

Valle, J.¹; Azor, P. J.²; Valera, M.³ Arranz, J. J.⁴ Molina, A.²

¹ Asociación de Criadores de Oveja Montesina. Pedro Martínez. Granada.
E-mail: javiervalle@colvet.es

² Dpto. de Genética. Universidad de Córdoba. E-mail: ge2azorp@uco.es

³ Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla.

⁴ Dpto. de Producción Animal I. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.



Asociación de Criadores
de Oveja Montesina

Análisis de la variabilidad genética de la raza montesina mediante marcadores de ADN

INTRODUCCIÓN

La oveja de raza Montesina (también llamada Ojinegra, Granadina, Sevillana, etc.) es autóctona de los Montes de Granada, concretamente del área que engloba la Sierra sur de Córdoba, la Sierra de Cazorla Segura y las Villas y Sierra Nevada.

Desciende directamente del ovino primitivo llegado de Asia Central, emigrado después de la domesticación: Tronco Ibérico (*Ovis aries ibericus*). Es tan antiguo que ningún experto duda en considerarlo circunstancial a la Península Ibérica. Luego fueron imponiéndose ovinos más avanzados quedando ésta relegada a zonas montañosas poco productivas.

Habita en un medio pobre y hostil, posiblemente el peor de cuantos ocupan los ovinos españoles, en los que otras razas no han podido efectuar el relevo. Cuenta con una población actualmente en franca regresión, lo que ha conducido a la Ojinegra a una situación crítica completamente inmerecida, ya que se trata de una raza de excelente aptitud cárnica, muy prolífica y lechera, de gran dureza, rusticidad y extraordinaria habilidad para el pastoreo.

En el Catálogo Oficial de razas de ganado de España, establecido por Orden del Ministerio de Agricultura de 30 de julio de 1979 estaba incluida en el grupo de Raza de Fomento. El Real Decreto 1682/1997 de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España la incluye en el apartado de Protección Especial.

En las últimas décadas ha sufrido una drástica reducción censal. Aunque llegó a contar con 300.000 cabezas (Sánchez Belda y Sánchez Trujillano, 1979), en los años 80 disminuyó a menos de 70.000 reproductoras (Sánchez Belda, 1984), y a sólo 12.000 en el 1994 (EAAP *Animal Genetic DataBank*). En la última década el ritmo de declive se ha acelerado de forma alarmante. En la actualidad, aunque no existen censos fiables debido a la fuerte erosión de la raza y al cruzamiento indiscriminado, según nuestros estudios preliminares (datos no publicados) se puede estimar en menos de 4000 los reproductores existentes y solamente 5 rebaños con cría en pureza de esta raza.



Desde hace algunos años, debido fundamentalmente a la presión ejercida por los tratantes de ganado (que a la hora de comprar corderos intentaban justificar que estos corderos no tenían demanda con objeto de comprarlos más baratos, siendo totalmente falso) y por la promoción de otras razas, ha ido descendiendo el censo de esta oveja. Tal es así que actualmente, en origen, sólo existen cuatro explotaciones que no han mezclado ganado y otras tantas mixtas, es decir, que están en la fase de cambiar de raza al introducir otras foráneas.

Ante tal situación se ha constituido la Asociación de Criadores de Oveja Montesina en la localidad de Pedro Martínez (Granada), hecho que indica la predisposición inicial de tres ganaderos (que son los que constituyen actualmente la asociación) para conservar esta raza. Se ha diseñado el Programa de Conservación de la Oveja de Raza Montesina, con la colaboración de los Grupos de Investigación AGR-158 y AGR-154 la Universidad de Córdoba, y se ha producido el Reconocimiento Oficial de la asociación por parte de la Consejería de Agricultura y Pesca a través del servicio de Producción Animal de ésta, para la llevanza del Libro Genealógico de la raza ovina Montesina.

Dentro del Programa de Conservación antes mencionado, una actuación fundamental ha sido la de posibilitar que los ganaderos de oveja Montesina puedan acogerse a las Medidas Agroambientales mediante el régimen de ayudas a la utilización de métodos de producción agraria compatibles con el medio ambiente.

Con respecto a la base genética necesaria para garantizar la continuidad de la raza, se ha planteado poner en funcionamiento la Estación de Testaje y Explotación de Reserva Genética de la Oveja Montesina cuya financiación se ha solicitado acogida al la Iniciativa Comunitaria LIDER PLUS que gestiona la Asociación para el Desarrollo Rural Comarca de Guadix, para ubicar en la localidad de Pedro Martínez, en el Polígono Ganadero que existe en la localidad, con la colaboración técnica de la Universidad de Córdoba.

El objetivo de este trabajo es determinar el nivel de variabilidad genética existente en la población que actualmente constituye la raza Montesina utilizando para ello marcadores de ADN.

Todas las actuaciones propuestas colaboran de forma explícita y definitiva a la Conservación de la Diversidad Genética Mundial, objetivo fundamental de la FAO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los marcadores microsatélites del ADN son muy utilizados para la caracterización genética de las poblaciones y los estudios de variabilidad genética debido a las propiedades que presentan (Jarne and Lagoda, 1996). Por ello ha sido necesario poner a punto un panel de marcadores de ADN en esta raza, y el análisis con esta batería de marcadores de una muestra representativa.



Se han muestreado 30 animales de ganaderías pertenecientes a la Asociación de criadores de ovino de raza Montesina. Además se han genotipado 30 animales de la raza Merina y 25 de la raza Merino Precoz. En total se han analizado 85 animales de tres razas. En la toma de muestras hemos utilizado sangre entera obtenida por punción de la vena yugular mediante vacutainer estériles de 5 ml que contenían EDTA k3 como anticoagulante.

La FAO (1999) en su *Segunda Guía Para El Desarrollo de Planes de Conservación* incluye recomendaciones sobre la forma de medir la variabilidad genética de estas razas y la distancia genética con otras (muestreo, estadísticos para medir la variabilidad y la distancia y forma de estimar la precisión). Ellas han sido tenidas en cuenta en la elaboración de este trabajo.

En los estudios de caracterización y de variabilidad genética y de diferenciación entre poblaciones de animales en peligro de extinción, es fundamental un muestreo adecuado dado los bajos tamaños poblacionales, y la alta probabilidad de que se fijen unos alelos y desaparezcan otros, siendo además fundamental para determinar qué individuos retienen una mayor proporción de la variabilidad de los fundadores (o de los individuos con los que se inicia la recuperación de una raza). En también fundamental una selección adecuada de los marcadores genéticos a analizar.

Elección del panel de microsatélites

Hoy día los microsatélites se consideran los marcadores más efectivos para los estudios de variabilidad genética, así como en el control de filiación. Presentan una elevada conservación entre especies próximas filogenéticamente. Así se suelen utilizar en el caso del ovino muchos microsatélites de origen bovino y viceversa.

Para la selección de los marcadores nos hemos basado en las recomendaciones de la FAO (*Grupo de Trabajo de la FAO, 1993*) y hemos añadido otros que aparecen con frecuencia publicados para la caracterización de razas ovinas.

En total se han puesto a punto en esta raza 32 microsatélites (tabla 3). Nuestro objetivo es seleccionar en torno a 25 microsatélites, en función de su polimorfismo en la raza Montesina y de su capacidad de inclusión en multiplex.

La coincidencia en al menos 10 microsatélites con los seleccionados por proyectos internacionales de tipificación de múltiples razas a nivel mundial permitirá la comparación de la raza merina y de los diferentes tipos tradicionales con el resto de razas con las que ha podido tener algún tipo de intercambio genético. Destacar:

- Proyecto EU *Econogene* (2000) que incluye un análisis de la biodiversidad ovina y caprina mediante 30 microsatélites (50 razas europeas ovinas, 5 de las cuales son españolas).
- Proyecto Europeo *Origin and genetic diversity of North European sheep breeds*, coordinado por Emma Eythórsdóttir (1999) con 25 microsatélites para el estudio de la variabilidad intraracial y las distancias gené-

ticas entre 33 diferentes razas de 8 países del Norte de Europa.

- Otros estudios también han permitido la caracterización de diferentes razas, pe. Grigaliunaite *et al.* 2002. para diferentes razas del norte de Europa, o Gutiérrez, *et al.* (2000) en razas americanas.

Análisis estadístico

La variabilidad genética que se mantiene en la población actual se ha estimado mediante el concepto de heterocigosidad: la *heterocigosidad observada* (proporción de individuos heterocigotos), y la *heterocigosidad esperada* o *diversidad génica* (bajo equilibrio Hardy-Weinberg, Nei 1973). Igualmente se ha calculado la *heterocigosidad esperada estimada sin sesgo* (Nei, 1978).

Para determinar la estructura de la población hemos estimado los parámetros *F* de Wright (*Fit*, *Fst* y *Fis*). Posteriormente estos indicadores han sido modificados por diversos autores. La más utilizada es la modificación de Weir y Cockerham (1984).

Se ha estimado la existencia de un cuello de botella en la población mediante la comparación de las heterocigosidades obtenidas (Piry *et al.*, 1999).

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; Escofier y Pagès, 1990). Es un tipo de análisis canónico particularmente adaptado para describir las asociaciones entre dos variables cualitativas (análisis de una tabla de contingencia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del perfil genético de la raza Montesina. Análisis de la variabilidad genética intrapoblacional

La determinación del perfil genético de la raza, nos permitirá la comparación con otras razas que hayan podido presentar un intercambio genético con esta raza y aportar una herramienta objetiva para conseguir la autenticación de los individuos incluidos en el Libro Genealógico al determinar el mejor conjunto de marcadores para los controles de paternidad. Su selección y expansión evitaría la necesidad de introducir genotipos de otras razas para satisfacer las demandas de los consumidores. Por otra parte el conocer la situación censal y la variabilidad de la población que compone la raza permitirá el diseño de estrategias para el mantenimiento de ésta como un seguro de futuro.

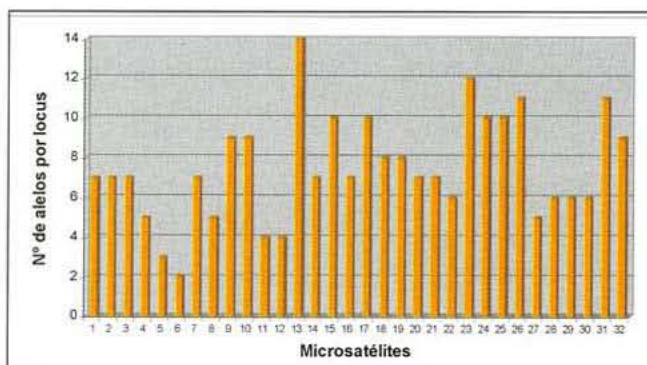
Se considera que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0,95. Dado que no siempre se utiliza el mismo criterio de polimorfismo, una estimación mejor de la variación genética, como se acaba de decir, es la heterocigosidad o proporción de individuos heterocigotos por locus, así como la

media de las heterocigosidades de todos los loci (Nei, 1972).

Los valores encontrados para estos parámetros han sido 0,7162 para He, 0,7314 para la Hnb y 0,6731 para la Ho.

En esta raza se ha encontrado un número medio de alelos por locus de 7,46. El número de alelos manifestados en cada uno de los marcadores analizados se representa en la figura 1.

Figura 1. Alelos detectados en cada uno de los 33 marcadores microsatélites en la raza Montesina



Estadísticos F Wright

El estudio de la variabilidad genética intrarracial y su estructura poblacional, nos indica la situación en cuanto a la variabilidad, permitiéndonos conocer la evolución en cuanto a deriva genética de determinadas poblaciones, efecto de la endocria, del flujo de genes entre los diferentes estratos poblacionales, cuellos de botella, efecto del cruzamiento etc. Es decir, la situación actual, su evolución en un pasado reciente y la tendencia en el futuro próximo de mantenerse el actual sistema de cría.

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 (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) cuyos valores para las tres razas estudiadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estadísticos-F para las razas Montesina, Merino Español y Merino Precoz

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
	0,15823	0,08282	0,08222
Intervalo de confianza (95%)	0,106 - 0,215	0,061 - 0,106	0,035 - 0,139

Los valores F_{IS} indican el defecto o exceso de heterocigos en cada una de las subpoblaciones. Este valor ha sido de 0,082 para las tres razas (tabla 1). 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.

El parámetro F_{IT} indica al igual que el F_{IS} , el exceso o defecto de heterocigos 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 1) el valor que se obtuvo fue del 0,158%.

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 tres razas, el resto es debido a diferencias individuales.

En la tabla 2 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 0,0687 del Merino Español y 0,13214 de la raza Merino Precoz. Esta última raza, con unos mayores valores de este parámetro, demuestra su elevada endogamia en los rebaños en los que se procedió a la toma de muestras.

Tabla 2. Valores F_{IS} de todas las tres razas ovinas analizadas

	F_{IS}
Merino español	0,06879 (0,05806 - 0,07021)
Montesina	0,08204 (0,01985 - 0,10152)
Merino precoz	0,13214 (0,00075 - 0,15191)

Flujo de Genes entre las poblaciones estudiadas.

La estimación del flujo de genes entre las diferentes razas se ha realizado para determinar qué poblaciones han tenido más contacto genético. Para este cálculo se ha tenido en cuenta el *Theta* de Weir y Cockerham. Las poblaciones que han mostrado un flujo genético superior ha sido la Montesina con el Merino Precoz. Las poblaciones que han mostrado un menor flujo de genes han sido la Montesina y el Merino Autóctono, valor similar al del Merino y el Merino Precoz.

Estimación de la existencia de un cuello de botella

Se ha estimado para la población de la raza Montesina, para cada locus y de forma global, la distribución de la heterocigosidad esperada procedente del número de alelos observados, dado el tamaño de la población asumiendo el equilibrio de mutación-deriva. Esta distribución se obtiene a través de la simulación del proceso de coalescencia de *n* genes bajo dos posibles modelos de mutación, el IAM y el SMM. Esto permite el cálculo de la heterocigosidad esperada media y su comparación con la heterocigosidad observada (diversidad genética de Nei) para establecer si existe un exceso o defec-

Tabla 3. Valores de probabilidad, heterocigosidades y error típico en la población que constituye la raza Montesina asumiendo cada uno de los dos modelos de mutación

Locus	Observada			Bajo el Modelo I.A.M.			Bajo el Modelo S.M.M.		
	n	ko	He	Heq	S.D.	Prob	Heq	S.D.	Prob
BM2504	58	7	0,777	0,671	0,117	0,1770	0,786	0,049	0,348
BM6526	54	7	0,663	0,681	0,109	0,3380	0,784	0,051	0,034
BM8125	58	7	0,810	0,675	0,110	0,0520	0,779	0,050	0,303
BMS1948	46	5	0,657	0,574	0,136	0,3180	0,696	0,079	0,239
BMS2626	60	3	0,472	0,354	0,175	0,3280	0,476	0,134	0,393
BMS356	58	2	0,436	0,210	0,164	0,1570	0,251	0,169	0,223
BMS522	60	7	0,624	0,666	0,120	0,2960	0,781	0,051	0,016
BMS975	40	5	0,644	0,590	0,134	0,4310	0,701	0,072	0,183
CSRD2111	58	9	0,689	0,745	0,088	0,640	0,838	0,034	0,315
CSRD263	52	9	0,835	0,754	0,085	0,1440	0,841	0,035	0,349
CSSM008	60	4	0,518	0,461	0,168	0,4600	0,601	0,102	0,183
CSSM015	60	4	0,674	0,464	0,167	0,0800	0,602	0,107	0,281
CSSM31	60	14	0,834	0,849	0,049	0,2780	0,904	0,018	0,006
CSSM41	18	7	0,882	0,810	0,057	0,0410	0,845	0,036	0,112
CSSM43	58	10	0,844	0,779	0,074	0,1650	0,855	0,031	0,282
FAS	26	7	0,745	0,759	0,078	0,3340	0,817	0,043	0,067
HMH1R	52	10	0,848	0,789	0,074	0,2080	0,860	0,030	0,266
ILSTS005	60	8	0,820	0,714	0,096	0,0860	0,812	0,043	0,491
ILSTS011	58	8	0,820	0,711	0,105	0,0920	0,812	0,044	0,517
INRA026	60	7	0,662	0,669	0,115	0,3880	0,781	0,052	0,039
LSCV29	60	7	0,806	0,673	0,109	0,0510	0,782	0,052	0,395
MCM1	32	6	0,815	0,686	0,101	0,0360	0,766	0,058	0,178
MCM26	60	12	0,892	0,816	0,067	0,0390	0,884	0,023	0,442
MCM527	60	10	0,876	0,772	0,082	0,0150	0,855	0,029	0,247
MCM53	60	10	0,720	0,768	0,085	0,2180	0,856	0,029	0,001
OARCP49	58	11	0,897	0,800	0,067	0,0040	0,871	0,025	0,137
OARKP6	30	5	0,453	0,618	0,121	0,1190	0,713	0,075	0,015
RBP3	54	6	0,752	0,628	0,128	0,1350	0,745	0,063	0,470
RM006	50	6	0,684	0,635	0,119	0,4170	0,744	0,064	0,156
SPS115	60	6	0,659	0,617	0,128	0,4480	0,741	0,063	0,094
TGLA429	60	11	0,863	0,803	0,063	0,1320	0,870	0,026	0,329
TGLA53	48	9	0,736	0,769	0,080	0,2640	0,844	0,034	0,015

Resultados los marcadores cuyo valor de $P < 0,05$

to de heterocigosidad en este locus, utilizándose la desviación típica de la distribución del equilibrio mutación-deriva de la heterocigosidad para calcular la diferencia estandarizada para cada loci. La distribución que se ha obtenido a través de la simulación permite también el cálculo de un valor de probabilidad para esta diferencia bajo ambos modelos (Piry *et al.*, 1999).

La filogenia de n genes se simula (Hudson, 1990) bajo el modelo de alelos infinitos (IAM) atribuyendo una mutación simple (una variación en una repetición) a un tiempo determinado y calculando el número de alelos resultantes. El proceso se repite hasta que la última alcance el número de alelos observados. Bajo el modelo SMM se usa un procedimiento bayesiano (Cornuet y Luikart, 1996) basándose en la distribución del parámetro θ , estimado como la proporción de iteraciones (en el proceso de simulación) que produce exactamente ese número de alelos. En un segundo paso se dibuja al azar

valores de θ de acuerdo con la distribución de máxima verosimilitud.

En la tabla 3 se presentan los los valores de H_o (heterocigosidad observada) y los valores de heterocigosidad media (Heq), desviación típica (SD) y los valores de probabilidad de que se cumpla la hipótesis $H_o > H_e$ (Prob) para los modelos IAM y SMM. Como se observa 12 de los 32 loci presentaron un valor de p inferior a 0,05 (bajo los modelos mutacionales IAM y SMM), reflejo de la existencia de desviaciones de la heterocigosidad esperada (probablemente cuellos de botella recientes).

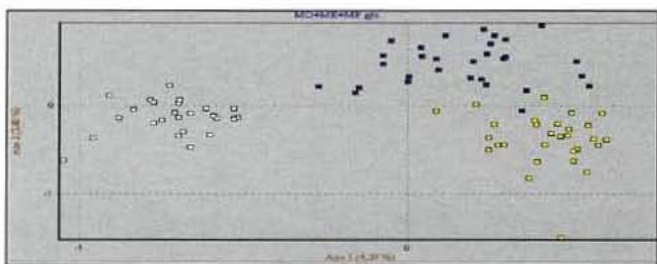
Análisis Factorial de Correspondencias

Los individuos analizados se ven como una nube de puntos dentro de un hiperespacio. El algoritmo busca las direcciones independientes (ortogonales) dentro del hiper-

respacio. 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 tres razas estudiadas en los dos primeros ejes principales. Se han representado gráficamente la posición de cada individuo en el espacio bidimensional canónico.

En la figura 2 se muestran los animales, pertenecientes a cada una de las razas, claramente diferenciados genéticamente. En color amarillo se representan los individuos pertenecientes a la raza Montesina, en azul los que pertenecen a la raza Merino Español y en Blanco la raza Merino Precoz. Se aprecia en la figura que las razas Merino Autóctono y Montesina están más próximas genéticamente entre sí que cada una de ellas con la raza Merino Precoz.

Figura 2. Representación espacial de los individuos en el análisis factorial de correspondencias entre las razas Montesina (amarillo), Merino Español (azul) y Merino Precoz (blanco)



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benzécri, J.P. 1973. L'Analyse des Données: T. 2, I' Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- Cornuet J.M. and Luikart G., 1996 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Econogene. 2000. Sustainable Conservation of Animal Genetic Resources in Marginal Rural Areas: Intergrating molecular genetics, socio-economic and geostatistical approaches. Quality of Life V framework.
- Escofier B., Pagès J, 1990. Analyses factorielles simples et multiples. Paris: Dunod.
- Eythòrsdóttir, E. 1999. Origin and genetic diversity of North European sheep breeds. Proyecto UE.
- FAO 1999. Secondary guidelines for development of National farm animal genetic resources. Management Plans. Measurement of Domestic animal Diversity (MODAD): Working group Report. FAO, Roma.
- 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.
- Greenacre J.M., 1984. *Theory and Application of Correspondence Analysis*, Academic Press, New York.
- Grigaliunaite, I.; Tapio, M.; Holm, L.-E.; Jeppsson, S.; Kantanen, J.; Miceikiene, I.; Olsaker, I.; Viinalass H. and Eythorsdottir, E. 2002. Weitzman's approach and components of diversity in Northern European sheep breeds. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier (France).
- Gutierrez, G., S. Kalinowski, W. Boyce & P. Hedrick. 2000. Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. *Conservation Genetics* 1: 3-15.
- Hudson R.R., 1990 Gene genealogies and the coalescent process, pp. 1-42 in *Oxford Survey in Evolutionary Biology*, Vol. 7, edited by D. Futuyama and J. Antonovics. Oxford University Press, Oxford.
- Jarne P, Lagoda P.J.L (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Lebart, L., Morineau, A., and Tabard, N. 1977. *Techniques de la description statistique*. Paris: Dunod
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J. M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting reductions in the effective size using allele frequencies. *Hered. N.* 90. P. 502-503.
- Sánchez Belda, A. Y Sánchez Trujillano, M.C., 1979. Razas ovinas españolas, MAPA, Madrid.
- Sánchez Belda, A. 1984 Razas Bovinas Españolas. Publ. Extensión Agraria. Madrid.
- Weir, B.S., Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370

AGRADECIMIENTOS

INIA. Ministerio de Educación y Ciencia.
 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
 Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. (Real Decreto 997/1999, de 11 de junio, sobre fomento de las razas autóctonas españolas de protección especial en peligro de extinción, convocatoria año 2003).



Asociación de Criadores de Oveja Montesina