

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

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

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

³ Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla.

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



Asociación Nacional de Criadores
de Ganado Merino

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

INTRODUCCIÓN

En la raza Merina han existido tradicionalmente diferentes Tipos (líneas de animales que se han reproducido durante muchas generaciones entre sí sin introducción de genotipos de otros tipos o líneas) que manifestaban diferencias morfológicas, productivas y adaptativas a determinadas condiciones ambientales de las zonas geográficas de influencia. Entre estas líneas tradicionales encontramos las denominadas como Granda, Perales, Amezua, Hidalgo, López Montenegro, Pedro Escribano (Andalucía) y Serena. Algunos de estos tipos han influido en determinadas razas derivadas del merino, mientras que otras se han mantenido totalmente cerradas en nuestro país. Con el paso del tiempo esta separación de poblaciones ha ido decreciendo debido a los acoplamientos entre ellas, surgiendo por aislamiento nuevas líneas como pueden ser las de las ganaderías del Centro de Hinojosa del Duque, D.Ramón Jordán de Urrís, Aranguez, Ayuso... Las explotaciones en las que se mantienen estas líneas son de grandes dimensiones con un gran número de animales y utilizan un sistema de explotación tradicional. Están distribuidas principalmente en Andalucía y Extremadura, cuna del Merino.

La caracterización genética de las diferentes líneas ofrecerá una herramienta indispensable para valorar la posible utilización de alguna de éstas líneas por adaptarse a las características demandadas por el consumidor. Su selección y expansión evitaría la necesidad de introducir genotipos de otras razas para satisfacer estas demandas. Por otra parte el conocer la situación censal y la variabilidad de cada una de estas líneas permitirá el diseño de estrategias para el mantenimiento de estas líneas como un seguro de futuro.

El estudio de la variabilidad genética intrarracial y su estructura poblacional, nos indicará la situación en cuanto a la variabilidad *inter e intraganadería e inter e intra-línea*, permitiéndonos conocer su evolución en un pasado reciente y la tendencia en el futuro próximo de mantenerse el actual sistema de cría.

Como la clasificación de estas líneas, basándonos en caracteres morfológicos solamente, no siempre se asemeja a los datos históricos o genéticos hemos genotipado a los animales para 33 marcadores de ADN. De estos 33 marcadores se seleccionarán los óptimos para realizar control de filiación en la raza. De esta forma la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Merino podrá realizar un control exhaustivo de las genealogías de los animales que van a ser inscritos en el Libro Genealógico y los que van a entrar a formar parte de su Esquema de Selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han muestreado los animales de las ganaderías que mantenían alguno de los 7 tipos tradicionales y de animales merino no pertenecientes a ninguna línea en concreto. A este grupo se le ha llamado población indiferenciada. La selección de las ganaderías (Tabla 1) se realizó mediante el análisis del pedigrí y de los antecedentes históricos, que presentan la mayor proporción de animales con un 100% de influencia genética de cada una de las líneas históricas de esta raza que se pretendían estudiar. La Asociación de Criadores de Ganado Merino ha sido la encargada de seleccionar a los animales en base a su morfología dentro de las ganaderías seleccionadas.

Tabla 1. Ganaderías seleccionadas para el estudio

SIGLA	GANADERÍA	MUNICIPIO	PROVINCIA
AD y JB	HNOS. ARAGÓN DONOSO	GUAREÑA	BADAJOS
AS	CALERAS Y CALDERAS	ALBURQUERQUE	BADAJOS
BB	BENZAIRE S.A.	BADAJOS	BADAJOS
DB	A.D.I.S.A.	BADAJOS	BADAJOS
DM	DIEGO MORCILLO FERNÁNDEZ	CASTUERA	BADAJOS
E	CENSYRA	BADAJOS	BADAJOS
EC	PEDRO ESCRIBANO CASTRO	POZOBLANCO	CÓRDOBA
FC	SOLETA S.L.	REAL DE LA JARA	SEVILLA
FD	FLORENTINO DOMÍNGUEZ LÓPEZ	CAMPOLUGAS	CÁCERES
FM	FERNANDO MENAYA GARCÍA	ROCA DE LA SIERRA	BADAJOS
HD	CENTRO DE SELECCIÓN OVINO	HINOJOSA DEL DUQUE	CÓRDOBA
HQ	J.A.DE QUINTANA GÓMEZ-BRAVO	CAMPANARIO	BADAJOS
JO	JOAQUÍN ORTIZ BARRUECO	MEDELLÍN	BADAJOS
LF	LUCIANO FERNÁNDEZ MORILLO	CASTUERA	BADAJOS
SR	EXPLOTACIÓN SAN RAFAEL S. L.	MÉRIDA	BADAJOS
ZG	MANUEL PÉREZ ZUBIZARRETA	TRUJILLO	CÁCERES

En la tabla 2 se presentan los animales preseleccionados en cada uno de las líneas Merino. El Merino Negro se ha incluido en lo estudios como una línea más. Además hemos genotipado 25 animales de la raza Ile de France para tener una referencia de distancia. En las líneas Amezua y Perales se ha analizado un número reducido de animales ya que no se encuentran más animales de dichas líneas.

Así se han genotipado un total de 235 animales, 210 animales de la raza Merina (incluido el Merino Negro), y 25 de la raza Ile de France. Para ello hemos utilizado sangre entera obtenida por punción de la vena yugular mediante vacutainer estériles que contenían de anticoagulante EDTA tripotásico.

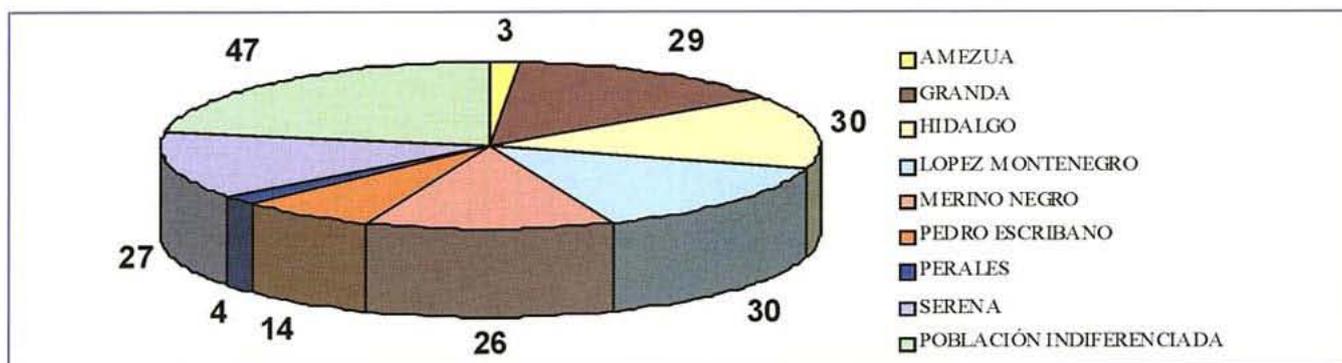
El DNA se ha extraído de sangre utilizando el método "Salting Out" (Miller *et al.*, 1988) o utilizando Chelex 100

Resin, según describió Walsh *et al.* (1991) añadiéndole proteinasa K.

Hemos aplicado en estas poblaciones 33 marcadores de ADN de tipo microsatélite (Azor *et al.*, 2004) ya que son los marcadores de elección para la caracterización genética de las poblaciones y los estudios de variabilidad genética debido a las propiedades que presentan (Jarne and Lagoda, 1996), existiendo un elevado número de trabajos en los que se estima la variabilidad genética de diferentes razas ovinas y la diversidad genética entre ellas (Rendo *et al.*, 2004; Arora and Bhatia, 2004; Pariset *et al.*, 2002; Arranz *et al.*, 2001a, 2001b, 1998; Muigai *et al.*, 2001; Stahlberger-Saitbekova *et al.*, 2001; Diez-Tascón *et al.* 2000, Gutierrez *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 1994).

Para el estudio de la variabilidad poblacional y entre

Figura 1. Tipos y nº de animales analizados



líneas hemos estimado diversos parámetros que se exponen en los resultados del trabajo.

RESULTADOS

Variabilidad genética dentro y entre líneas

En el conjunto de todos los animales que hemos analizado en este trabajo se han encontrado 363 alelos (figura 1). El número de alelos por locus ha oscilado entre oscilando entre 6 y 19 por línea entre 97 y 263. Las dos líneas que han presentado menos alelos han sido Amezua y Perales debido al reducido número de animales analizados. El número medio de alelos por locus desde 3 en la línea Perales hasta 7,9 en la línea López Montenegro.

Los valores de las heterocigosidades medias han oscilado, para el caso de la heterocigosidad esperada, entre 0,53 de la línea Perales y 0,72 de la línea López-Montenegro. En el caso de la heterocigosidad observada ésta ha oscilado entre el 55% de la línea Amezua y el 71% de la línea Escribano (tabla 2).

Tabla 2. Valores de heterocigosidades medias (esperada y observada) para cada una de las líneas de la raza Merino Español

LÍNEA	He	Ho
AMEZUA	0,5585	0,5505
GRANDA	0,7085	0,6717
HIDALGO	0,6965	0,6636
LÓPEZ MONT	0,7206	0,6840
PERALES	0,5363	0,6494
SERENA	0,7007	0,6687
ESCRIBANO	0,6237	0,7173

A partir de las frecuencias alélicas de los marcadores estudiados hemos estimado los valores de los estadísticos F de Wright (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) (Wright, 1965, 1978) con el fin de determinar la tasa de consanguinidad y la intensidad de fijación que ha tenido lugar en las poblaciones objeto de estudio.

En la tabla 3 se recogen los valores de estos parámetros junto con el error estándar y los intervalos de confianza con una fiabilidad del 95%, calculados tomando todas las líneas como una única población y la raza Ile de France. En este caso el nivel de diferenciación genética

Tabla 3. Estadísticos F de Wright en toda la población de animales estudiados: Merino Español e Ile de France

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
	0,17904	0,11396	0,07345
Intervalo de confianza (95%)	0,12474 - 0,23645	0,07988 - 0,15708	0,02953 - 0,11045

(F_{ST}) entre ambas razas ha sido del 11,4%, es decir, el 11,4% de la variabilidad se debe a las diferencias debidas al efecto raza, el resto es debido a diferencias individuales.

Cuando estimamos estos parámetros para las líneas tradicionales de la raza Merina (tabla 4) el grado de diferenciación genética entre las líneas se ve reducido hasta casi 3 veces con respecto a entre razas, siendo tan sólo el 3,9% de la variabilidad genética total en la raza Merina debida a diferencias entre líneas, el resto es debido a diferencias entre los individuos. Rendo *et al.*, (2004) encontraron un valor del índice F_{ST} en 9 razas ovinas del norte de España inferior al que hemos encontrado ($F_{ST} = 0,029$), a pesar de que nuestro índice de diferenciación es entre líneas y no entre razas.

En este caso el valor de F_{IS} obtenido ha sido más bajo lo que indica que dentro de cada una de las líneas tradicionales existe una alta variabilidad genética. El grado de consanguinidad en este caso también es inferior al anterior debido a los métodos reproductivos utilizados en la raza Ile de France que hacen se incremente la homocigosis.

Tabla 4. Estadísticos-F de Wright de las líneas tradicionales de la raza Merino Español

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Líneas tradicionales del Merino	0,101±0,023	0,039±0,005	0,064±0,022

Hemos estimado los valores F_{IS} en cada una de las líneas. Este valor que indica el defecto o exceso de heterocigosos en cada una de las subpoblaciones. 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 lo contrario. Los valores de F_{IS} superiores a 0.10 están indicando una baja resolución en estudios de diferenciación genética. Cuando calculamos el valor de los F_{IS} con su intervalo de confianza en cada una de las líneas de la raza merina determinados utilizando 1000 permutaciones de los alelos en el interior de cada línea para todos los locus (tabla 5), observamos que la línea

Tabla 5. Valores FIS de todas las líneas de la raza Merino Español

Línea	F_{IS}
AMEZUA	0,22968
GRANDA	0,07333
HIDALGO	0,08381
HINOJOSA	0,11535
LÓPEZ-MONTENEGRO	0,06590
PEDRO ESCRIBANO	-0,08955
PERALES	0,01739
SERENA	0,07163
MERINO NEGRO	-0,01489
INDIFERENCIADA	-0,00718

Amezua presenta un menor variabilidad genética seguida de la línea Hinojosa. En el primer caso esto es debido a que solamente hemos dispuesto de 3 animales en esta línea. El resto de líneas han presentado unos valores inferiores a 0.10 y casi el 43% de las líneas han presentado unos valores negativos.

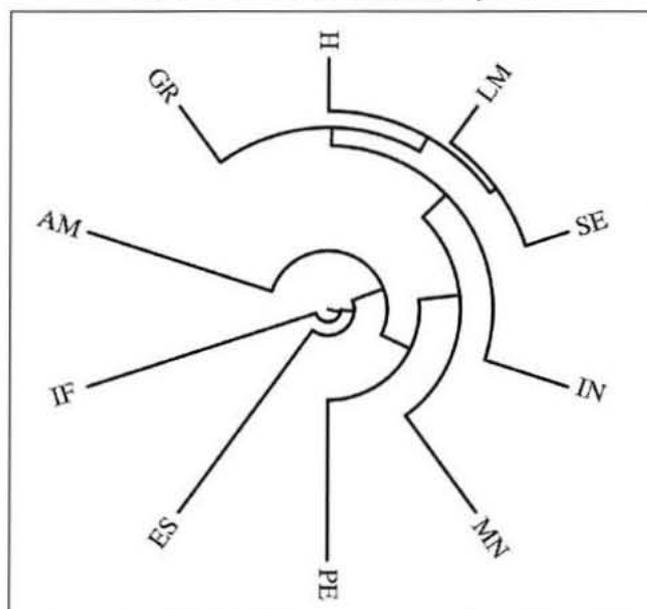
Cálculo de distancias genéticas entre líneas

La distancia genética entre poblaciones puede ser definida en términos estadísticos midiendo el número de variaciones alélicas de cada *locus* que se han acumulado entre dos poblaciones que divergieron entre sí a partir de una población ancestral (Dobzhansky, 1976). Hemos estimado la distancia genética de Nei (1972) (Tabla 6). Según los valores obtenidos la mayor distancia es la existente entre las líneas Amezua y Escribano y el menor estimado de distancia se ha dado entre López Montenegro y Serena.

Al representar gráficamente la distancia entre las 7 líneas tradicionales del merino se confirma lo anteriormente señalado en lo que a cercanía genética entre las líneas tradicionales se refiere. Hemos representado gráficamente estas distancias en un dendrograma para ver la forma de agruparse de estas líneas (figura 2). También se ha incluido en el gráfico la raza Ile de France. Para esta representación hemos utilizado el método estándar UPGMA (*método no ponderado de grupos usando promedios aritméticos*) desarrollado por Farris (1972) y Taten (1982), 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).

En el dendrograma se observa claramente el alejamiento existente entre la raza Ile de France con el resto de poblaciones. Las líneas Amezua y Escribano son las más alejadas del resto de líneas y Serena y López Montenegro son las que más cercanía genética presentan. No obstante las líneas Granda, Hidalgo, López Montenegro y

Figura 2. Cladograma de distancias entre las líneas de la raza Merino Español



AM: Amezua, GR: Granda, H: Hidalgo, LM: López Montenegro, ES: Escribano, PE: Perales, SE: Sertena, MN: Merino Negro, IN: Población indiferenciada (cruces con gran influencia de Hidalgo, Serena y Granda), IF: Ile de France

Serena se agrupan en el mismo clúster, muy próximas a la población indiferenciada debido a la influencia de las anteriores en la formación de ésta. El resto de líneas presentan un mayor alejamiento genético de las anteriores.

La información proporcionada por marcadores moleculares neutros de tipo microsatélite describe similitudes entre poblaciones debidas a antecedentes comunes. Ponzoni (1997) establece que la información de marcadores moleculares neutros permite asegurar que poblaciones cuya apariencia y rendimientos son similares, son en realidad diferentes, pero no que poblaciones cuya apariencia y rendimientos son diferentes sean genéticamente iguales.

Tabla 6. Distancias genéticas (Nei, 1972) de las líneas tradicionales de Merino Español

	AM	GR	H	LM	ES	PE	SE	MN	IN
AM	****								
GR	0.381	****							
H	0.340	0.154	****						
LM	0.341	0.130	0.110	****					
ES	0.851	0.398	0.410	0.373	****				
PE	0.455	0.368	0.241	0.297	0.603	****			
SE	0.314	0.163	0.117	0.097	0.453	0.299	****		
MN	0.581	0.272	0.273	0.192	0.466	0.480	0.283	****	
IN	0.499	0.153	0.220	0.146	0.340	0.395	0.234	0.273	****

AM: Amezua, GR: Granda, H: Hidalgo, LM: López Montenegro, ES: Escribano, PE: Perales, SE: Sertena, MN: Merino Negro, IN: Población indiferenciada (cruces con gran influencia de Hidalgo, Serena y Granda).

CONCLUSIONES

A la vista de los datos obtenidos la mayor parte de las líneas de la raza Merina mantienen una importante variación genética que debería ser mantenida con una adecuada planificación de los apareamientos entre otras actuaciones. De esta forma se asegura la capacidad adaptativa de estas líneas a los sistemas de producción donde se desenvuelven y evitar los efectos negativos de un incremento desmesurado en los niveles de endogamia. El pequeño número de animales analizados en las líneas Amezua y perales han afectado claramente a su variación genética.

Actualmente a pesar de la influencia existente entre las líneas, aún existe un cierto nivel de diferenciación entre ellas. Las líneas Granda, Hidalgo, Serena y López Montenegro son las que se han presentado más próximas en el clúster y las líneas Amezua, Perales y Escribano presentan una mayor independencia genética en el dendrograma.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, R.; Bhatia, S. 2004. Genetic structure of Muzzafarnagri sheep based on microsatellite analysis. *Small Ruminant Research*. Article in Press.
- Arranz, J.J., Bayón, Y. and San Primitivo, F., 2001a. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Selec. Evol.* **33**, pp. 529-542.
- Arranz, J.J., Bayón, Y. and San Primitivo, F., 2001b. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Res.* **39**, pp. 3-10.
- Arranz, J.J., Bayon, Y., San Primitivo, F. (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim Genet.* **29**: 435-440.
- Arrebola, F. A. 2002. Caracterización Lanera del Merino Autóctono Español. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Azor, P.J.; Molina, A; Barajas, F; Arranz, J.J.; Valera, M.; Rodero, A.; Miguélez, J.J. 2004. Estimación del nivel de diferenciación genética de la raza merina mediante ADN Microsatélite. FEAGAS. Vol. 25, pp: 92-98.
- Buchanan, F.C., Adams, L.J., Littlejohn, R.P., Maddox, J.F. and Crawford, A., 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* **22**, pp. 397-403
- Diez-Tascon, C., Littlejohn, R.P., Almeida P.A., Crawford, A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim Genet.* **31**: 243-251.
- Farris, J.S. 1972. Estimating philogenetic trees from distances matrices. *Am. Nat.* **106**, 645-668
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- 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.
- Jarne P.; Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, **11**, 424-429.
- 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.
- Muigai, A.W., Watts, P.C., Hirbo, J., Kemp, S., O Rege, J.E., Hanotte, O., 2001. Assesment of the genetic diversity of sub-Saharan African sheep populations using microsatellite markers. In: Proceedings of the 27th International Conference on Animal Genetics. Animal Genomics: Synthesis of Past, Present, and Future Directions. University of Minnesota, MN, pp. 94.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- Pariset, L.; M.C. Savarese, I. Cappuccio, C. Marchitelli, A. Crisà, A. Nardone; A. Valentini. 2002. Diversity and inbreeding in Sarda sheep flocks assessed by microsatellites. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 19-23, 2002, Montpellier, France
- Rendo F., M. Iriondo , B. M. Jugo , L. I. Mazón , A. Aguirre , A. Vicario and A. Estonba. 2004. Tracking diversity and differentiation in six sheep breeds from the North Iberian Peninsula through DNA variation. *Small Ruminant Research* Vol 52, nº 3 , pp 195-202.
- Stahlberger-Saitbekova, N.; Schläpfer, J.; Dolf, G.; Gaillard, C., 2001: Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* **118**: 379-387.
- Tateno, Y. 1982. Molecular evolution, protein polymorphism and the neutral theory. Japan Scientific Societies Press, Tokio. Springer-Verlag, Berlin.
- 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.
- 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.
- Wright, S., 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, **38**, 405-417.



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

