

Análisis preliminar de la estructura genética del Merino: situación de las estirpes tradicionales mediante análisis genealógico y molecular

P.J. Azor¹, I. Cervantes^{1,2}, M. Valera³, J.J. Arranz⁴, C. Medina¹, J.P. Gutiérrez², F. Goyache⁵, A. Muñoz¹, A. Molina¹

¹ Grupo de Investigación MERAGEM. Dpto. de Genética. Universidad de Córdoba. Edif. Mendel, Pl baja. Campus de Rabanales. Ctra. Madrid –Cádiz, (N-IV) km 396^a 14071 Córdoba. España. E-mail: ge2azorp@uco.es

² Dpto. de Producción Animal. Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Madrid.

³ Dpto. de Ciencias Agroforestales (EUITA) Universidad de Sevilla. Ctra de Utrera, km1. 41013 Sevilla.

⁴ Dpto. de Producción Animal. Universidad de León. Campus de Vegazana. León.

⁵ Área de Genética y Reproducción. SERIDA de Somió. Camino de los claveles, s/n. Gijón. Asturias.

Resumen

La raza Merina ha tenido a lo largo de la historia un importante papel desde el punto de vista político, biológico, económico y ganadero, siendo hoy día la raza de aptitud cárnica de mayor censo de nuestro país. El objetivo de este trabajo ha sido conocer la situación de las estirpes tradicionales más importantes de la raza Merina en España (“Serena”, “Hidalgo”, “Granda” y “López-Montenegro”) mediante el uso de herramientas genealógicas y moleculares. Según nuestros resultados las estirpes que más influencia mantiene actualmente son la “Serena” y la “Hidalgo” con un 27% y un 15% respectivamente mientras que “López-Montenegro” y “Granda” cuentan con sólo un 0,3%. Se ha puesto de manifiesto la predilección de los criadores por determinados tipos de merino lo que podría poner en peligro la variabilidad genética intrarracial del Merino haciendo desaparecer alguna de las estirpes tradicionales, que por sus características morfológicas y productivas son menos rentables económicamente. Las dos estirpes con más influencia en la población son las que han presentado unos valores de variabilidad genética, estimada a partir de marcadores moleculares, mas reducida. Sin las estirpes Granda y López-Montenegro han presentado los valores mayores de heterocigosidad observada (H_o) (0,67 y 0,70), esperada (H_e) (0,68, 0,72) y número medio de alelos por locus (N_{ma}) (7,45 y 7,97) respectivamente. La comparación entre ambas metodologías determinó que el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) para los animales de las cuatro líneas identificadas, fue un 30% más elevado mediante genealogías que mediante información molecular.

Palabras clave: Merino, estirpe, análisis genealógico, análisis molecular, variabilidad genética

Summary

Preliminary assessment of population structure of Spanish Merino Breed: traditional strain situation using genealogical and molecular analysis

Merino sheep breed is the most important breed in Spain according to their census. It is the most censed meat production sheep breed in Spain. It has played an important role in the politic, biologic, economical and livestock aspects. The aim of this study is assess the situations of the most important traditional strain in Spain of Merino breed (Serena, Higalgo, Granda y López Montenegro) using genealogical and molecular information. The most influential strains in the present Merino population are “Serena” and “Hidalgo” (27% and 15% respectively). Lopez Montenegro and Granda strains have

only 0.3% of influence. The breeder's preferences in raise some strains have been evidenced. This task could endanger the intra population genetic variability of the Merino breed and some traditional strains could disappear because of their economical worse morphological and productive trait. The two more influential strains (Serena and Hidalgo) have shown the lowest value of the molecular variability parameters. However the highest values have been shown by Granda and López-Montenegro strain (observed heterozygosity (H_o) = 0.67 and 0.70; expected heterozygosity (H_e) = 0,68 and 0,72; and average number of alleles per locus was 7,45 and 7,97 respectively). We found that the coefficient of genetic differentiation value (F_{ST}) using genealogical information, for the four strains analyzed, was 30% higher than using molecular information.

Key words: Merino, strain, genealogical analysis, molecular analysis, genetic variability

Introducción

La raza Merina ha tenido a lo largo de la historia un importante papel desde el punto de vista político, biológico, económico y ganadero. Originariamente se seleccionó para la producción lanera, no obstante de ella se han originado muchas de las poblaciones especializadas en producción cárnica que existen en la actualidad en los cinco continentes. Tras la crisis del mercado de la lana en la década de los 60 se ve obligada a reorientar su objetivo productivo hacia la producción de carne, lo que ocasionó un importante declive de esta raza y la práctica desaparición de muchos de sus tipos tradicionales (Arrebola, 2002).

En los años 80 la Asociación de Criadores, organizó un Núcleo de Control Cárnico con la finalidad de reorientar la selección de esta raza hacia la producción de carne, aprobándose en el año 1994 un esquema de selección que tiene como principal objetivo la mejora del potencial de crecimiento de los corderos (aunque sin olvidar el potencial lanero ni las características morfológicas y reproductivas). Como consecuencia de esto se ha originado un paulatino incremento de los tipos (estirpes) de mayor formato en detrimento de aquellos otros más rústicos o de mayor calidad lanera. No obstante la actual coyuntura del ovino de carne extensivo, y el incierto futuro que se cierne sobre nuestras razas, hace necesario monitorizar la variabilidad interna presente en la raza Merina como seguro de futuro. En este trabajo se realiza un análisis preliminar de la

estructura genética de la raza, principalmente en cuanto a situación de las principales estirpes que aún se mantienen en pureza, desde una doble perspectiva, mediante el análisis genealógico y mediante el análisis de un panel de marcadores moleculares microsatélites.

Material y métodos

Análisis Genealógico

Para realizar el estudio genealógico se ha utilizado el Libro Genealógico del Merino Español creado en el año 1972 que cuenta con un total de 325.622 registros (58.407 machos y 267.215 hembras). Previamente al análisis de la estructura genealógica se realizó un estudio del nivel de información (acabado) del pedigrí (Boichard et al., 1997) y se estimaron los principales parámetros globales de la población: *número efectivo de fundadores* (Lacy, 1989), *de ancestros* y *de ganaderías fundadoras* (Boichard et al., 1997).

La estructura genética de la población se ha inferido mediante los estadísticos *F* de Wright (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) (Wright, 1978), calculándose siguiendo la metodología de Caballero y Toro (2000 y 2002), considerando los animales de cada una de las estirpes o de cada ganadería como subpoblaciones.

Finalmente se determinó la influencia de las 4 estirpes tradicionales presentes en la raza en la actualidad (Serena, Hidalgo, Granda y López Montenegro) mediante la suma del coeficiente de relación media de los fundadores correspondientes a cada una de las líneas en la población total y en la población de referencia. Ésta estuvo constituida por los animales nacidos en los últimos 4 años (aproximadamente el intervalo generacional obtenido para esta raza). Los análisis genealógicos se realizaron con el programa ENDOG v4.5 (Gutiérrez y Goyache, 2005).

Análisis Marcadores Moleculares

En cuanto al análisis genético se ha obtenido sangre de una muestra de animales pertenecientes a cada una de las estirpes: “Serena” (30), “Hidalgo”, (30) “Montenegro” (19), “Granda” (30) intentando la máxima representación de las ganaderías que mantienen animales puros de éstas, y un mínimo grado de parentesco entre los animales de cada ganadería. Estos animales han sido genotipados para un panel de 33 marcadores entre los que se incluyen todos los recomendados por el *Grupo de Trabajo* de la FAO.

La importancia que, desde el punto de vista de la producción animal, tienen los marcadores genéticos radica en su aplicación a la identificación individual y al control de filiación, al garantizar la fiabilidad de los documentos genealógicos, material fundamental para emprender las tareas de conservación y mejora de las razas y el estudio de la variabilidad genética de la población y su cercanía con otras poblaciones y razas (Azor y Goyache, 2007). Para la caracterización genética de las poblaciones y los estudios de variabilidad genética, se han impuesto los microsatélites del ADN debido a las propiedades que presentan (Jarne y 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 (Arranz et al., 1998 y 2001, Álvarez et al., 2006; Arora y Bhatia, 2006). Esto es de mayor ayuda cuando la profundidad de los registros genealógicos no es lo suficiente, como es este caso. La combinación de ambas estrategias nos indicará la situación en cuanto a la variabilidad *inter e intraganadería* e *inter e intra-línea*, permitiéndonos conocer la evolución en cuanto a deriva genética de determinadas subpoblaciones, efecto de la endocría, 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.

La caracterización genética y productiva de las diferentes líneas ofrecerá una herramienta indispensable para valorar la posible utilización de alguna de éstas líneas para adaptarse a las nuevas demandas de los consumidores. Por otra parte el conocer la situación censal y la variabilidad de cada una de estas líneas permitirá el diseño de estrategias para su mantenimiento.

El ADN fue extraído utilizando el método de Miller et al., (1998) y la amplificación fue llevada a cabo mediante PCR múltiples. Los productos amplificados fueron analizados, en un secuenciador automático capilar (ABI 3130). Los alelos fueron tipificados utilizando el software *Genotyper v 3.7* (Applied Biosystems).

La variabilidad genética que se mantiene en cada estirpe se ha estimado mediante la *diversidad alélica, heterocigosidad observada y esperada*. La estructura genética de la población se ha inferido también mediante los estadísticos *F* de Wright.

Para el análisis molecular se utilizaron los paquetes informáticos *Genetix v 4.05* (Belkhir et al., 2001) y Molkin 2.0 (Gutiérrez et al., 2005).

Resultados y discusión

El grado de conocimiento del pedigrí de los animales incluidos en la población de referencia, se ha representado en la figura 1 para machos y hembras de forma diferenciada. Como se observa siempre es superior en los machos manteniéndose por encima del 50% hasta la 5ª generación. Se muestra también la profundidad del pedigrí para los animales genotipados de cada estirpe, se observa que los individuos de la estirpe “Granda” presentan un mayor % de ancestros conocidos seguidos de la “Serena”, “Hidalgo” y “Montenegro”. El número medio de generaciones equivalentes completas fue de 3,8, valor que está dentro del rango obtenido por Huby et al., (2003) para las raza ovinas francesas y superior al encontrado en la Xalda (Goyache et al., 2003).

En la tabla 1 se presentan diversos parámetros relacionados con la *probabilidad de origen* de la raza. Se puede observar que tanto el *número efectivo de ancestros* como de *fundadores* disminuye cuando consideramos los nacidos en la última generación. Esta disminución también se pone de manifiesto en el *número de ancestros que explican el 50%* de la variabilidad genética presente en la población. Según nuestros resultados existen 9 ancestros que tienen más de un 1% de contribución genética en la población global. Por otro lado, el número efectivo de ganaderías fundadoras se mantiene prácticamente constante para la población total y para la población de referencia aumentando para esta última el número de ganaderías que aporta el 50% de la variabilidad genética a la raza (de 8 a 10). Lógicamente para el caso de los animales genotipados todos estos parámetros son inferiores, pero comparativamente la variabilidad genética que explica esta muestra de la población es mayor que la del resto debido a que son individuos escogidos de diferentes estirpes y con una relación mínima entre ellos. La contribución aportada por los animales fundadores calculada mediante la suma de los coeficientes de relación media mostró que un 79% de las contribuciones a la población son debidas animales fundadores hembras.

Del mismo modo se obtuvo la influencia de las líneas tradicionales en la formación de la última generación, siendo las líneas que más influencia mantiene actualmente la de “Serena” y la de “Hidalgo” con un 27% y un 15% respectivamente mientras que “Montenegro” cuenta con solo un 0,3% y “Granda” con un 0,3% . Se ha observado un aumento de la representación de individuos pertenecientes a las líneas “Serena”, y en mucha menor medida de los tipos “Hidalgo” y “Granda”, ya que si consideramos la población total esta influencia es sólo del 17%, 14% y 0,2% respectivamente. Sin embargo, la influencia de “Montenegro” ha disminuido en la última generación ya que si consideramos la población total su influencia asciende al 0,9%.

El análisis de la pertenencia de cada uno de los animales inscritos en el LG determinó la existencia en la población global de 17.601 individuos 100% “Serena”, 31.700 para “Hidalgo”, 1.636 para “Montenegro” y 239 para “Granda”. En cuanto al número de individuos que presentan algún porcentaje de sangre de cada una de estas estirpes fue de 70.608, 61.383, 4.347 y 1.990 respectivamente para cada una de estas estirpes. En la última generación el número de individuos con algún % de sangre de estas estirpes fue: de 16.962 (“Serena”), 12.626 (“Hidalgo”), 694 (“Granda”) y 279 (“Montenegro”).

Los estadísticos F_{ST} calculados vía molecular y genealógica considerando como subpoblaciones las estirpes y las ganaderías están recogidos en la tabla 2. El parámetro F_{ST} para los animales de las cuatro líneas identificadas, fue un 30% más elevado mediante genealogías que mediante información molecular. El grado de diferenciación estimado mediante el análisis genealógico es prácticamente imposible de observar debido a la escasa profundidad del pedigrí y a la gran cantidad de animales fundadores que impide obtener parámetros totalmente fiables. No obstante la diferenciación obtenida usando como subpoblación las diferentes ganaderías es mayor rondando el 2% de forma que el elevado valor obtenido para el F_{ST} mediante datos genealógicos para los individuos genotipados probablemente es debido al efecto ganadería que prevalecería sobre el efecto línea.

En cuanto a la situación de estas líneas desde el punto de vista molecular, en la tabla 3 se presentan los principales estimadores de la variabilidad de las cuatro estirpes analizadas. Se puede observar que las líneas más influyentes en la población actual de la raza Merina son las que han manifestado unos valores de variabilidad genética más bajos. En este sentido la línea Hidalgo ha sido la que ha presentado los valores más bajos de N_{ma} , H_o y H_e (6,94; 0,66 y 0,69 respectivamente). Por el contrario las líneas que han mostrado los mayores niveles de variabilidad genética han sido las líneas

Granda y López Montenegro, esta última mostrando los mayores valores de N_{ma} , H_o y H_e (7,97; 0,68 y 0,72 respectivamente). La población indiferenciada estudiada ha presentado unos valores altos de variabilidad genética, similares a los mostrados por la estirpe López-Montenegro.

El análisis genealógico de la raza Merina ha demostrado que la estirpe que mantiene más influencia en la raza actualmente es la “Serena”, seguida de la de Hidalgo mientras que las otras dos estirpes tradicionales (“Montenegro” y “Granda”) están prácticamente al borde de la desaparición.

A pesar de la escasa representación de las estirpes líneas “Granda” y “Montenegro” han sido las que han manifestado el mayor nivel de variabilidad genética, estimada a partir de los marcadores moleculares, por lo que aún se está a tiempo de aumentar su censo sin que aumente considerablemente la endogamia.

Por lo tanto consideramos que se deben establecer medidas que permitan el mantenimiento de la variabilidad genética intrapoblacional, muy especialmente en el caso de las líneas Granda y Montenegro si queremos tener la posibilidad de contar en el futuro con animales de estas características.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Merino y al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El primer autor ha sido subvencionado por el Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia).

Bibliografía

- [Alvarez I](#), [Gutiérrez JP](#), [Royo LJ](#), [Fernández I](#), [Gómez, E](#), [Arranz JJ](#), [Goyache F](#), 2005. Testing the usefulness of the molecular coancestry information to assess genetic relationships in livestock using a set of Spanish sheep breeds. [J Anim Sci](#). 83(4):737-44.
- Arora R, Bhatia S, 2006. Genetic diversity of Magra sheep from India using microsatellite analysis. [Asian-Australasian Journal of Animal Sciences](#) 19: 938-942
- Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F, 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites, [Anim. Genet.](#) 29, 435-440.
- Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F, 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. [Genet. Sel. Evol.](#), 33: 529-542.

- Arrebola FA, 2002. Caracterización Genética de la Aptitud Lanera del Merino Autóctono Español. Tesis Doctoral Universidad de Córdoba.
- Azor PJ, Goyache F, 2007. Metodología de caracterización genética. En: Patrimonio Ganadero Andaluz. Vol I. La ganadería andaluza en el Siglo XXI. Ed. Junta de Andalucía. Sevilla. España. Pp. 483-524.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F, 2001. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Boichard D, Maignel L, Verrier E, 1997. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet. Sel. Evol.* 29:5-23.
- Caballero A, Toro MA, 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet. Res. Camb.* 75: 331-343.
- Caballero A, Toro MA, 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Gen.* 3: 289-299.
- Goyache F, Gutiérrez JP, Fernández I, Gómez E, Álvarez I, Díez J, Royo LJ, 2003. Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 95-103.
- Gutiérrez JP, Altarriba J, Díaz C, Quintanilla AR, Cañón J, Piedrahita J, 2003. Genetic analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35:43-64.
- Gutiérrez JP, Cervantes I, Molina A, Valera M, Goyache F, 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating realised effective sizes from pedigrees. *Genet. Sel. Evol.*, in press.
- Gutiérrez JP, Goyache F, 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 357-360.
- Gutiérrez JP, Royo LJ, Álvarez I, Goyache F, (2005): Molkin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718-721
- Huby M, Griffon L, Moureaux S, De Rochambeau H, Danchin-Burge C, Verrier E, 2003. Genetic variability of six French meat sheep breeds in relation to their genetic
- Jarne P, Lagoda P, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Lacy RC, 1989. Analysis of Founder Representation in Pedigrees: Founder Equivalent and Founder Genome Equivalents. *Zoo. Biol.* 8:111-123.
- MacCluer J, Boyce B, Dyke L, Weitzkamp D, Pfenning A, Parsons C, 1983. Inbreeding and pedigree structure in Standardbred horses. *J. Hered.* 74: 394-399.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky, HF, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- Malécot G, 1948. *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Masson et Cie, Paris.
- Vassallo JM, Díaz C, García-Medina JR, 1986. A note on the population structure of the Avileña breed of cattle in Spain, *Livest Prod Sci* 15: 285-288.
- Wright S, 1978. *Evolution and the genetics of populations: Vol. 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. Chicago. USA

Figura 1. Profundidad de pedigrí para los animales de la población de referencia en el Merino español (individuos nacidos en los últimos 4 años; cuadrados negros para machos y cuadrados blancos para hembras). Se ha representado también la profundidad del pedigrí encontrada en los animales genotipados para cada línea (triángulo negro: "Serena", triángulo blanco: "Hidalgo", círculo blanco: "Montenegro", círculo negro: "Granda")

Figure 1. Pedigree completeness in reference population (animals born in the last four year, black squares for males and white squares for females) in Merino sheep. It is also shown the pedigree completeness for genotyped individuals for each strain (black triangle for "Serena", white triangle for "Hidalgo", white circle for "Montenegro, black circle for "Granda".

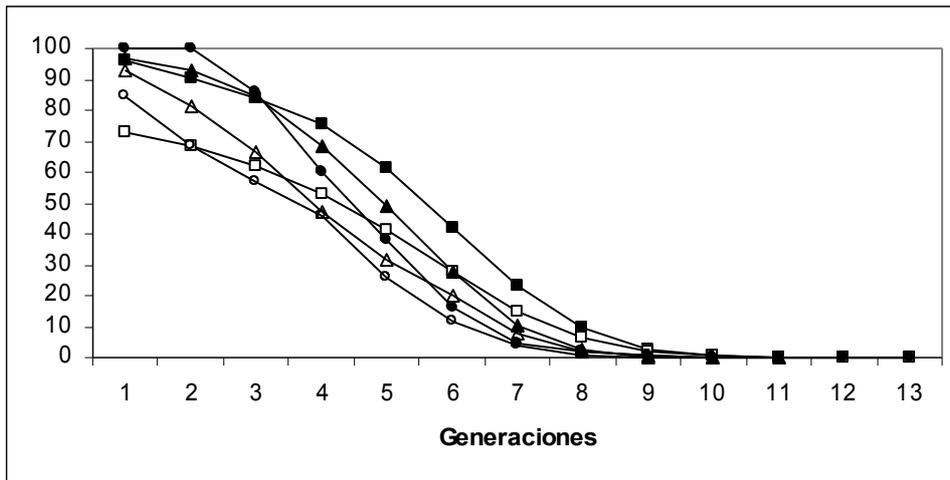


Tabla 1. Resumen de los principales parámetros que caracterizan la variabilidad genética de la población de raza Merina considerando todos los animales inscritos (T) la última generación (PR, individuos nacidos en los últimos 4 años) y los individuos genotipados (G).

Table 1. Parameters that characterise the genetic variability of the Merino sheep considering the whole population (T), the last generation (PR, animals born in the last four years) and genotyped individuals (G).

	T	PR	G
Número de individuos analizados	325622	43976	105
Número de fundadores	126283	107620	442
Número efectivo de fundadores	442	381	138
Número total de ancestros	29012	18703	134
Número de ancestros que explican el 50% de la variabilidad genética	304	226	35
Número efectivo de ancestros	213	170	80
Número efectivo de ganaderías fundadoras	15,9	15,3	8,7
Número de ganaderías que explican el 50% de la variabilidad genética	8	10	5

Tabla 2. Estadísticos F obtenidos a partir del análisis molecular y genealógico considerando los animales genotipados de las estirpes de Merino Español, se exponen también los resultados vía genealógica usando las ganaderías como subpoblaciones.

Table 2. Molecular and genealogical F statistics considering the genotyped individuals of Merino sheep strains, it is shown also the genealogical results using the flocks as subpopulations.

	Estirpes		Ganaderías
	Animales Genotipados		Todos
	Vía molecular	Vía genealógica	Vía genealógica
F_{is}	0,06702	-0,00842	-0,00754
F_{st}	0,02514	0,03548	0,03510
F_{it}	0,09048	0,02736	0,02751

Tabla 3. Principales estadísticos moleculares relacionados con la situación de variabilidad de las cuatro estirpes del Merino estimados utilizando un panel de 33 marcadores microsatélites.

Table 3. Main statistical molecular parameters that characterise the genetic variability of the Merino sheep strains using a panel of 33 molecular markers.

	Granda n=30	Hidalgo n=30	Montenegro n=19	Serena n=30	Población Indiferenciada n=48
NMA	7,45	6,94	7,97	7,18	7,93
Ho	0,6717	0,6636	0,6840	0,6687	0,7448
He	0,7085	0,6965	0,7206	0,7007	0,7152

MNA: Número medio de alelos por locus; Ho : Heterocigosidad observada; Heterocigosidad esperada.