin lana.”*



Las bases genéticas del color de la capa en la oveja no se conocen con precisión. El color de la capa en los mamíferos depende fundamentalmente de las proporciones de los pigmentos eumelanina (que produce colores entre negro y castaño) y feomelanina (que produce colores entre amarillento y rojizo). La producción de estos pigmentos está controlada por los loci Extension (E) y Agouti (A) (Searle 1968), que corresponden, respectivamente, a los genes *melanocortin-1 receptor* (MC1R) y *Agouti signalling peptide* (ASIP) (Bultman *et al.* 1992). Se conoce que la coloración negra dominante en la oveja se produce por una alelo del locus Extension (E^D) que porta las mutaciones 73Met→Lys y 121Asp→Asn en la secuencia codificante del gen MC1R (Våge *et al.* 1999, 2003). Sin embargo, no se ha podido determinar la causa del patrón de color

negro recesivo de la oveja. El color blanco se produce, en gran parte de los casos, por la acción de un alelo dominante del locus Agouti (A^{wt}), mientras que un alelo recesivo del mismo locus (A^a) resultaría en un patrón de color eumelánico o negro/castaño (Sponenberg 1997). Diversos autores han encontrado evidencias que indican que el gen ASIP es un buen candidato posicional para la coloración no dominante de pigmentación en la oveja (Beraldi *et al.* 2006; Parsons *et al.* 1999a). Sin embargo, ni el polimorfismo *Bam*HI encontrado por Parsons *et al.* (1999b) ni una delección de 5 pares de bases (Smit *et al.* 2002) identificados ambos en el exón 2 de la secuencia codificante del gen ASIP parece estar asociado a la segregación del patrón de color negro recesivo de la oveja.

El conocimiento de la variación que se ha producido en la frecuencia de aparición de la capa negra en los animales incluidos en el Libro Genealógico de la raza Xalda desde el inicio de su funcionamiento puede aportar información de gran interés sobre la evolución reciente de la raza. Asimismo, resulta necesario testar en los animales de la raza los conocimientos científicos más recientes sobre la determinación del color de la capa en la especie ovina.



MATERIAL Y MÉTODOS

Capas admitidas en el prototipo racial

La variación del color de la capa en el estándar racial admitido para la raza Xalda es la siguiente (Álvarez Sevilla *et al.*, 1982, 2003): el color puede ser negro, blanco, cárdeno (*cardín*) y manchado (*pezu*).

En los animales negros la lana negra nace muy oscura para aclararse en los extremos hasta tonos caoba cuando es muy larga. En realidad, los tipos *cardín* y *pezu* son variaciones del color negro, ya que la capa *cardina* aparece en animales negros con la edad en forma de mezcla de vellón blanco y negro. Los animales *pezos* sólo pueden apreciarse sobre animales negros. Entre ellos existen algunos tipos especialmente frecuentes que presentan manchas

blancas más o menos extensas en la cabeza (*coronistes* o *moñiralbes*), hocico (*gueifes*) y cuello (*coreyalbes*).

Datos y métodos estadísticos

Se han analizado 1448 registros incluidos en el Libro genealógico de la raza ovina Xalda de Asturias en los que se incluía el color de la capa del animal como Blanco o Negro. Se ha analizado la variación del porcentaje de animales según las siguientes variables: a) sexo del animal; b) año de nacimiento del animal; y c) calificación morfológica del animal. La calificación morfológica establecida por ACOXA evalúa la distancia del animal juzgado respecto del ideal racial para cada sexo. El animal se califica de 1 a 4 puntos de forma que el ajuste del animal al prototipo racial pueda ser considerado como “suficiente”, “bueno”, “muy bueno” o “excelente”.

Se han analizado las calificaciones morfológicas obtenidas por 1.798 individuos incluidos en el Libro Genealógico de la raza Xalda de 202 fueron machos y 1.596 hembras. En la Tabla 1 se detalla el número de animales que presentaron cada una de las calificaciones posibles. La calificación otorgada más frecuentemente fue la 2, que prácticamente alcanza a un 40% de los animales juzgados. La calificación “muy bueno” (3) se empezó a otorgar en el año 2002 tras la constatación de la mejora media de los animales incluidos en el Libro Genealógico. Las calificaciones analizadas se realizaron por un solo calificador.

Sobre este conjunto de datos se han computado tablas de contingencia y análisis estadísticos χ^2 utilizando siempre el paquete estadístico SAS/STAT (1999).



Análisis laboratoriales

A partir de sangre completa con EDTA, se ha extraído el ADN de 168 individuos de raza Xalda. Se diseñó un protocolo para la determinación simultánea de los genotipos de los genes MC1r y ASIP. Estos protocolos consisten básicamente en la amplificación simultánea y en el mismo tubo, mediante la técnica de la PCR, de las regiones de los 2 genes diferentes que contienen la mutación. Posteriormente se digiere el producto resultante con una el enzima de restricción NlaIII. Con el resultado de estas dos determinaciones obtenemos el genotipo de cada animal para los genes Mc1r y ASIP.

Con el fin de tener muestras control para la presencia de todos los alelos posibles, se obtuvo ADN de la misma manera a partir de 10 individuos de las

siguientes razas: Merino Negro (2), Karakul (2), Castellana Negra (2) y Churra (2) y de individuos de muflón (2).

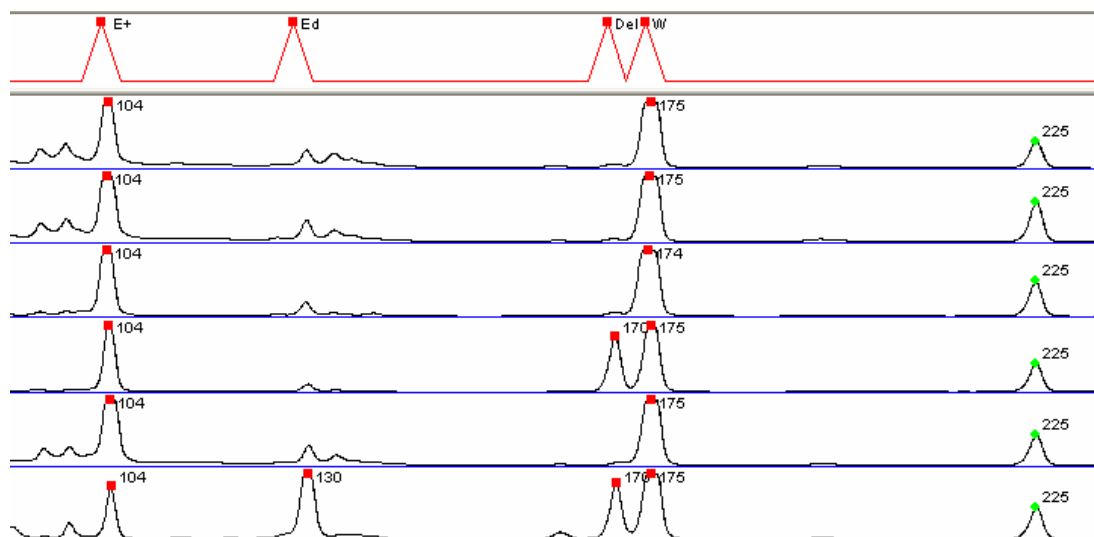
En la tabla 1, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos (oligos) usados en cada protocolo de PCR, su marcado fluorescente si lleva, y el tamaño esperado para cada alelo de cada uno de los genes.

Usando este protocolo descrito se han genotipado los 168 individuos de la raza Xalda y los 10 animales de poblaciones foráneas, utilizados como control.

Tabla 1. Secuencias de los oligos de cada gen, y tamaño de los alelos para el diagnóstico de las variantes de los genes Mc1r y ASIP.

Gen	Oligo	Secuencia 5'-3'	Alelo	Tamaño pb
Mc1r	forward	Cy5-CCTGGACGGGCTCTTTCTCAGCCTG	E+	104 pb
	reverse	CCAGCACGTTGCTGACGCTCACCAG	E ^D	130 pb
	forward	Cy5-GCACCTGAGGAAAAGCCCAGAGATG	Wt	175 pb
ASIP	reverse	CTTGATTCTCCAGAATTGTTCTG	Del	170 pb

Figura 1. Imagen obtenida del secuenciador automático Alf-ExpressII (Amersham Biosciences). La línea superior muestra la plantilla con los alelos posibles, en la izquierda para el gen Mc1r (E+: salvaje y Ed: Negro dominante) y a la derecha para el gen ASIP (Del: delección 5pb, y salvaje Wt). Más a la derecha representado con puntos verdes se ven el marcador estándar interno de tamaño.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Libro Genealógico de la raza ovina Xalda de Asturias tiene registrado el color de la capa de 1482 animales, de los que 815 (55%) son blancos. La distribución del color está desequilibrada por sexos ya que si bien en las 1293 hembras registradas los animales de color negro son el 41% entre los 189 machos analizados el 73,5% son de esa capa. Esto se explica por la importancia que los criadores asociados en ACOXA dan al color negro de la capa como uno de las características asociadas a una mayor pureza racial, lo que hace que los carneros sean preferentemente de este color para promover el nacimiento de crías con capa negra.

En la Figura 2 puede apreciarse el porcentaje de animales registrados que presentan capa blanca o negra, según el año de nacimiento del animal. Si bien hasta el año 1999 los animales nacidos de capa blanca son mayoritarios (oscilando entre el 56 y el 93%, según años) a partir del año 2000 los animales de capa negra son mayoritarios (entre el 53y el 60%, según años). Esto expresa el interés de los ganaderos en obtener animales de capa negra y señala el comportamiento recesivo del carácter en la oveja Xalda, ya que los ganaderos no han llegado a fijar el carácter.

Por sexos, el mayor desequilibrio se encuentra en los machos (Figura 3) ya que a partir del año 1998 el 80% o más de los carneros inscritos en el Libro Genealógico de la oveja Xalda son de capa negra.

En todo caso, la asociación del color de la capa al aprecio de los ganaderos por el fenotipo del animal queda claramente expresado en la Figura 4. Los animales de calificación morfológica “suficiente” presentan mayoritariamente capa blanca (87%) mientras que los animales de calificación racial “excelente” presentan mayoritariamente capa negra (76%). Este desequilibrio es estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) para la prueba del χ^2 . Este hecho

es una prueba más de que los ganaderos asociados en ACOXA consideran que la mejora en las características de los animales está ligado en gran medida al color de la capa.

Figura 2: Porcentajes de animales de capa blanca (barras blancas) o negra (barras negras) por año del nacimiento del animal en la raza Xalda.

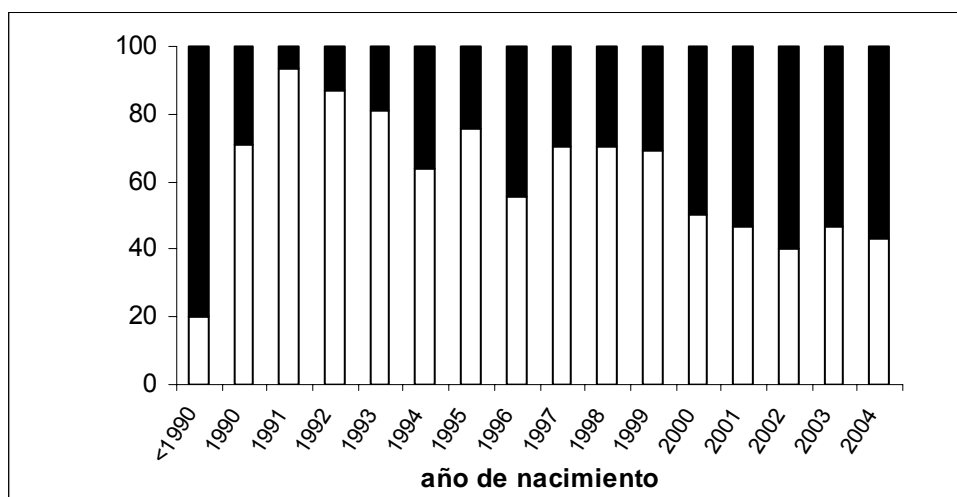


Figura 3: Porcentajes de machos de capa blanca (barras blancas) o negra (barras negras) inscritos en el Libro Genealógico de la raza ovina Xalda de Asturias por año del nacimiento del animal.

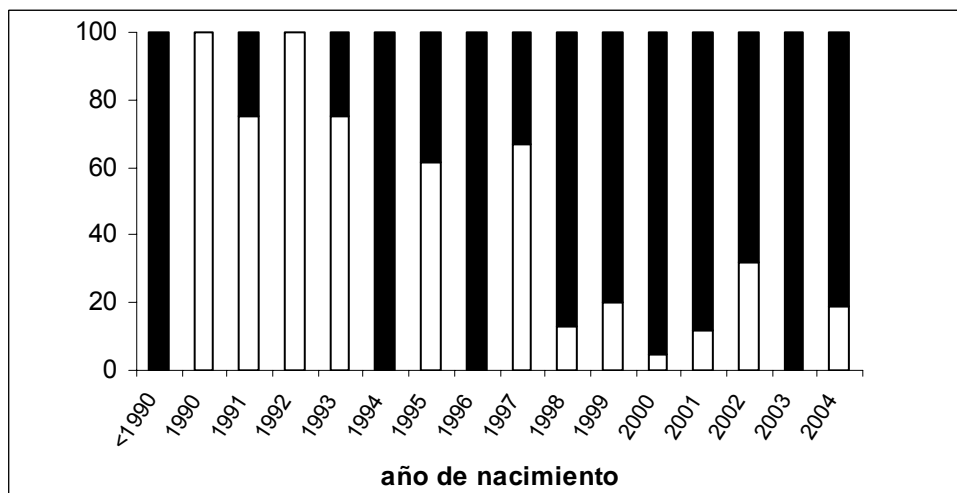
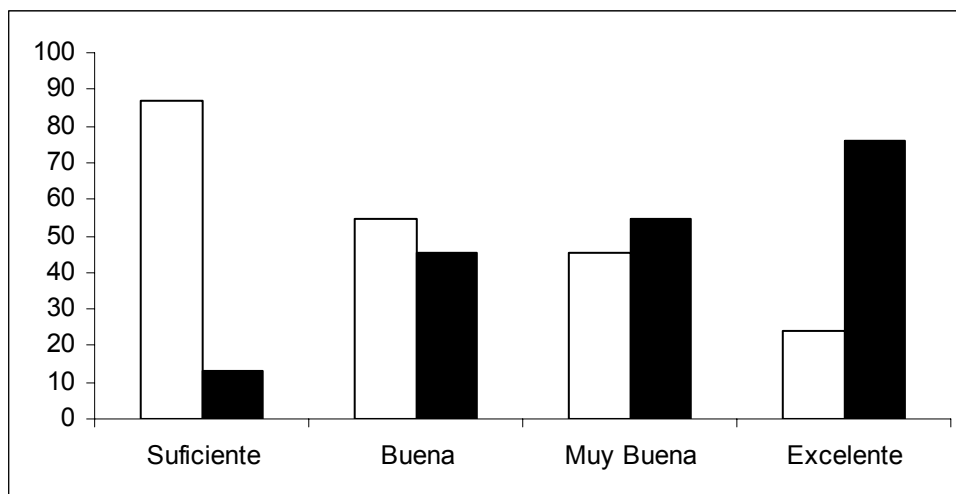


Figura 4: Porcentajes de animales de capa blanca (barras blancas) o negra (barras negras) inscritos en el Libro Genealógico de la raza ovina Xalda de Asturias por calificación racial del animal.

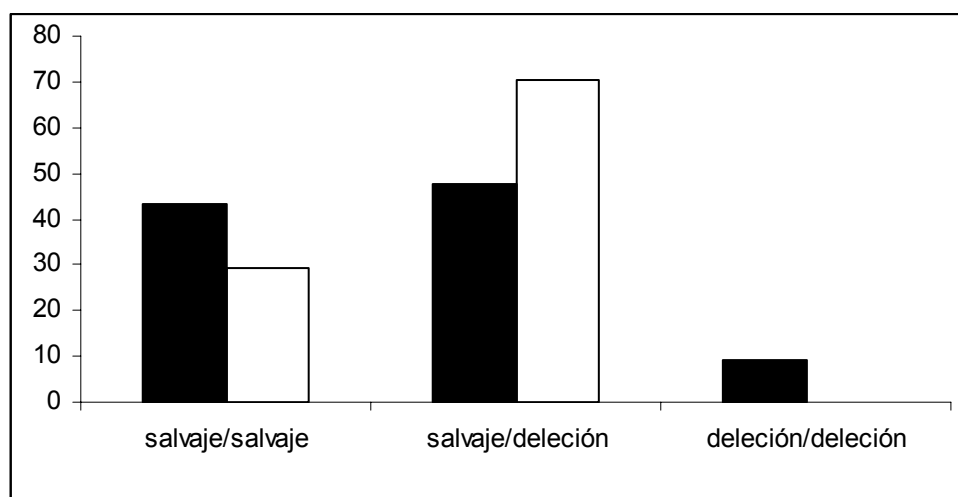


La comprobación de la presencia, en la raza Xalda, de las causas moleculares que se postulan en la bibliografía científica como candidatos a la producción del fenotipo de color negro en la especie ovina se ha realizado testando en 168 animales inscritos en el Libro Genealógico de ACOXA el diagnóstico de las mutaciones descritas por Våge et al. (1999, 2003) en la secuencia codificante del gen MC1R, que se consideran causantes del fenotipo negro dominante, y de la delección de 5 pares de bases (Smit *et al.* 2002) presente en el exón 2 de la secuencia codificante del gen ASIP que podría estar asociado al patrón de color negro recesivo de la oveja.

No se encontraron alelos dominantes en el gen MC1R de los animales de raza Xalda analizados. Este hecho excluye que el patrón de color encontrado en la raza Xalda sea el mismo que en razas foráneas como la Karakul (Våge et al., 2003) y corrobora el hecho de que nos encontramos ante un patrón de herencia recesivo que ha impedido que se haya podido fijar el color negro en la capa de los animales de raza Xalda. Los resultados obtenidos en el diagnóstico

de la delección descrita en el gen ASIP se muestran en la Figura 5. Todos los animales que presentaron un genotipo homocigoto para la delección fueron de capa negra. Esto caracterizaría una situación similar a la existente en la especie equina (Rieder *et al.*, 2001) en que una delección de 11 pares de bases en el exón 2 (ADEx2) del gen ASIP es responsable del color negro recesivo en caballo. Sin embargo, un 48% de los animales de capa negra son heterocigotos para la delección y el alelo salvaje, que sería dominante y debería producir fenotipo blanco. Asimismo, un 43% de los animales homocigotos para el alelo salvaje son de capa negra. Esto descartaría a la delección de 5 pares de bases del gen ASIP ovino como la única causa del patrón de color negro recesivo en la oveja de raza Xalda.

Figura 5: Porcentajes de animales de capa blanca (barras blancas) o negra (barras negras) inscritos en el Libro Genealógico de la raza ovina Xalda de Asturias que presentan genotipos homocigotos o heterocigotos para la delección de 5 pares de bases del exón 2 de la secuencia codificante del gen ASIP ovino.



Se pueden dar varias explicaciones a esta situación paradójica. Smit *et al.* (2002) han sugerido la posibilidad de que la delección no se encuentre en el gen ASIP sino en un gen “Agouti-like” y han propuesto el estudio de unos modelos de segregación menos simple que implicaría a dos loci y a dos alelos por loci. Otra explicación se encuentra en el hecho, bien descrito en la bibliografía

científica (Sponenberg, 1997), de que puedan coincidir diversos patrones de segregación alélica para un mismo fenotipo del color en la oveja. En concreto, el color blanco puede darse no solo por la acción de un alelo dominante del gen ASIP sino también por la acción de alelos recesivos de algunos patrones de manchado que, en homocigosis, podrían producir ausencia de color (fenotipo blanco) en todo el cuerpo del animal. Otra posible causa de color blanco sería una dilución extrema del color negro provocada por la acción de genes no identificados.

Como resumen de los resultados obtenidos en el presente análisis se puede concluir que el color negro en la raza ovina Xalda se debe a un patrón de herencia recesivo. Esto explica la producción de animales de capa blanca en la raza a pesar de la intensa selección por el color de la capa realizada por los ganaderos de ACOXA. En este sentido, el seguimiento de la segregación del color de la capa parece necesario para poder monitorizar la intensa selección por caracteres de tipo (Goyache *et al.*, 2003) realizada en la raza y que, inevitablemente, afecta a la variabilidad genética existente en la misma. La causa molecular del patrón de color negro recesivo en la oveja sigue siendo desconocida. Será necesario continuar con trabajos tendentes al mayor conocimiento de la base genética del color de la capa como herramienta de apoyo a los criadores asociados en ACOXA. La determinación de las causas del color negro recesivo en la oveja permitiría planificar apareamientos de forma que se consiguiera una optimización de los procesos de selección con conservación de la variabilidad genética de la raza.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera podido desarrollarse sin el total apoyo de los socios de ACOXA. Gracias al Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA por su apoyo en la realización de este análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez Sevilla, J.A., García Peláez, A., Cortés Pérez, J., 1982. Descripción de la oveja de raza Asturiana. *Biol Cien Nat I.D.E.A.*, 30: 147-157.

Álvarez Sevilla J.A., 1999. Protohistoria y ganadería. En *El Ganado vacuno del Tronco Castaño*, pp.11-18, Imprenta Narcea S.L., Granda-Siero (Asturias).

Álvarez Sevilla, A., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Royo, L.J., Álvarez, I., Gómez, E., Goyache, F., 2004. Conservación de la oveja Xalda de Asturias. *Animal Genetic Resources Information*, 34: 41-49.

Beraldi D., McRae A. F., Gratten J., Slate J., Visscher P. M., Pemberton J. M., 2006. Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of Soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics* 173: 1521–1537.

Goyache, F., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., Gómez, E., Álvarez, I. Díez, J., Royo, L.J., 2003. Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120: 95-103.

Parsons Y. M., Fleet M. R. Cooper D. W., 1999a. Isolation of the Ovine Agouti Coding Sequence. *Pigment Cell Research* 12: 394-397.

Parsons, Y.M., Fleet M.R. Cooper D.W., 1999b. The Agouti gene: a positional candidate for recessive self-colour pigmentation in Australian Merino Sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 1099-1103.

Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B. Guérin G., 2001. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*) and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* 12: 450-455.

SAS/STAT™, 1999. User's Guide. Release 8.2. SAS Institute Inc, Cary NC.

Smit M. A., Shay T. L., Beever J. E., Notter D. R. Cockett N. E., 2002. Identification of an agouti -like locus in sheep. *Animal Genetics* 33, 383-385.

Sponenberg T. A., 1997- Genetics of colour and hair texture. In The genetics of sheep, (ed. by L. Fries A. Ruvinsky), pp. 51-86. CAB International, University Press, Cambridge, UK.

Våge D. I., Klungland H., Lu D., Cone R. D., 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat colour in sheep. *Mammalian Genome* 10, 39-43.

Våge D. I., Fleet M. R., Ponz R., Olsen R. T., Monteagudo L. V., Tejedor M. T., Arruga M. V., Gagliardi R., Postiglioni A., Natrass G. S. Klungland H., 2003. Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. *Pigment Cell Research* 16: 693-697.

Voisey J., Gomez-Cabrera M. C., Smit D. J., Leonard J. H., Sturm R. A. and van Daal A., 2006. A polymorphism in the agouti signalling protein (*ASIP*) is associated with decreased levels of mRNA. *Pigment Cell Research* 19: 226-231.