

INFORME SOBRE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN
LA OVEJA OJINEGRA EN COLABORACION CON
AGROJI (Asociación de Ganaderos de Raza *Ojinegra*)



Universidad
Zaragoza

Zaragoza, 30 de Octubre de 2018

M. Teresa Tejedor Hernández

Luis V. Monteagudo Ibáñez.

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

1. INTRODUCCIÓN

El presente informe resume los resultados del análisis de 19 marcadores genéticos microsatélites del panel propuesto por la ISAG (Sociedad Internacional de Genética Animal) en 777 muestras sanguíneas remitidas por los servicios veterinarios de AGROJI en Junio de 2018 (tubos al vacío con anticoagulante EDTA). El trabajo se enmarca dentro de las tareas del Plan de Conservación y Mejora de la referida raza. Se centra en la identificación de los progenitores de los ejemplares ahora estudiados por primera vez entre los que fueron analizados en temporadas anteriores. En conjunto se han analizado hasta la fecha 3.094 ejemplares.

2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS E INCIDENCIAS OBSERVADAS

En cada ganadería, según los datos remitidos por AGROJI, se señala la identidad de los individuos.

Se recibieron en esta tanda 777 muestras de las siguientes ganaderías:

GANADERO	Nº MUESTRAS
JOSE LUIS GASCON	66
JOSE JOAQUIN ORTA	13
CARLOS BELLES	50
CARMELO BELLES	102
CARLOS BELLES	102
AGROPECUARIA SOLER	191
SANTIAGO GARCIA	50
JOSE ANTONIO GARCIA	50
HERMANOS GARCIA CARCELLER	49
MANUEL MONFIL MATEO	2
ELISEO MATEO	102

TOTAL.....777

La ganadería de D. Manuel Monfil Mateo participa por primera vez en este tipo de actividad.

Las únicas **incidencias reseñables** en las muestras son:

a-La presencia de cuatro animales que muestran más de dos alelos en alguno de los marcadores, lo que sugiere mezcla de muestra (muy improbable) o

presencia de anastomosis vasculares placentarias en caso de partos gemelares (la causa habitual de este fenómeno). Debe señalarse que la existencia de estas anastomosis suele afectar a los tejidos hematopoyéticos y leucopoyéticos, por lo que a lo largo de toda su vida, cada mellizo mantendrá en su sangre células propias y de su hermano, persistiendo esta dificultad. En caso de necesidad, puede recurrirse para la identificación de cada individuo a la extracción de DNA de folículos pilosos, en los que generalmente no se manifiestan los efectos de las anastomosis placentarias. Se trata de los siguientes ejemplares:

- Hembra A0040000724021000907609 (tubo OV#0028).
- Hembra A0040000724021000972651 (tubo OV#0163).
- Hembra A0040000724021000981120 (tubo OV#210)
- Macho A0040000724021000922321 (tubo OV#285)

Los dos primeros pertenecen a la ganadería de D. Carmelo Bellés y los dos últimos a la de D. Eliseo Mateo. Estos cuatro ejemplares deben eliminarse del estudio en tanto en cuanto no se disponga de las lecturas correctas de los 19 marcadores.

b-Se detectan en laboratorio discordancias entre el sexo que figura en los listados y los resultados del análisis de DNA de dos ejemplares.

-En el caso de la ganadería “Agropecuarias Soler”, la muestra del Animal A0040000724021000974579 (tubo KALFL322) figura en los listados como hembra, pero el análisis de DNA determina la presencia del cromosoma Y en la muestra.

-En el caso de la ganadería de D. Carmelo Bellés, la muestra del animal A0040000724021000907625 (tubo OV#0044) también figura en los listados como hembra, determinando el análisis de DNA la presencia del cromosoma Y.

Este tipo de incidencia merece por nuestra parte una atención especial. Debería en primer lugar descartarse cualquier error en la interpretación de los listados. De no haber errores de ese tipo, el caso de las hembras que muestran dotación XY podría ser reflejo de una situación de anastomosis placentaria con un supuesto mellizo macho. En tal caso, muchas de estas hembras pueden en su vida adulta mostrar intersexualidad, con comportamiento masculino y total esterilidad (síndrome de Free-Martin). Sería

importante controlarlas y comprobar su registro reproductivo y su comportamiento (de micción, sexual y de competencia con otros machos) para eliminarlas en tal caso.

3. METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS GENÉTICO DE LA POBLACIÓN

Para el análisis genético-poblacional de los datos, se usaron los siguientes programas: GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al., 1996-1998) y CERVUS 2.0 (Marshall et al., 1998).

4. RESULTADOS

4.1. Descripción general de la variabilidad genética.

Como ya se ha señalado, se han analizado 19 marcadores microsatélites en los ejemplares recibidos años sucesivos (algunas muestras se encontraron degradadas o con problemas típicos de las anastomosis placentarias ya mencionadas). Los datos de variabilidad para cada uno de los loci, tal y como se calculan a partir de los datos de la totalidad de individuos estudiados hasta la fecha se muestran en la Tabla I:

Tabla I. Indicadores básicos de Variabilidad en cada marcador a partir de los datos acumulados en los años de controles.

Locus	k	N	Hobs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
Locus1	8	2966	0.616	0.622	0.571	0.787	0.624	0.446	0.194	0.487
Locus2	29	2966	0.914	0.914	0.908	0.294	0.172	0.048	0.013	0.296
Locus3	15	2966	0.808	0.814	0.790	0.537	0.363	0.182	0.059	0.358
Locus4	13	2966	0.842	0.853	0.837	0.452	0.290	0.122	0.037	0.333
Locus5	16	2966	0.886	0.884	0.874	0.374	0.230	0.080	0.024	0.314
Locus6	11	2966	0.735	0.740	0.706	0.653	0.471	0.277	0.101	0.405
Locus7	2	2966	0.160	0.163	0.149	0.987	0.925	0.867	0.714	0.847
Locus8	10	2966	0.747	0.741	0.710	0.646	0.463	0.266	0.098	0.404
Locus9	12	2966	0.775	0.775	0.747	0.600	0.419	0.228	0.079	0.382
Locus10	13	2966	0.855	0.856	0.840	0.448	0.286	0.120	0.037	0.331
Locus11	9	2966	0.625	0.634	0.594	0.767	0.592	0.400	0.174	0.476
Locus12	17	2966	0.751	0.750	0.723	0.627	0.443	0.243	0.089	0.397
Locus13	15	2966	0.849	0.862	0.848	0.432	0.274	0.111	0.033	0.327
Locus14	11	2966	0.614	0.610	0.585	0.773	0.587	0.377	0.177	0.489
Locus15	18	2966	0.680	0.684	0.639	0.714	0.543	0.348	0.145	0.444
Locus16	8	2966	0.696	0.692	0.637	0.728	0.562	0.385	0.150	0.441
Locus17	9	2966	0.695	0.686	0.645	0.717	0.540	0.347	0.140	0.442
Locus18	10	2961	0.609	0.627	0.573	0.776	0.616	0.435	0.193	0.485
Locus19	12	2966	0.769	0.772	0.738	0.615	0.437	0.251	0.086	0.386

Número de individuos: 2966

Número de loci: 19

Número medio de alelos por locus (k): 12,526

Heterocigosidad media esperada: 0,7201

Contenido informativo del Polimorfismo medio (PIC): 0,6902

Probabilidad combinada de no exclusión del primer progenitor (**NE-1P**): 0,00006689

Probabilidad combinada de no exclusión del segundo progenitor cuando se conoce el genotipo del primero (**NE-2P**): 0,00000012

Probabilidad combinada de no exclusión de una pareja de progenitores incorrecta (**NE-PP**): 1,36E-0012

Probabilidad combinada de identidad entre dos individuos no emparentados (**NE-I**): 1,288 E-0020

Probabilidad combinada de identidad entre dos hermanos **NE-SI**: 0,00000005

Estos valores son esenciales para comprender la validez de nuestro trabajo, especialmente en lo que respecta a la potencia total de exclusión de un progenitor erróneo cuando no hay información disponible sobre el otro (**NE-1P**). El valor alcanzado, de 0,00006689 nos indica la probabilidad de no detectar que un determinado semental no es el padre de un cordero determinado, aun cuando no se disponga de la identidad de la madre ni de datos de la misma. Menor de siete de cada 100.000 situaciones de este tipo se esperaría que pudieran escapar al control que permite este panel de microsatélites en esta población. En caso de conocerse al primer progenitor (en general, la madre), el margen de error es prácticamente inexistente, situándose en 10^{-7} . Como lo es

la probabilidad de confundir a un animal con otro individuo no emparentado, que está en el orden de 10^{-20} . Incluso un hermano tiene una probabilidad de ser confundido con otro de 5 entre 100 millones.

Los valores referidos únicamente a los animales analizados este último año, una vez descontados los reflejados en el apartado de incidencias, se resumen en la Tabla II.

Tabla II: Descripción general de los niveles de variabilidad observados a partir de los animales analizados en la última campaña (se descuentan los cuatro ejemplares con lecturas múltiples).

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
Locus1	6	773	0.603	0.603	0.557	0.799	0.632	0.450	0.203	0.500
Locus2	24	773	0.920	0.914	0.907	0.296	0.173	0.049	0.014	0.297
Locus3	14	773	0.809	0.813	0.787	0.540	0.366	0.185	0.060	0.359
Locus4	12	773	0.825	0.839	0.821	0.480	0.313	0.138	0.044	0.342
Locus5	16	773	0.886	0.881	0.870	0.382	0.236	0.083	0.025	0.316
Locus6	11	773	0.761	0.756	0.723	0.632	0.451	0.259	0.092	0.395
Locus7	2	773	0.158	0.158	0.146	0.987	0.927	0.870	0.721	0.851
Locus8	9	773	0.796	0.757	0.726	0.628	0.446	0.252	0.090	0.394
Locus9	11	773	0.770	0.779	0.752	0.592	0.412	0.220	0.076	0.380
Locus10	13	773	0.856	0.864	0.849	0.429	0.271	0.110	0.033	0.326
Locus11	9	773	0.658	0.648	0.604	0.759	0.586	0.399	0.168	0.468
Locus12	15	773	0.726	0.740	0.714	0.639	0.454	0.251	0.094	0.404
Locus13	13	773	0.850	0.859	0.843	0.442	0.282	0.117	0.035	0.330
Locus14	10	773	0.661	0.644	0.616	0.744	0.559	0.350	0.154	0.467
Locus15	16	773	0.697	0.692	0.650	0.704	0.531	0.334	0.137	0.438
Locus16	7	773	0.723	0.712	0.661	0.703	0.533	0.352	0.133	0.428
Locus17	9	773	0.702	0.695	0.653	0.709	0.533	0.341	0.135	0.436
Locus18	10	773	0.605	0.621	0.573	0.778	0.613	0.426	0.192	0.488
Locus19	10	773	0.761	0.772	0.738	0.614	0.435	0.248	0.085	0.386

Número de individuos: 773

Número de loci: 19

Número medio de alelos por locus (k): 11,421

Heterocigosidad media esperada: 0,7236

Contenido informativo del Polimorfismo medio (PIC): 0,6942

Probabilidad combinada de no exclusión del primer progenitor (NE-1P): 0,00006238

Probabilidad combinada de no exclusión del segundo progenitor cuando se conoce el genotipo del primero (NE-2P): 0.0000001

Probabilidad combinada de no exclusión de una pareja de progenitores incorrecta (NE-PP): 1,096-0012

Probabilidad combinada identidad entre dos individuos no emparentados (NE-I): 9,4-0021

Probabilidad combinada de identidad entre dos hermanos NE-SI: 0.00000004

Como se puede apreciar, incluso teniendo en cuenta sólo los animales estudiados en el último periodo, la capacidad de exclusión es muy elevada y el PIC global se mantiene superior a 0,699.

4.2. Parejas paterno-filiales compatibles

4.2.1. Consideraciones previas

Como se puede apreciar en la Tabla I, el marcador número 18 (SPSS113) no ha sido estudiado en todos los ejemplares. El laboratorio externo que ejecuta los análisis tiene al parecer dudas con las lecturas correctas de los genotipos de algunos ejemplares, y en diferentes tandas analizadas por quienes suscriben este informe, está dejando este dato en blanco en diferentes animales. No es el caso de los 773 animales de la tanda de Junio de 2018 de Agroji, pero teniendo en cuenta que se rastrean los progenitores de estos ejemplares entre los analizados con anterioridad, deberá tenerse en cuenta que algunas asignaciones (y exclusiones) de parentesco se basarán en 18 y no en 19 marcadores por este motivo.

Para establecer posibles relaciones paterno-filiales, se ha realizado en primer lugar una asignación “clásica”, basada en la compatibilidad de los alelos de cada marcador entre cada individuo y los posibles progenitores.

En aquellos casos en los que la aproximación clásica proporcionaba más de un progenitor compatible se ha recurrido a procedimientos matemáticos bayesianos (CERVUS) para determinar el progenitor correcto con un grado de certeza suficiente (Marshall et al, 1998). La aplicación de las matemáticas bayesianas que se utiliza en este procedimiento de asignación permite también calcular en términos logarítmicos (verosimilitud) la probabilidad de cada macho candidato compatible de ser el padre biológico de un cordero concreto (“lod score”) así como la diferencia entre la probabilidad de que el padre sea el asignado y de que lo sea el siguiente macho más probable (delta). En las asignaciones confirmadas, este cálculo arroja resultados incontestables en favor de esa combinación progenitor-descendiente.

Hay ejemplares para los que no se ha localizado ningún reproductor susceptible de haberlo engendrado, siendo esta la causa de casi todas las no asignaciones: en aquellos individuos que no figuran en la Tabla III, las incompatibilidades son numerosas y no dejan lugar a ninguna duda.

Otra posibilidad, más remota, es que algún microsatélite haya experimentado inestabilidad en su número de repeticiones en el proceso de meiosis, con lo cual se haya producido una pequeña diferencia de tamaño entre el alelo presente en el progenitor y el que finalmente habría heredado su descendiente.

En los casos en los que hay más de un individuo compatible, además del cálculo bayesiano, **la información adicional disponible en AGROJI puede ayudar a discernir la verdadera relación entre los animales**: nos referimos a las fechas de **alta y baja** en el libro de explotación, al registro de compras y ventas o incluso a la **localización geográfica** de los animales en las fechas de las cubriciones que han originado a cada cordero. Al realizar el análisis **no se ha excluido ningún macho nacido con anterioridad**, ni siquiera los del primer año de estudio. Debe tenerse en cuenta este dato a la hora de interpretar la Tabla III, teniendo en cuenta que la información genética debe complementarse con los datos disponibles en AGROJI sobre cada ejemplar. .

La Tabla III indica en cada línea para cada ejemplar las parejas propuestas paterno-filiales identificadas en el estudio. Además, la última columna señala con el símbolo * los casos en los que existe una diferencia significativa entre el lod score de uno de los progenitores propuestos y el resto. Al existir un elevado número de machos y de hembras analizados, no se ha eliminado ninguno de los ejemplares, al poderse tratar de los dos componentes de la pareja progenitora

4.2.2. Ampliación a los casos en los que hay una sola incompatibilidad.

Como ya se ha indicado, el planteamiento clásico de asignación de parentesco se basa en la compatibilidad locus a locus entre la descendencia y los supuestos progenitores.

No obstante, es posible plantear la valoración de las situaciones en las que se produce un número bajo de incompatibilidades, admitiendo la posibilidad de errores en la tipificación de algún alelo. Por ese motivo, la Tabla IV presenta además los posibles emparejamientos en los se produce incompatibilidad por un único locus.

Obviamente, **las precauciones para admitir este tipo de asignaciones deben ser máximas**, y tener siempre en cuenta cuestiones como el sexo de los ejemplares, su ubicación física en la época de montas. Como norma general, deberá recurrirse a la Tabla IV únicamente si la Tabla III no proporciona un emparejamiento compatible con los datos disponibles en AGROJI.