

Azor, P. J.¹; Molina, A.¹; Barajas, F.²; Arranz, J. J.³; Valera, M.⁴; Rodero, A.¹; Miguelez, J. J.²

1. Dpto. de Genética. Universidad de Córdoba. E-mail:ge2azorp@uco.es

2. Asociación Nacional de Criadores de Ganado Merino. Madrid
E-mail: florenciobv@razamerina.com

3 Dpto. de Producción Animal I. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

4 Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla.



Asociación Nacional de Criadores
de Ganado Merino

Estimación del nivel de diferenciación genética de la raza merina mediante ADN Microsatélite

INTRODUCCIÓN

El tronco Merino es el más importante del mundo en función del número de animales y razas que comprende. El papel jugado por España en la difusión y desarrollo de este tronco en el mundo hacen que en nuestro país, cuna del Merino, esta raza tenga un significado especial tanto por razones históricas y económicas como por representar la reserva genética más antigua.

Según Esteban y tejon (1980) la raza Merina tiene su origen en el *Ovis aries vignei* pero la teoría más reciente asigna como representante ancestral del tronco Merino al *Ovis aries turdetanus* (Esteban, 2004) y de ella se han originado las principales poblaciones de ovinos que existen en la actualidad en los cinco continentes. Tuvo su origen geográfico en el tercio meridional de la península Ibérica en época anterior a la era cristiana, atribuyéndose a los pueblos tartesos y turdetanos (1000 a 200 a. C.) el inicio de la fase selectiva o de asentamiento de la raza en las cuencas del Guadiana y del Guadalquivir. Originalmente se seleccionó para la producción lanera obteniéndose las mejores lanas del mundo aunque actualmente debido a la caída de los precios de la lana de la década de los 70 se está seleccionando para la producción de carne. También existen ciertos rebaños en los que se aprovecha la leche para la elaboración de quesos artesanales de elevada calidad. Posteriormente se atribuye a los romanos la realización de cruzamientos con moruecos foráneos, con el objetivo de blanquear los vellones, pues, en origen, la raza Merina era pigmentada, existiendo constancia de la existencia de rebaños de Merino Negro primitivo (Fuentes, 2000).

Hemos analizado la raza Merina, precursor de los ovinos precoces como el *Fleischschaf* (Merino Alemán) o el Merino Precoz que también se han analizado, la raza

francesa Ile de France, y tres razas del sur de España que se encuentran catalogadas en peligro de extinción: Churra Lebrijana, Montesina y Merino de Grazaalema.

El objetivo de este trabajo es determinar el nivel de variabilidad genética que existe principalmente en la raza Merina, además de analizar su estructura poblacional y determinar las relaciones genéticas existentes con otras razas utilizando marcadores de ADN

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

El número de animales que se han analizado ha sido 255 de la raza Merino Autóctono Español (ME), 22 Merino Español Negro (MN), 15 Fleischschaf (F) 15 Churra Lebrijana (CL), 19 Merino de Grazaalema (MG), 25 Merino Precoz (MP), 25 Ile de France (IF) y 30 Montesina (M) (tabla 1) Las muestras de sangre fueron tomadas a animales de diferentes sexos en varios rebaños de España. El DNA se ha extraído de sangre utilizando el método

Tabla 1. Otras razas analizadas

Raza	Nº de Animales
MERINO AUTÓCTONO ESPAÑOL	255
CHURRA LEBRIJANA	15
FLEISCHSCHAF	15
ILE DE FRANCE	25
MERINO DE GRAZALEMA	19
MERINO PRECOZ	25
MONTESINA	30

"Salting Out" (Miller et al., 1988) o utilizando CHELEX 100 resin según describió Walsh et al (1991) añadiéndole proteinasa K.

Marcadores de ADN

Hemos utilizado 33 marcadores microsatélites de ADN: BM2504, BM6526, BM8125, BMS1948, BMS2626, BMS356, BMS522, BMS975, CSRD2111, CSRD263, CSSM008, CSSM015, CSSM31, CSSM41, CSSM43, FAS, HMH1R, ILSTS005, ILSTS011, INRA026, LSCV29, MCM1, MCM26, MCM527, MCM53, OARCP49, OARCP6, RBP3, RM006, SPS115, TGLA429, TGLA53, que hemos seleccionado en base a las recomendaciones de la FAO (*Grupo de Trabajo* de la FAO, 1993). Esta ha realizado una selección de microsatélites (Crawford, 2000) recomendados para la caracterización del ovino en base a estudios anteriores en los que han demostrado su fiabilidad, un número de alelos elevados, su adecuación para ser analizados en un secuenciador automático o para la amplificación en múltiplex, una distancia entre marcadores elevada (estar en diferentes cromosomas o en todo caso presentar una distancia entre marcadores superior a los 50 cM para evitar ineficiencia por ligamiento) y su distribución a lo largo de todo el genoma. A esto hemos añadido otros marcadores que aparecen con frecuencia publicados para la caracterización de razas ovinas. La amplificación del ADN la hemos llevado a cabo en PCR en un *Geneamp 9600* (Pelkin Elmer, Foster City, CA). Los productos de la PCR se analizaron en el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Los estadísticos-F (Wright, 1965, 1978) , F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} (basados en un infinito modelo de mutación (IAM)) fueron estimados en la forma de F , θ y f , estimadores respectivos de esos parámetros propuestos por Weir and Cockerham (1984). De la misma forma hemos calculado el *Coefficiente de Diferenciación Genética* (G_{st}) (Nei, 1973, 1977). Este parámetro fue propuesto por Nei para analizar la subdivisión de poblaciones. Para su cálculo no es necesario conocer las frecuencias genotípicas ya que se utilizan solamente las frecuencias alélicas en términos de Heterocigosidades esperadas dentro y entre poblaciones, es decir, no se tiene en cuenta la distribución de frecuencias genotípicas dentro de una población sino la variación genómica intra e intra poblacional (Nei, 1987). Tiene la ventaja de que no está influenciado por el número de alelos por locus, ni por el modelo de evolución (diseñado teniendo en cuenta la mutación, selección y migración).

Para el estudio de asociación entre las diferentes subpoblaciones analizadas y la distribución de frecuencias de los diferentes marcadores utilizados se ha realizado un análisis factorial de correspondencias (Benzécri, 1973; Lebart et al., 1977; Greenacre, 1984; Excofier y Pagès, 1990).

En lo referente a la estimación de las distancias genéticas, en la actualidad existe un gran abanico de ellas y no existe un convenio general sobre cual de las distancias es la más apropiada para el análisis de poblaciones. No obstante, las correlaciones entre varias medidas son, generalmente, bastante altas (Nei et al., 1983), particularmente cuando se aplican a poblaciones locales como es el caso de poblaciones ganaderas. En nuestro caso, la estimación de las distancias genéticas entre las posibles subpoblaciones de esta raza, mediante el análisis de las frecuencias alélicas de los microsatélites se ha realizado mediante la distancia de *Reynolds*, basada en el *modelo de deriva pura*, por su utilidad en estudios de divergencia a muy corto plazo y en diferenciación de subpoblaciones.

En cuanto al cladograma que representa gráficamente estas distancias hemos utilizado el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), valorándose la robustez del dendrograma mediante un Bootstrapping basado en el remuestreo de las frecuencias en los loci (Weir, 1990), utilizando para ello 1000 permutaciones con sustitución de los individuos (Felsenstein, 1985).

Hemos abordado desde diferentes perspectivas la asignación de determinados individuos a las posibles poblaciones a la que pueden pertenecer (Rannala y Mountain 1997; Waser y Strobeck, 1998, Davies et al. 1999). El método utilizado consiste en determinar la probabilidad (máxima verosimilitud) de cada genotipo individual multilocus en cada población, asumiendo que el individuo viene de esa población. Para calcular la probabilidad de máxima verosimilitud, hemos usado las frecuencias alélicas estimadas en cada población de la constitución global. Hemos asumido que todos los loci son independientes dado que la verosimilitud global individual es obtenida como el producto de la verosimilitud en cada locus. El método que hemos empleado fue descrito por Paetkau et al. (1995, 1997) y Waser y Strobeck (1998).

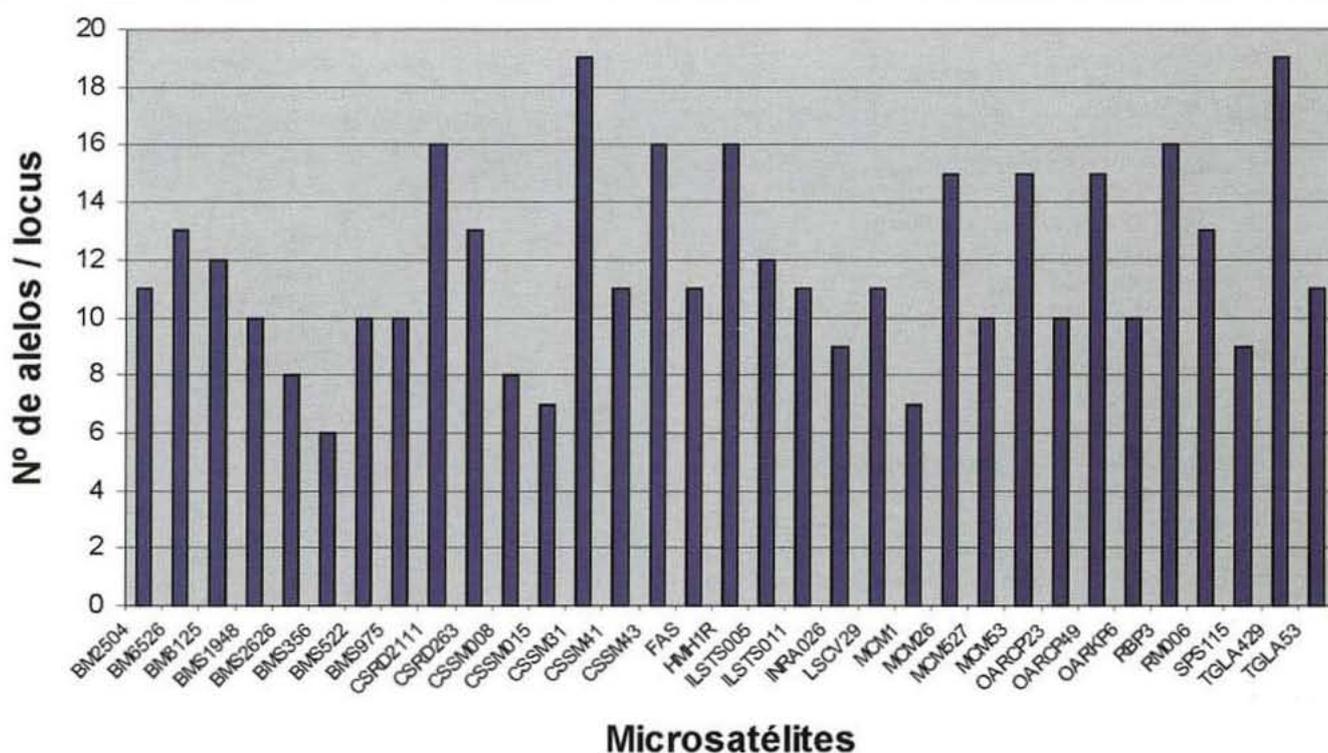
RESULTADOS

Variabilidad genética

Se han encontrado 390 alelos (figura 1), de los cuales 356 se han detectado en la raza Merino Español, el resto de alelos son exclusivos de las otras razas. En esta raza el número de alelos por marcador ha oscilado entre 6 que han presentado los marcadores BMS356, CSSM015 y MCM1 y 18 que ha manifestado el marcador CSSM031. Se han dado varios casos en los que todos los alelos que ha presentado un marcador se han encontrado en la raza Merino autóctono.

Se ha calculado el número de alelos encontrados en cada una de las razas estudiadas y los valores para cada una de ellas de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) (tabla 2). La raza Merino Autóctono ha sido la que ha presentado un mayor número medio de alelos (10,63) seguido de las razas Montesina (7,46) y Merino de Grazalema (6,62). Las razas Churra Lebrijana y Fleishchaf han sido las que han presentado un menor número de alelos, 4,75 y 5,03 respectivamente. Este menor número

Figura 1. Número de alelos encontrados en cada marcador amplificado



Microsatélites

medio de alelos encontrado en estas razas es debido posiblemente al tipo de cría cerrada de los rebaños de donde se han tomado las muestras de estas razas. No obstante el número medio de alelos en las razas presenta un rango de oscilación muy bajo, entre 4,75 y 7,46, es decir un rango de 2,71 alelos, excluyendo al Merino español debido al alto número de ejemplares que se han genotipado.

Tabla 2. Número de animales analizados (N), número medio de alelos por locus (NMA), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) para cada una de las razas estudiadas

Raza	N	NMA	Ho	He
CL	15	4.75	0,5862	0,5804
F	15	5,03	0,5661	0,5829
IF	25	5.63	0,5599	0,6120
ME	255	10.63	0,6967	0,7462
MG	19	6.62	0,6725	0,6873
MN	22	5.64	0,6378	0,6147
M	30	7.46	0,6527	0,6945
MP	25	5.75	0,5802	0,6432

Variabilidad genética entre y dentro de las razas: Estadísticos-F de Wright

El estado de la población se puede expresar en términos de tamaño efectivo que a su vez determina la tasa de consanguinidad y la intensidad de fijación que ha tenido lugar. Para ello se han definido los *parámetros F de Wright* (1965) (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}). Posteriormente estos indicadores han sido modificados por diversos autores. La más utilizada es la modificación de Weir y Cockerham (1984).

Los valores F_{IS} indican el defecto o exceso de heterocigotos en cada una de las subpoblaciones. En el caso del análisis para todas las razas en conjunto este valor ha sido de 0,066. Cuando esta cifra se aproxima a cero o incluso inferior, es indicativo de una población no consanguínea y cuando se aproxima a 1 estaríamos ante una población consanguínea. Los valores de F_{IS} superiores a 0,10 están indicando una baja resolución en estudios de diferenciación genética. En nuestro caso solamente se ha superado esta cifra cuando se ha realizado el análisis por razas independientemente en el Ile de France y el Merino precoz (tabla 4).

El parámetro F_{IT} indica al igual que el F_{IS} , el exceso o defecto de heterocigotos pero en este caso en la población global. Es el mejor indicador del grado de consanguinidad existente en las poblaciones. Al ser calculado este parámetro en el conjunto de razas estudiadas (tabla 3) el valor que se obtuvo fue del 14,3%. Este valor se corresponde con el del parámetro Relat (14,4%) que es la estimación del parentesco de la población según Queller y Goodnight (1989).

Tabla 3. Estadísticos F de Wright en toda la población de animales estudiados (todas las razas)

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	Relat
	0,143±0,021	0,082±0,010	0,066±0,018	0,144±0,015
Intervalo de confianza (95%)	0,102-0,183	0,065-0,102	0,030-0,101	0,117-0,175

El coeficiente de diferenciación genética o F_{ST} que se ha obtenido es este análisis de todas las razas ha sido de 0.082 lo que indica que el 8,2% de la variabilidad genética existente es debida a diferencias entre las razas, el resto es debido a diferencias individuales. El valor del parámetro F_{ST} para todas las razas ha sido de 0.1224.

En la tabla 4 se han estimado los valores del parámetro F_{IS} usando todos los individuos genotipados para todos los loci mediante el procedimiento Bootstraps en cada una de las razas que se han genotipado para este estudio. Los valores han oscilado entre -0,01489 del Merino Negro y 0,13214 de la raza Merino Precoz. Esta última raza junto con el Ile de France son las razas con unos mayores valores de este parámetro lo que demuestra su elevada endogamia en los rebaños en los que se procedió a la toma de muestras.

Tabla 4. Valores FIS de todas las razas ovinas analizadas

	F_{IS}
CHURRA LEBRIJANA	0,03156 (-0,06442 - 0,04088)
FLEISCHSCHAF	0,08005 (-0,03284 - 0,08005)
ILE DE FRANCE	0,11629 (0,02818 - 0,16094)
MERINO AUTÓCTONO	0,06879 (0,05806 - 0,07021)
MERINO DE GRAZALEMA	0,05099 (-0,03534 - 0,06400)
MERINO NEGRO	-0,01489 (-0,07535 - 0,00508)
MONTESINA	0,08204 (0,01985 - 0,10152)
MERINO PRECOZ	0,13214 (0,00075 - 0,15191)

Al realizar el análisis de todas las razas exceptuando el Merino autóctono y el Merino Negro los valores que se han obtenido se muestran en la tabla 5. El valor del parámetro F_{IS} ha sido de 0,082, superior al obtenido en la tabla anterior, lo que demuestra que al excluir del análisis la raza Merino Español y Merino Negro la variabilidad genética dentro de las poblaciones que quedan, se ha visto reducida. Esto muestra el alto grado de variabilidad exist

tente en la raza Merina. El coeficiente de consanguinidad (F_{IT}) en esta población de razas, asciende de la misma forma que lo hace el F_{IS} , desde el 14,3 hasta el 19,5% lo que indica el alto grado de homocigosis de estas razas destacando el Ile de France y el Merino Precoz. En este caso existe un mayor grado de diferenciación racial ya que el 12,3% de la variabilidad genética total existe es debida a diferencias entre estas razas. El valor de Relat muestra al igual que el F_{IT} el parentesco poblacional y sus valores son muy similares (0,206).

Análisis Factorial de Correspondencias

Es un tipo de análisis canónico particularmente adaptado para describir las asociaciones entre dos variables cualitativas (análisis de una tabla de contingencia). Los individuos analizados se ven como una nube de puntos dentro de un hiperespacio. Las direcciones que son definidas por los vectores propios de la matriz determinan una serie de ejes factoriales. En este análisis hemos representado gráficamente la agrupación en el espacio de los individuos de las razas en los dos primeros ejes principales. Se han representado gráficamente la posición de cada individuo en el espacio bidimensional canónico.

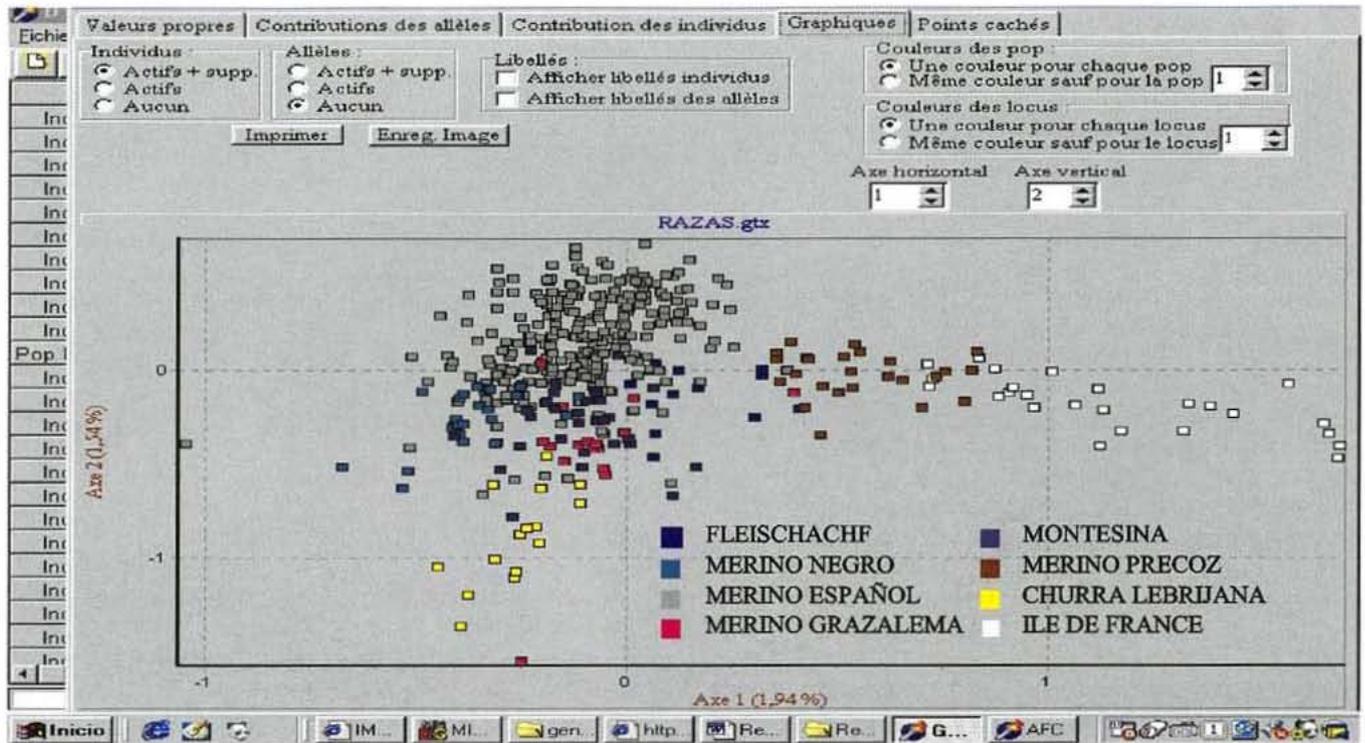
Este análisis complementa a los anteriores como los Estadísticos F de Wright de los cuales se han sacado las mismas conclusiones ya que ambos junto con el estudio de las distancias genéticas que se verán posteriormente muestran las mismas conclusiones.

En la figura 2 se muestra la distribución de los animales pertenecientes a todas las razas que hemos estudiado. En ella se observan la posición que adoptan los individuos pertenecientes a las diferentes razas. Las razas Ile de France, Merino Precoz o Churra Lebrijana se muestran bastante alejadas de la raza Merina. Sin embargo la raza Merino de Grazaalema o Merino Negro se encuentran próximas a ella. Debido a la proximidad genética de estas razas con la raza Merina, hemos realizado el análisis excluyéndola para determinar el nivel de diferenciación del resto (figura 3). Como se puede apreciar en la figura 3 todas las razas están bien diferenciadas, con mayor o menor proximidad entre ellas dependiendo de las razas de las que se trate.

Tabla 5. Estadísticos F de Wright el la población de razas de ovino excluyendo el Merino Español

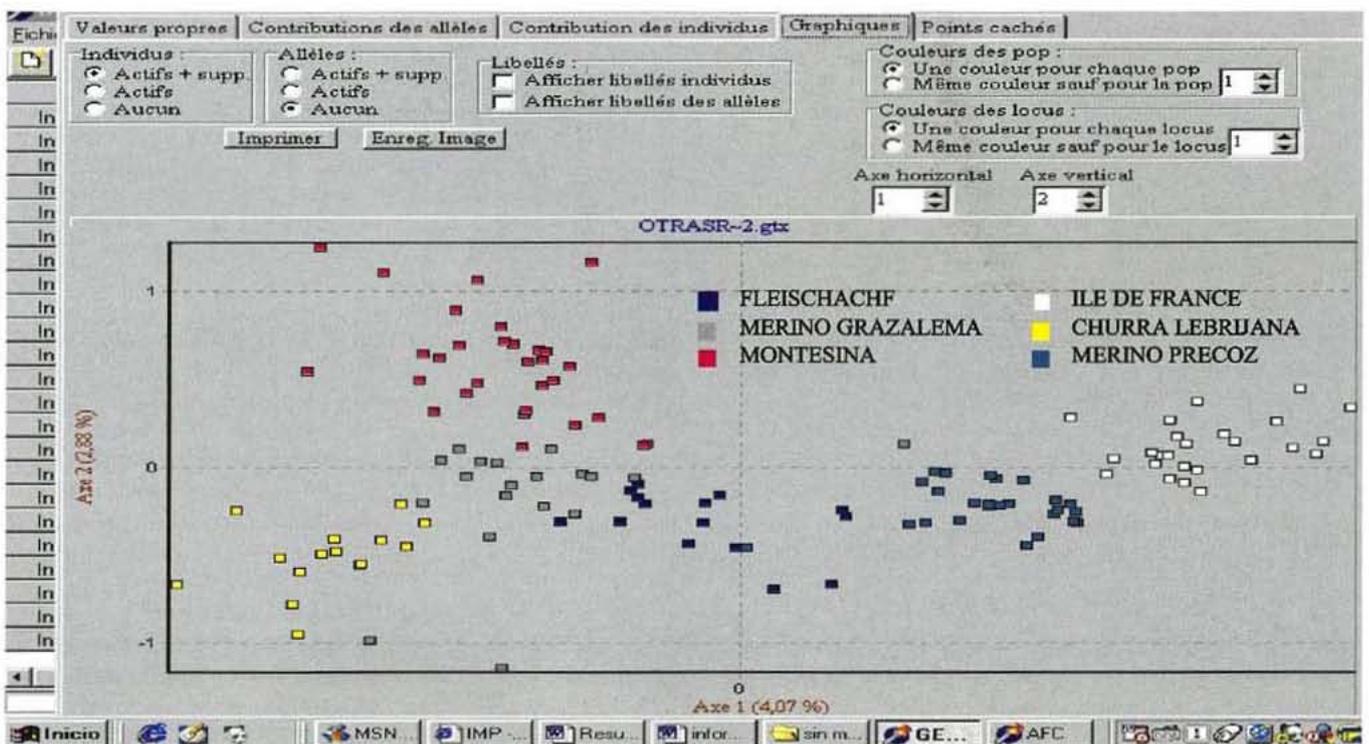
	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	Relat
Resto de razas Ovino Carne	0,195±0,028	0,123±0,014	0,082±0,024	0,206±0,021
Intervalo de confianza (95%)	0,143-0,251	0,097-0,153	0,036-0,131	0,167-0,248

Figura 2. Representación espacial de los individuos de todas las razas estudiadas según el análisis factorial de correspondencias



CL: amarillo; IF: blanco; MN: verde; MG: rosa, FL: azul; MO: añil; MP: rojo; ME: gris.

Figura 3. Representación espacial de los individuos de todas las razas estudiadas según el análisis factorial de correspondencias, excluyendo al Merino Autóctono



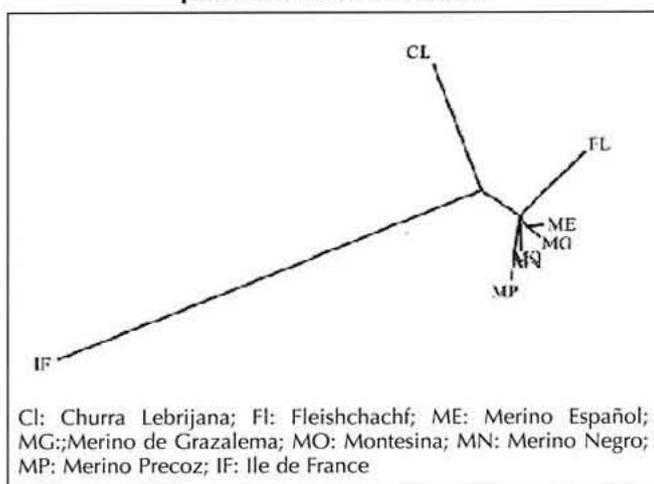
CL: amarillo; IF: blanco; MP: verde; MG: Gris, FL: azul; MO: rosa.

Distancias genéticas entre las razas

Hemos realizado la estimación de la *Distancia Genética de Reynolds*, y su posterior representación mediante un *Cladograma* entre las 7 razas analizadas (figura 4)

El cladograma que representa la distancia entre las razas estudiadas se observa que las razas Ile de France y Churra Lebrijana son las razas más distantes. Desde el mismo nodo del árbol nacen todos los ovinos del tronco merino y la Montesina, estando la raza Fleischschaf un poco alejada de ellas. Todos estas razas aunque nacen del mismo nodo se muestra un acercamiento un poco mayor entre la raza Merino Español y la raza Merino de Grazelema.

Figura 4. Distancia genética de Reynolds y cladograma para las 7 razas analizadas



Asignación de genotipos individuales a las distintas poblaciones estudiadas

Cuando analizamos el poder de asignar correctamente los individuos a las distintas razas, es decir la probabilidad de asignar correctamente un individuo a la raza a la que pertenece mediante el análisis de su ADN, (tabla 6) se obtienen unos resultados muy satisfactorios. En el 50% de las razas el poder de asignación es del 100% y en el resto de razas está por encima del 83,33%. La probabilidad media de asignación de los animales a las distintas razas ha sido del 92%.

CONCLUSIONES

La raza Merina presenta en la actualidad un alto nivel de variabilidad genética puesto de manifiesto por el alto número de alelos que se han encontrado y por el elevado valor de la heterocigosidad.

De todas las razas analizadas en este trabajo se muestran totalmente diferenciadas las razas Ile de France, la Churra Lebrijana y en menor medida las raza Fleischschaf y Merino Precoz. El resto de razas, Merino Español, Merino

Tabla 6. Probabilidad de asignación de los individuos a las distintas razas

Razas	Nº animales totales	Nº animales correctamente asignados	% de asignación correcta
CL	14	14	1
FL	13	12	0,92
IF	23	23	1
ME	230	208	0,90
MG	18	15	0,83
MN	25	25	1
MO	29	25	0,86
MP	23	23	1
TOTAL	375	345	0,92

de Grazelema y Montesina presentan una menor diferenciación debido a la existencia de intercambio genético en la historia más o menos reciente de estas razas.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benzécri, J.P. 1973. L'Analyse des Données: T. 2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- Crawford, A., 2000. Medida de la Diversidad de los Animales Domésticos (MoDAD): Marcadores Microsatélites Ovinos Recomendados. Segundo Documento de Líneas Directrices para la Elaboración de Planes Nacionales de Gestión de los Recursos Genéticos de Animales de Granja. FAO
- Davies, N., F. X. Villablanca, and Roderick, G. K., 1999. Determining the source of newly founded populations: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. Trends Ecol. Evol. 14:17-21.
- Escofier B., Pagès J, 1990. Analyses factorielles simples et multiples. Paris: Dunod.
- Esteban, C. 2004. Razas Ganaderas Españolas II. Ovinas. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Esteban, C. y Tejón, D. 1980. Catálogo de Razas Autóctonas Españolas. Ministerio de Agricultura. Dirección General de la Producción Agraria. Madrid.
- FAO, 1993. Informe: "Un programa mundial integrado para determinar las relaciones entre las razas de cada

- especie de animales domésticos" de la División de Producción y Salud Animal.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fries, R. and Durstewitz, G., 2001. Digital DNA signatures: SNPs for animal tagging. *Nature Biotechnology*, 19:508
- Fuentes, F. C.; Sánchez, J.; Gonzalo, C. 2000. Manual de etnología animal: Razas de rumiantes. Ed. Diego Marín. Murcia.
- Greenacre J.M., 1984. *Theory and Application of Correspondence Analysis*, Academic Press, New York.
- Lebart, L., Morineau, A., and Tabard, N. 1977. *Techniques de la description statistique*. Paris: Dunod
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and H. F. Polesky. 1988. "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells" *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987 Genetic distance molecular phylogeny. In: *Population Genetics and Fishery Management* (N. Ryman and F. Utter, eds.), University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 193-223.
- Nei, M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225-233
- Nei, M., Tajima, F. and Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in polar bears. *Mol Ecol* 4:347-354.
- Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, L. Craighead, and C. Strobeck. 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* 147:1943-1957.
- Queller DC., Goodnight KF (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43(2), 258-275.
- Rannala B., and Montain J. L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94, 9197-9201.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnology* 10, 506-513
- Waser P.M.; Strobeck, C. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *T. Ecol. Evol.* 13:43-44.
- Weir, B.S., Cockerham CC, 1984. *Estimating F-statistics for the analysis of population structure*. *Evolution* 38: 1358-1370
- Weir, B.S., editor 1990. *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 295-420.

Asociación Nacional de Criadores de Ganado Merino

ACTIVIDADES

- Desarrollo del Libro Genealógico de la Raza Merina
- Organización de Concursos, Exposiciones y Subastas de Reproductores
- Ejecución del Programa de Selección y Testaje de Sementales
- Divulgación y Promoción de la Raza y sus Productos
- Comercialización de Corderos de Calidad
- Comercialización y Promoción de Lana
- Prestación de Servicios Técnicos, Sanitarios y Asesoramiento a sus socios
- Organización de Conferencias Mundiales y Españolas sobre el Merino



ASOCIACIÓN NACIONAL
DE CRIADORES DE GANADO MERINO
Lagasca, 70 - 6º Dcha. • 28001 Madrid
Tel. y Fax: 91 431 59 90
E-mail: acme_madrid@incia.es



SOCIEDAD COOPERATIVA GANADEROS
DE MERINO AUTÓCTONO ESPAÑOL
Pabellón Central Recinto Ferial • 06300 ZAFRA (Badajoz)
Tel.: 924 55 38 53 • Fax 924 55 36 13