

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA OVEJA LOJEÑA MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

GENETIC CHARACTERISATION OF THE LOJEÑA SHEEP BREED USING MICROSATELLITE MARKERS

Pablo M.^{1*}, Landi V.¹, Martínez A.¹, Lara C.², Delgado J.V.¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, España. *z12pagom@gmail.com

²Asociación Raza Ovina Lojeña. Loja, Granada, España

Keywords:

Local breeds
Molecular markers
Biodiversity

Palabras clave:

Razas autóctonas
Marcadores moleculares
Biodiversidad

Abstract

The Lojeña sheep breed is an endangered Spanish breed, which is raised in the southeast of Granada (Andalusia). For the genetic characterization of this breed and to define its genetic profile, 21 microsatellites recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG) were analyzed. They were amplified by PCR and electrophoresed in an automatic sequencer ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genetic analysis and allelic typing were performed with the Genescan Analysis 3.1.2 and Genotyper 2.5 softwares by using Genescan® 400HD ROX Size Standard. Heterozygosities, F-statistics estimates, genetic distances, multivariate analyses and assignment tests were carried out. All analyzed microsatellites were very informative, except ETH10 (PIC < 0.30). Lojeña sheep breed shows a high variability, with more than 12 alleles per locus; He value was 0,738 and Ho was 0,684. The Lojeña breed has a well-defined structure, with two subpopulations. The reasons for that structure are not obvious, but could be due to the particular geography of this area, which can be cause of flock isolation. A conservation and genetic management plan is being carried out to avoid inbreeding and uncontrolled crossbreeding with highly productive introduced breeds.

Resumen

La oveja Lojeña es una raza ovina española en peligro de extinción, que vive en un entorno muy particular, localizado en la zona Sur y Este de Granada. Para realizar la caracterización genética de la raza y definir su perfil genético se analizaron 21 marcadores microsatélites recomendados a nivel internacional por la International Society of Animal Genetics (ISAG). Se amplificaron los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos obtenidos mediante la PCR se separaron mediante electroforesis en un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realizó mediante los programas informáticos Genescan Analysis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños. Se realizaron análisis de heterocigosidad, Fis, análisis multivariable y test de estructura genética y asignación. Todos los microsatélites analizados han resultado muy informativos, excepto en el caso de ETH10, cuyo PIC está por debajo de 0,30. La raza ovina Lojeña muestra una alta variabilidad, con más de 12 alelos por locus, comparado con otras razas ovinas con entre 6 y 9 alelos por locus; el valor de He fue de 0,738 y la Ho de 0,684. Se observa que la raza Lojeña está estructurada encontrándose al menos dos subpoblaciones bien definidas, el motivo por el cual encontramos esta estratificación en la población no está claro, aunque una posible razón es lo escarpado de la zona, que puede dar lugar a aislamiento entre rebaños. Se está llevando a cabo un plan de conservación y gestión genética de la raza para evitar consanguinidad y cruces indiscriminados.

Introducción

La oveja Lojeña, también llamada “Rabada” o “Rabuda” porque conserva su cola, es una población abierta que se cría en la región de Loja, que consiste en seis municipios comprendidos en la provincia de Granada (Andalucía, España). Está registrada en el Libro Genealógico desde el año 2007 y tiene su propia asociación ganadera, además de ser considerada una raza en peligro de extinción. El censo de ganado ovino en la zona es de unas 68.000 cabezas, de las cuales se estima que sólo un 10% se pueden caracterizar como Lojeña. En el año

2007 fue también incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado Español. Esta raza vive en libertad en las montañas, pastando sin ninguna barrera, esta característica hace posible el cruce entre diferentes rebaños.

Esta zona es muy particular, es una zona muy escarpada, con muchas rocas y pocos árboles dispersos, además de disponer de pastos escasos. El ovino Lojeño está muy bien adaptado a este entorno, debido a la conformación de sus patas y a su esbeltez, que las hace capaces de pastar en este entorno sin peligro de verse atrapadas en las oquedades de las montañas. También están muy bien adaptadas a alimentarse en condiciones de escasez de alimento. La característica más distintiva de la raza Lojeña es la extraordinaria calidad de su carne, por la alimentación de sus rebaños y la alta calidad del agua que consumen, todo ello parte de la herencia cultural y genética de esta área.

Los marcadores microsatélites han mostrado su utilidad para el análisis de la diferenciación genética entre poblaciones de ovino, así como en la toma de decisiones para la conservación de los recursos zoogenéticos (Gutiérrez-Espeleta et al., 2000; Saitbekova et al., 2001; Tomasco et al., 2002; Rendo et al., 2004; Peter et al., 2005; Paiva et al., 2005). Aquí se describen los análisis realizados con marcadores microsatélites que se llevaron a cabo para esclarecer la estructura genética de la población de ovino Lojeño y su relación con otras razas de ovino españolas.

Material y métodos

Se obtuvieron 679 muestras de sangre de todas las ganaderías incluidas en el Libro Genealógico. Se utilizó un panel de 21 microsatélites recomendados a nivel internacional por la International Society of Animal Genetics (ISAG): BM1824, BM6506, BM8125, CSRD247, CSSM66, D5S2, ETH10, ETH225, HSC, INRA063, MAF065, MAF209, McM527, OarCP20, OarCP34, RM006, SPS115, TGLA053, TGLA122 y TGLA126. Se amplificaron los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el método utilizado por Martínez et al. (2000). Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las frecuencias alélicas, heterocigosidad, y parámetros de diferenciación, se calcularon mediante el software Genetix v. 4.05 (Belkhir et al., 2000). El análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg fue realizado mediante el método de Guo y Thompson (1992) utilizando el software GENEPOP v. 3.1c (Raymond and Rousset, 1995). El análisis D_A de distancias genéticas (Nei et al., 1983; Takezaki y Nei, 1996) se calculó usando el software Populations 1.2.28 (Langella, 2002). Se construyó un árbol de distancias genéticas utilizando las distancias genéticas D_A y se representó gráficamente con el software TreeView (Page, 1996). El análisis de asignación individual a poblaciones se realizó usando el software Structure v.2.0 (Pritchard et al., 2000), se ha realizado con 100.000 iteraciones de Burn-in y con número de iteraciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 200000. Se hicieron iteraciones desde $K=2$ hasta un máximo de $K=7$. Para inferir el valor K más probable se utilizó el programa Structure Harvester (Earl et al. 2012).

Resultados y discusión

Variabilidad de la Lojeña

Todos los microsatélites analizados resultaron muy informativos y polimórficos, excepto ETH10 que resultó muy poco polimórfico en todas las poblaciones estudiadas.

En general, la mayor parte de las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg para la mayoría de los locus analizados, salvo algunas excepciones puntuales. En el caso de la Lojeña, se ha encontrado desequilibrio en los locus D5S2, TGLA122 y ETH 225.

Tabla I. Valores de F_{is} , F_{it} , F_{st} y número de alelos por locus en la raza Lojeña (*Fis, Fit, Fst values and number of alleles per locus in Lojeña breed.*)

	FIS	FIT	FST	Numero de alelos por locus
Media	0,103	0,164	0,066	12,476

Los valores de F_{is} , F_{it} y F_{st} (Tabla I) muestran resultados variables según el locus analizado. Los datos de F_{is} muestran una población mayoritariamente panmíctica, aunque los resultados de los locus BM8125 y ETH10 dan indicios de un déficit de heterocigotos, lo que sugiere una posible subdivisión de la población (efecto Wahlund).

Los valores medios de los estadísticos F fueron los siguientes: $F_{is}= 0,1046$, $F_{it}= 0,1641$ y $F_{st}= 0,0663$. El valor medio de F_{is} da una idea de la calidad del muestreo y del bajo nivel de consanguinidad de la población ovina lojeña. El valor medio de F_{st} , que evalúa el efecto de la subdivisión en la pérdida de la variabilidad, sugiere que, aun habiendo encontrado indicios de subdivisión poblacional, la raza lojeña es bastante homogénea en su conjunto: el 6,63% de la variabilidad total se explica por las diferencias entre rebaños (parece haber flujo genético entre subpoblaciones, bastante lógico por otro lado, puesto que su vida transcurre en libertad y se mueven de un sitio a otro sin ningún tipo de barrera).

La Tabla II muestra el tamaño muestral, el número medio de alelos, la heterocigosidad (observada y esperada) y los valores de F_{is} para cada población estudiada (con un intervalo de confianza del 95%). Se detectaron un total de 295 alelos en los 21 microsatélites analizados. La media de los alelos fue de 8,31, siendo el mínimo de 6, hallado en el Merino Precoz, y el máximo de 12,48, hallado en la Lojeña, raza objeto de nuestro estudio, lo que nos muestra que tiene mucho polimorfismo. La H_o también es alta en la Lojeña, la más alta de todas las razas estudiadas, lo que nos confirma su diversidad genética.

Se pueden notar ligeros desequilibrios del HWE ($p < 0,05$), pues en todas las razas $H_e > H_o$, siendo bastante acusado en el caso de la Lojeña ($H_e=0,738$; $H_o=0,684$).

Los datos de F_{is} nos muestran una población muy cercana a la panmixia, es el caso más claro, después del Merino Precoz, según los datos de los que disponemos para el presente estudio.

La Tabla III muestra el cálculo de distancias basado en la D_A de Nei, donde se hace notar la diferencia entre las razas merinas y el resto de razas analizadas, se hace patente su diferenciación. Los datos de esta tabla se muestran de forma gráfica en el árbol de distancias de Nei, en la Figura 1. Aunque el árbol de distancias de Nei tiene una topología estrellada, podemos observar cuatro divisiones, que agrupan LOJA y CHU en una de las ramas, MEN y MALL en otra, y las razas merinas y RM juntas y SEG solo en otra rama. Las razas merinas (MER y MP) aparecen diferenciadas y bastante alejadas (sus respectivas ramas son más largas), lo que apoya el resultado obtenido en el análisis con el programa STRUCTURE.

Las razas Mallorquina y Menorquina se agrupan en una de las ramas, probablemente debido a su aislamiento geográfico, pues se localizan en las Islas Baleares. Lo mismo se podría decir de la Roja Mallorquina, que forma una rama independiente, pues está sujeta al mismo fenómeno por su localización también en las mencionadas Islas.

Estructura poblacional

Se ha realizado un análisis de la estructura de la población con el programa STRUCTURE v. 2.1 (Pritchard et al. 2000). Dicho programa permite realizar un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en un diferente número de clusters (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene.

En la figura 2 se presenta gráficamente la estructura poblacional de la raza Lojeña utilizando el programa Structure v 2.1. Cada individuo se muestra en una barra vertical y cada color representa la proporción del cluster correspondiente (raza en este caso) en forma proporcional. La raza Lojeña se compara con seis razas (Roja Mallorquina, Menorquina, Merino Precoz, Merino, Segureño y Churra).

Cuando se asume la existencia de dos poblaciones ancestrales ($K=2$), se diferencia la oveja Lojeña, mostrando el resto de razas un fondo genético común. Cuando se asume que existen tres poblaciones ancestrales ($K=3$) se diferencian la raza Lojeña (en verde) y el Merino (azul). Cuando $K=6$ se observa una agrupación de las razas baleares (aisladas geográficamente de las ibéricas), y aparecen diferenciadas las razas merinas (Merino y Merino Precoz). También se comienza a hacer patente la subdivisión de la Lojeña en distintos subgrupos, observamos estratificación en esta población. Puede observarse en la Figura 2 que el ovino Lojeño es una población heterogénea, esperable dadas las características de esta raza, y se puede ver la subdivisión en al menos tres subgrupos. Esto se puede observar más claramente cuando $K=7$, donde se diferencian claramente todas las razas y se empieza a detectar una cierta subestructura de la población del ovino Lojeño: se observa que existen cuatro grupos de animales diferentes, aunque hay algunos que son mezcla de un quinto tipo, posible influencia de cruces con razas exóticas como Fleischaf, Landschafs u otras razas de mejor aptitud carnífera (Herrera. M, 2007). Para intentar esclarecer estas diferencias entre los individuos de la raza Lojeña se introducen otras razas de oveja. Algunas de estas razas no han tenido ninguna influencia en la Lojeña, como es el caso de la Roja Mallorquina, el Merino Precoz o el Merino, pero otras razas sí que parece que han podido influir en la Lojeña, como el Segureño o la Churra y es detectable observando la estructura poblacional.

Tabla II. Variabilidad en distintas razas ovinas españolas (*Variability of different Spanish sheep breeds*)

Población	Tamaño muestral	Loci analizados	He	Ho	Número medio de alelos/locus	Fis
RM	50	21	0,704±0,033	0,597±0,015	7,52±2,79	0,15329 (0,09525 - 0,19176)
MEN	43	21	0,710±0,038	0,616±0,016	7,57±2,27	0,13349 (0,07496 - 0,17086)
MP	38	21	0,686±0,036	0,674±0,016	6,00±2,24	0,01748 (-0,04028 - 0,04625)
MER	44	21	0,655±0,041	0,600±0,016	6,62±2,97	0,08431 (0,02206 - 0,12312)
SEG	49	21	0,739±0,033	0,644±0,015	8,43±3,19	0,12999 (0,08515 - 0,15475)
CHU	46	21	0,739±0,032	0,645±0,015	9,57±3,28	0,12889 (0,07925 - 0,15577)
LOJA	409	21	0,738±0,026	0,684±0,005	12,48±3,98	0,07312 (0,05883 - 0,08366)
Media	97	21	0,710±0,034	0,637±0,014	8,31±2,96	0,1029

Heterocigosidad esperada, desviación estándar de He, Heterocigosidad Observada, desviación estándar de Ho y Fis (con un intervalo de confianza del 95%) de las poblaciones estudiadas. (RM: roja mallorquina; MEN: menorquina; MP: merino precoz; MER: merino; SEG: segureño; CHU: churra; LOJA: lojeña).

En la figura 3, se muestra una representación gráfica de los cálculos realizados mediante el programa Structure Harvester (Earl et al. 2012), que nos muestra la adecuación de los resultados obtenidos con el programa Structure. En la Figura 3 se infiere que el valor más probable de K que mejor encaja con nuestros datos es K=6, que es el que tiene menor fluctuación (una desviación estándar más pequeña).

Tabla III. Cálculo de las distancias de Nei (1978) [*Nei distances*]

	RM	MEN	MP	MER	SEG	CHU	LOJA
RM	0,000	0,143	0,257	0,224	0,157	0,126	0,135
MEN	0,143	0,000	0,266	0,254	0,126	0,086	0,138
MP	0,257	0,266	0,000	0,309	0,220	0,255	0,274
MER	0,224	0,254	0,309	0,000	0,217	0,191	0,203
SEG	0,157	0,126	0,220	0,217	0,000	0,091	0,093
CHU	0,126	0,086	0,255	0,191	0,091	0,000	0,111
LOJA	0,135	0,138	0,274	0,203	0,093	0,111	0,000

(RM: roja mallorquina; MEN: menorquina; MP: merino precoz; MER: merino; SEG: segureño; CHU: churra; LOJA: lojeña)

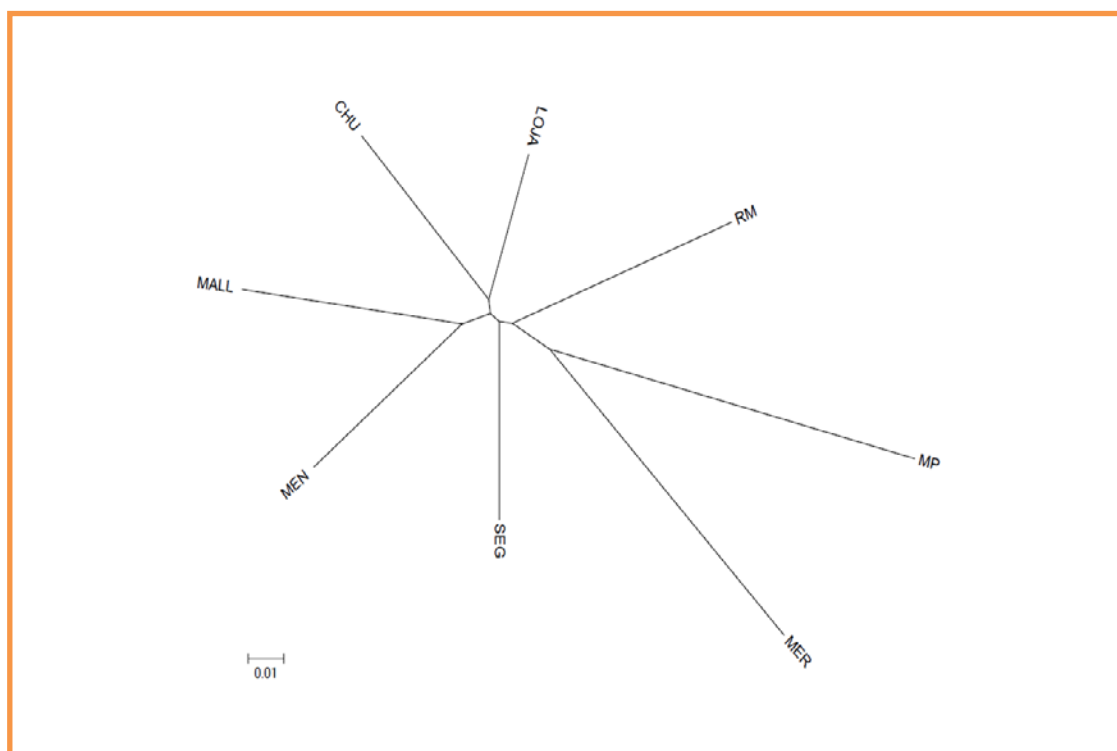


Figura 1. Árbol de distancias de Nei. (RM: roja mallorquina; MEN: menorquina; MP: merino precoz; MER: merino; SEG: segureño; CHU: churra; LOJA: lojeña) [*Nei distances tree*]

Conclusiones

Desde una perspectiva genética, se puede concluir que la raza Lojeña se encuentra claramente diferenciada del resto de razas analizadas, aunque se puede vislumbrar influencia de razas exóticas en su genoma, muy probablemente para mejorar su aptitud cárnica y su conformación. Hay que destacar la alta variabilidad de esta raza (pese a su reducido censo, de 680 cabezas), en la que hemos encontrado estratificación, sin que, por el momento, quede claro el motivo de la misma. La población ovina Lojeña es de gran importancia para la región granadina de Loja tanto a nivel económico, como en lo que respecta al patrimonio genético y cultural del lugar. Es por estas razones por las que se está llevando a cabo un plan de conservación y gestión de esta raza para evitar cruces indiscriminados y conservar su acervo genético.

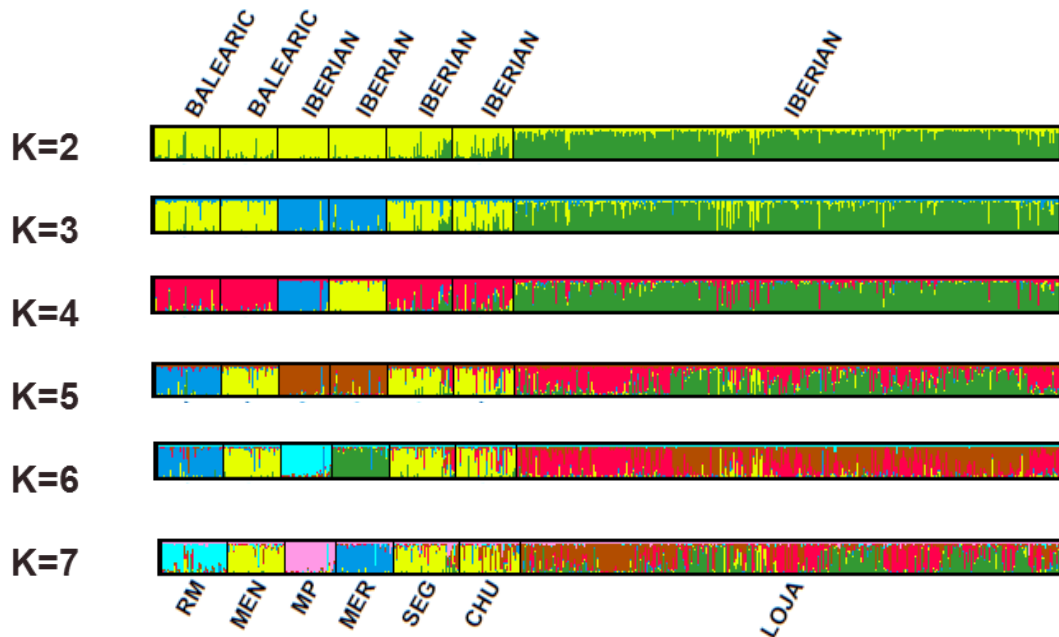


Figura 2. Estimación de la estructura poblacional de distintas razas ovinas españolas (RM: roja mallorquina; MEN: menorquina; MP: merino precoz; MER: merino; SEG: segureño; CHU: churra; LOJA: lojeña)
 [Estimation of the population structure of different Spanish breeds]

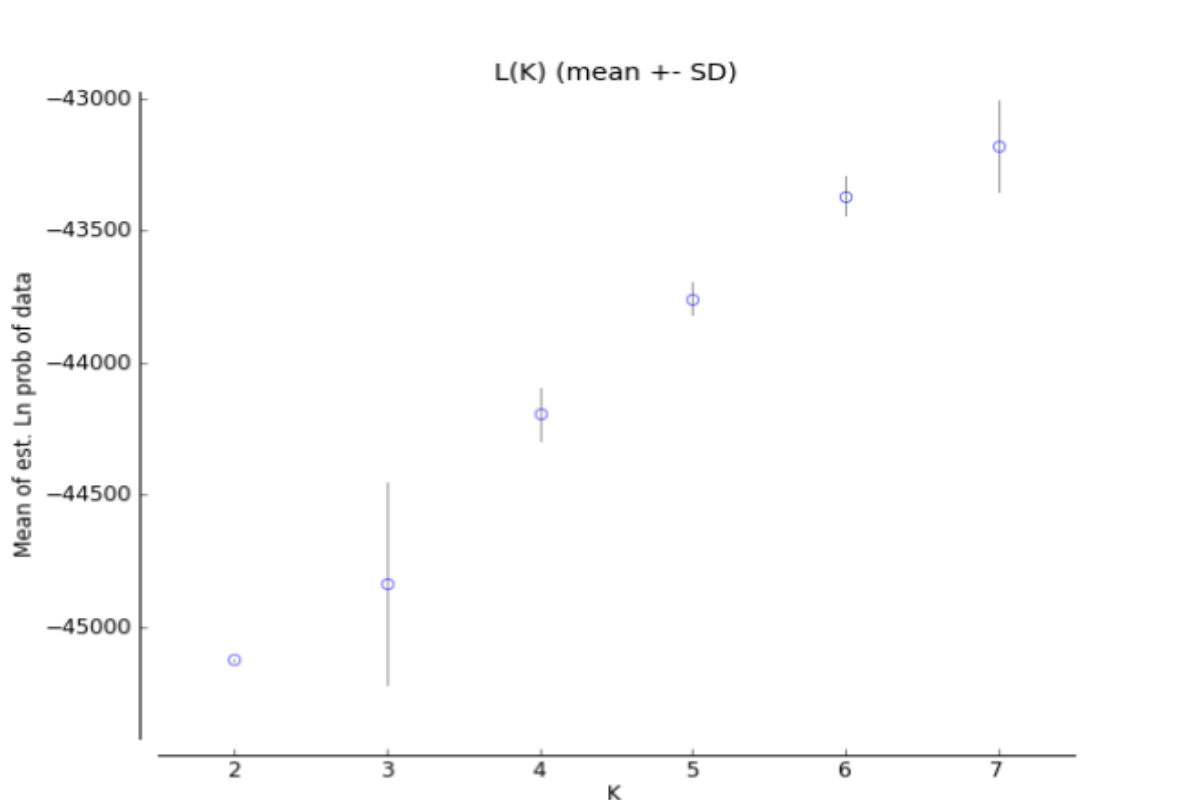


Figura 3. Cálculo y Desviación Standard de los distintos valores de K (Calculation and Standard Deviation of the different K values)

Bibliografía

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Goudet, J., Bonhomme, F., 2000. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Diez-Tascón, C., Littlejohn, R.P., Almeida, P.A.R., Crawford, A.M., 2000. Genetic variation within the Merino sheep breed analysis of closely related populations using microsatellites. Anim. Genet. 31:243-251.

- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7 Core version: vA.1 March 2012 Plot version: vA.1 November 2012 Web version: v0.6.93 November 2012
- Emiliano Lasagna, Vincenzo Landi, Matteo Bianchi, Amparo Martínez Martínez, Francesca Maria Sarti. Genetic characterization of Appenninica sheep breed by microsatellites. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8 (Suppl. 2), 96-98, 2009.
- FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. URL <http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>
- FAO, 2004. Secondary Guidelines for development of natural farm animals genetic resources management plans: measurement of domestic animal diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers, Home page address <http://dad.fao.org>.
- Gonzalez, A., Herrera M. y Rodero E. FEAGAS. La Raza Ovina Lojeña I: Estado Actual.
- Herrera, M. 2002. Criterios Etnozootécnicos para la definición de poblaciones animales. *Actas V Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales*. Ed. INIA. Madrid. p.p. 41-48.
- Herrera, M. 2007. Raza ovina Lojeña. *Copistería D. Folio*. Córdoba.
- J. Quiroz , A.M. Martinez , L. Zaragoza , R. Perezgrovas , J.L. Vega-Pla , J.V. Delgado. Genetic characterization of the autochthonous sheep populations from Chiapas, Mexico. *Livestock Science* 116 (2008) 156–161.
- Langella, O., 2002. Populations 1.2.28. www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php#ancr_bibliographie.
- Martinez, A.M., Delgado, J.V., Rodero, A., Vega-Pla, J.L., 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Anim. Genet.* 31, 295–301.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Simone Ceccobelli, Emiliano Lasagna, Vincenzo Landi, Amparo Martínez Martínez, Francesca Maria Sarti. Genetic diversity and relationships among Italian Merino derived breeds assessed by microsatellites. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8 (Suppl. 3), 83-85, 2009.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389–399.
- Weir, B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.