

**INFORME SIMPLIFICADO SOBRE LA ESTRUCTURA DE ALGUNAS DE
LAS POBLACIONES DE GALLINAS PERTENECIENTES A SOCIOS DE
AVIGASTER.**

Enero de 2008.

Prof. I. Sierra Alfranca.

Prof. M.T. Tejedor

Prof. L.V. Monteagudo

Facultad de Veterinaria de Zaragoza

INFORME PREVIO.

A. INTRODUCCION

El presente es un informe preliminar redactado a partir de la información genética obtenida mediante el análisis de 7 marcadores de DNA en las muestras biológicas tomadas el 5 de octubre de 2007 en los ejemplares expuestos en la feria de Cedrillas (Teruel), y en las remitidas por AVIGASTER posteriormente.

Por tratarse de la primera aproximación al análisis molecular de estos animales, y a la vista de las observaciones externas realizadas en dicha exposición, hemos considerado esencial en este momento valorar los siguientes aspectos:

- Grado de variabilidad existente. Consanguinidad en los diferentes grupos.
- Grado de similitud o divergencia en los ejemplares de cada propietario.
- Grado de similitud o divergencia entre los grupos de los diferentes propietarios.

Posibles estructuras de población subyacentes.

B. MUESTRAS DISPONIBLES.

En la actualidad se dispone de muestras de 56 ejemplares, que pertenecen a 12 propietarios distintos. El número de ejemplares aportados por cada propietario a la muestra es variable:

- Grupo A (ó 1): D. Jesús Gargallo (Alcalá de la Selva). 6 ejemplares.
- Grupo B (ó 2): D. Rafael Guillén (Cedrillas). 8 ejemplares.
- Grupo C (ó 3): D. Sergio Alegre (Allepuz). 5 ejemplares.
- Grupo D (ó 4): D. Ernesto Alegre (Allepuz). 7 ejemplares.
- Grupo E (ó 5): D. Antonio Marqués (Cedrillas). 8 ejemplares.
- Grupo F (ó 6): D. Demetrio Catalán (Mora de Rábielos). 3 ejemplares.
- Grupo G (ó 7): D. Luis Gómez (Cedrillas). 1 ejemplar.
- Grupo H (ó 8): D. Pablo Alcalá (Mora de Rubielos). 4 ejemplares.
- Grupo I (ó 9): D. Javier Marín (Fortanete). 1 ejemplar.
- Grupo J (ó 10): D. Juan M^a Mallén (Allepuz). 1 ejemplar.
- Grupo K (ó 11): Más de Abajo (Mora de Rubielos). 5 ejemplares.
- Grupo L (ó 12): D. Custodio Gargallo (Aliaga). 5 ejemplares.

Tal y como se puede apreciar, algunos grupos están representados por un solo ejemplar, por lo que es difícil efectuar algunos cálculos, sobre todo en lo referente a

consanguinidad y a estructura de la población. Por motivos de organización laboratorial, un ejemplar del grupo 2 y otro del grupo 5 no fueron analizados.

C. RESULTADOS.

c.1. Niveles de variabilidad. Consanguinidad.

En este caso, el coeficiente F_{IS} es significativo en los grupos 2, 3, 4 y 5. Pero en el caso de los grupos 2 y 5, esta significación puede proceder de la presencia de alelos nulos, por lo que sólo tenemos evidencias de la existencia de consanguinidad global en los grupos 3 y 4 (ver Tabla I)

Tabla I: Descripción de los niveles de variabilidad en cada grupo. Sólo se han tenido en cuenta los grupos en los que hay tres o más ejemplares.

Población	nAlelos	nAlelos únicos	H _O	H _E	F _{IS}	P(0,95)	P(0,99)	N.Medio alelos/locus
1 (n=6)	25	1	0,5714	0,5216	(-) 0,1060NS	0,8571	0,8571	3,5714
2 (n=8)	29[^]	0	0,4286	0,5262	0,1962*	1,0000	1,0000	4,1429
3 (n=5)	28	1	0,5143	0,6635	0,2461*	1,0000	1,0000	4,0000
4 (n=7)	33	3	0,5918	0,6854	0,1471*	1,0000	1,0000	4,7143
5 (n=8)	31[^]	4	0,5000	0,6371	0,2373**	0,8571	0,8571	4,4286
6 (n=3)	11	0	0,3333	0,2571	(-) 0,4000NS	0,5714	0,5714	1,5714
9 (n=4)	23	4	0,6429	0,5765	(-) 0,1368NS	0,8571	0,8571	3,2857
11 (n=5)	13	2	0,2571	0,2984	0,1529NS	0,7143	0,7143	2,0000
12 (n=5)	23	2	0,6095	0,6000	(-) 0,0199NS	1,0000	1,0000	3,2857

[^]: presencia de alelo nulo

La Tabla II (ver en página siguiente) detalla estos valores locus por locus en cada grupo.

Tabla II : Información detallada de cada locus en cada población.

Locus	nAle los	nA.ú nicos	HO	HE	FIS
Población 1 (n=6)					
MCW135	5	1	0,5000	0,6667	0,2683NS
MCW225	4	0	0,8333	0,6515	(-)0,3158NS
MCW276	6	0	1,0000	0,8636	(-)0,1765NS
MCW280	1	0	0,0000	0,0000	(---)
MCW295	2	0	0,1667	0,1667	0,0000NS
LEI31	4	0	0,8333	0,6364	(-)0.3513NS
ADL0142	3	0	0,6667	0,6667	0,0000NS
Población 2 (n=8)					
MCW135	8 [^]	0	0,5000	0,8667	0,4400**
MCW225	5	0	0,6250	0,6083	(-)0.0294NS
MCW276	4	0	0,5000	0,6583	0.2533NS
MCW280	3	0	0,1250	0,2417	0,5000NS
MCW295	3	0	0,3750	0,5417	0.3226NS
LEI31	4	0	0,5000	0,4417	(-)0.1429NS
ADL0142	2	0	0,3570	0,3250	(-)0.1667NS
Población 3 (n=5)					
MCW135	4	0	0,6000	0,7111	0.1724NS
MCW225	5	0	0,4000	0,8222	0.5429*
MCW276	3	0	0,6000	0,6444	0.0769NS
MCW280	3	1	0,4000	0,3778	(-)0.0667NS
MCW295	5	0	0,8000	0,7556	(-)0,0667NS
LEI31	5	0	0,4000	0,8222	0,5429*
ADL0142	3	0	0,4000	0,5111	0,2381NS
Población 4 (n=7)					
MCW135	5	1	0,5714	0,7912	0,2941NS
MCW225	8	0	0,8575	0,9341	0,0886NS
MCW276	3	0	0,4286	0,5824	0,2800NS
MCW280	2	1	0,0000	0,3030	1,0000NS
MCW295	5	0	0,7143	0,7253	0,0164NS
LEI31	7	1	0,8571	0,9231	0,0769NS
ADL0142	3	0	0,7143	0,5385	(-)0,3636NS
Población 5 (n=8)					
MCW135	5 [^]	1	0,2500	0,8929	0.7500*
MCW225	7	1	0,7500	0,8333	0,1064NS
MCW276	6	0	0,6250	0,825	0,2553NS
MCW280	1	0	0,0000	0,0000	(---)
MCW295	3	0	0,6250	0,6583	0,0540NS
LEI31	6	1	0,7500	0,8167	0,0870NS
ADL0142	3	1	0,5000	0,4333	(-)0.1667NS

Tabla II (Contin.)

Población 6						
(n=3)						
MCW135	2	0	0,3333	0,3333	0.0000NS	
MCW225	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
MCW276	2	0	1,0000	0,6000	(-)1,0000NS	
MCW280	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
MCW295	2	0	0,3333	0,3333	0.0000NS	
LEI31	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
ADL0142	2	0	0,6667	0,5333	(-)0.3333NS	
Población 8						
(n=4)						
MCW135	2	1	0,2500	0,2500	0.0000NS	
MCW225	3	0	0,7500	0,6786	(-)0,1250NS	
MCW276	6	2	1,0000	0,9286	(-)0,0909NS	
MCW280	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
MCW295	4	0	1,0000	0,7500	(-)0.4118NS	
LEI31	4	1	0,7500	0,8214	0,1000NS	
ADL0142	3	0	0,7500	0,6071	(-)0.2857NS	
Población 11						
(n=5)						
MCW135	3	0	0,4000	0,6222	0,3846NS	
MCW225	2	1	0,4000	0,3778	(-)0.0667NS	
MCW276	2	1	0,4000	0,5333	0,2727NS	
MCW280	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
MCW295	1	0	0,0000	0,0000	(---)	
LEI31	2	0	0,2000	0,2000	0.0000NS	
ADL0142	2	0	0,4000	0,3556	(-)0.1429NS	
Población 12						
(n=5)						
MCW135	5	1	0,8000	0,8444	0,0588NS	
MCW225	3	0	0,6667	0,6000	(-)0.1429NS	
MCW276	4	1	0,6000	0,5333	(-)0.1429NS	
MCW280	2	0	0,0000	0,3556	1,0000NS	
MCW295	4	0	0,8000	0,7778	(-)0.0323NS	
LEI31	3	0	0,8000	0,6222	(-)0.3333NS	
ADL0142	2	0	0,6000	0,4667	(-)0.3333NS	

^:presencia de alelo nulo

La Tabla III indica los niveles de variabilidad existentes para cada uno de los 7 loci estudiados en el conjunto global de individuos analizados. Los valores de PIC (Contenido Informativo del Polimorfismo) varían entre 0,146 y 0,846. Es de señalar que los loci utilizados demuestran una elevada utilidad para plantear posibles estudios de exclusión de parentesco. Así, para cualquier ejemplar la probabilidad de excluir un falso

progenitor cuando no se conoce al otro es del 96,4%. Pero si se conoce uno de los progenitores, la probabilidad se eleva al 99,6%.

Tabla III. Niveles de variabilidad, PIC y probabilidad de exclusión para cada locus en cada grupo.

Locus	nAlelos	PIC	Excl (1)	Excl (2)
<i>MCW 135</i>	13 [^]	0,796	0,479	0,651
<i>MCW 225</i>	13	0,846	0,566	0,724
<i>MCW 276</i>	13	0,811	0,507	0,676
<i>MCW 280</i>	5	0,146	0,011	0,079
<i>MCW 295</i>	8	0,594	0,234	0,422
<i>LEI 31</i>	11	0,814	0,504	0,674
<i>ADL0 142</i>	4	0,464	0,151	0,272
Global	(---)	(---)	0,964	0,996

[^]:presencia de alelo nulo

c.2. **Relaciones genéticas entre los diferentes grupos.**

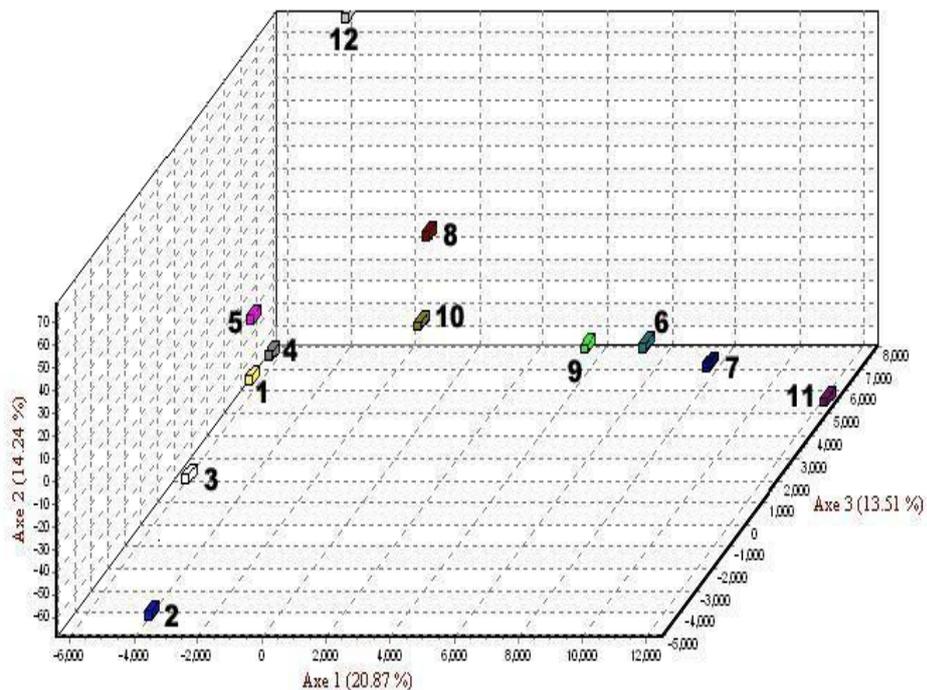
Los valores de F_{ST} reflejados en la tabla IV valoran la diferencia genética entre las poblaciones. Se señalan con uno o con dos asteriscos los valores significativos y altamente significativos, respectivamente.

La semimatriz inferior indica los valores N_m , es decir el número medio de ejemplares intercambiados entre dos grupos en cada generación. Lógicamente, cuando dos poblaciones están muy diferenciadas genéticamente, intercambian pocos o ningún ejemplar en cada generación, y proporcionan valores N_m bajos. Por el contrario, valores altos de N_m señalan contacto entre los grupos, y suelen corresponderse con valores de F_{ST} no significativos, como corresponde a poblaciones que no se diferencian claramente entre sí.

El dato más destacable es que todas las poblaciones parecen diferenciarse significativamente entre sí, con la excepción de los pares 2-3 y sobre todo del 3-4, en el que a una F_{ST} no significativa se une un valor N_m de 999999.0, es decir, un índice teórico de casi un millón de ejemplares intercambiados entre ambos grupos en cada generación. Obviamente, la interpretación real de este N_m es que ambos grupos se comportan como una única población, seguramente por tener un origen común, o por intercambiarse reproductores entre sí de forma habitual.

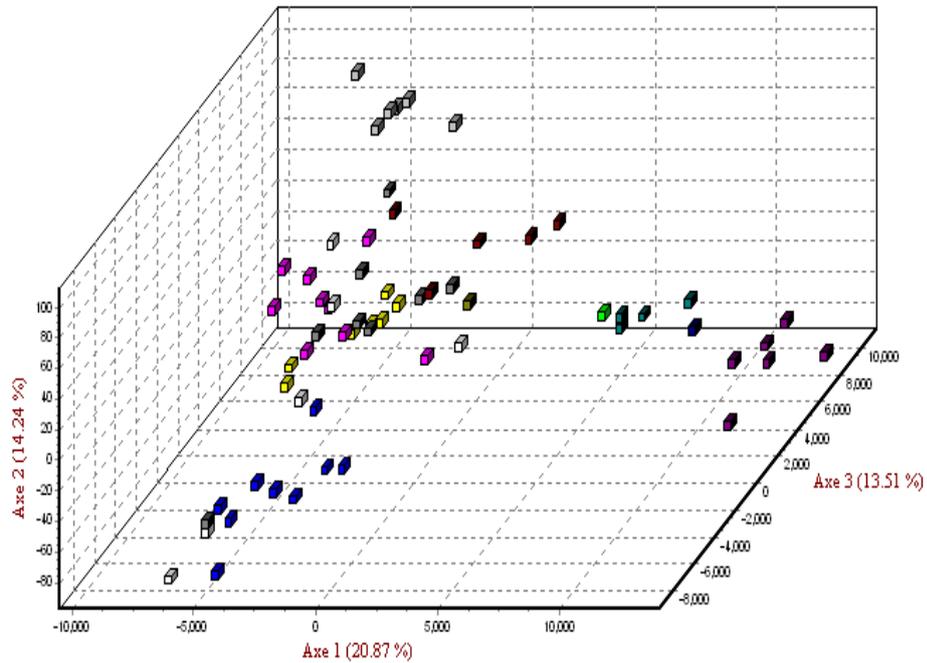
El Análisis de Correspondencias Factoriales (FCA) aporta un enfoque vectorial de las relaciones entre los grupos, o incluso entre todos los individuos de la muestra. La Figura 1 agrupa los individuos de cada grupo en un único punto, y muestra en tres dimensiones la dispersión existente entre los grupos.

Figura 1: Análisis FCA de los diferentes grupos.



La Figura 2 muestra todos los individuos estudiados, aplicando un color común a todos los de un mismo grupo. Llama la atención la nube de puntos que podría englobar a los animales de los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 10, cercana a los ejemplares de los grupos 8 y 12, y relativamente alejada de los de los grupos 6, 7, y, sobre todo, del 11. La máxima distancia se da entre los grupos 11 y 12.

Fig. 2: Análisis FCA de todos los individuos.



Continuando con el análisis individual, la Identidad Genética media entre todos los posibles pares de individuos de un grupo o población nos permite detectar situaciones en las que el grado de parentesco entre individuos es superior al esperable en una población con reproducción al azar. Esta situación (ver Tabla V), indicadora de la posible existencia de reproducción entre individuos emparentados, se da tanto en el grupo 3 como en el 4, que vuelven a dar muestras de ser muy similares entre sí. Por el contrario, no se da ni en el grupo 2 ni en el 5, lo que confirma que no están sometidos a valores elevados de consanguinidad, y puede afirmarse que su elevado valor de F_{IS} se debe a la existencia de alelos nulos. Globalmente, el valor del coeficiente de identidad en el conjunto de los individuos no es significativamente elevado.

El estudio de la varianza del coeficiente de identidad entre los animales aporta otro tipo de información: Varianzas significativamente altas señalan que la población no se reproduce totalmente al azar, sino que existen grupos familiares aislados dentro de ella. Esta situación se da en cuatro de los grupos y, por supuesto globalmente, como cabía esperar de los valores de obtenidos al comienzo de este apartado.

Tabla V: Identidad genética media entre los individuos de cada grupo.

Población	Media	Varianza
1	0,5681	0,1343
2	0,4762	0,1607
3	0,3721**	0,2047*
4	0,3093**	0,1855**
5	0,3698	0,2062**
6	0,9026	0,0449
8	0,4946	0,1065
11	0,7457	0,1156
12	0,5141	0,2088**
Global	0,3104	0,1804**

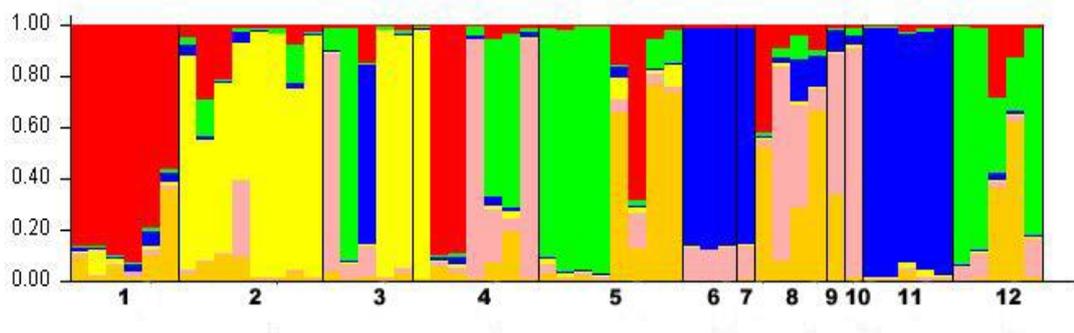
La inferencia Bayesiana sobre la estructura de las poblaciones basada en el software Structure es en la actualidad uno de los métodos más avanzados que se aplican a estas cuestiones. Cada individuo es estudiado por separado, identificándose los posibles “clusters” o agrupamientos entre ellos, es decir, la forma en que parecen agruparse para dar lugar a poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se tiene en cuenta la información existente sobre el grupo de origen de cada animal. La Tabla VI (presentada al final de este informe por su gran tamaño) muestra la distribución de los ejemplares más probable, en 6 clústers, de los que uno carece de individuos asignados. Para clarificar los datos, y aunque esta información no se hubiera tenido en cuenta, se señala cuántos individuos de cada grupo se incorporarían a cada clúster. Cuando un individuo no alcanza un 80% de probabilidad de pertenecer a uno de los clústers, se considera que no está asignado totalmente, sino que es mezcla de varios clústers .

Como se puede apreciar, algunas poblaciones se vinculan claramente a determinados clústers. Muchos de los ejemplares estudiados pueden agruparse en uno de los 5 primeros clústers que se delimitan. Pero hay rastros del cluster 6 en casi todos los grupos, aunque no haya ejemplares con probabilidad superior al 80% de pertenecer al mismo (algunos ejemplares llegan a valores superiores al 70%).

La Figura 3 muestra las asignaciones efectuadas en cada una de las poblaciones. En todo caso, para asignar un individuo a un clúster, su probabilidad de pertenecer a este debe ser mayor o igual al 80%. Como se ve, la asignación es mayoritaria a un

clúster en algunos grupos (véase 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 y 11), lo que encaja con los resultados de anteriores análisis que señalaban claro distanciamiento entre varios grupos. En otros casos, como en las poblaciones 3 y 4, está clara la existencia de individuos asignables a diferentes clusters, lo que podría indicar que existen en los grupos individuos de variado origen. Mención especial merece la población 5, en la que claramente cuatro ejemplares se asignan a un clúster, mientras que los otros cuatro no son objeto de la misma asignación. Tras revisar las fichas de tomas de muestras, se comprueba que tres de estos cuatro últimos animales corresponden al grupo de ejemplares de color blanco y peso ligero propiedad de D. Antonio Marqués, que aparentemente han podido tener un manejo reproductivo aislado de las otras gallinas del mismo propietario.

Figura 3.: Análisis de los clústers detectados en cada grupo.



Son de destacar algunos detalles, que quizá son más claros con la ayuda de la Figura 4, que presenta de otra forma la información recogida en la Tabla VI. De hecho, agrupa los individuos en función de su probabilidad de pertenencia a uno u otro clúster:

- Se observa de nuevo el parecido entre los grupos 3 y 4.

- En el clúster I se asignan cuatro de los animales del grupo 1. Los otros dos tienen probabilidades de asignación al clúster en torno al 60 y 75% respectivamente. Este clúster incluye también dos animales del grupo 4. Un animal del grupo 5 tiene también cierta probabilidad de pertenecer al clúster. La información recogida verbalmente de los propietarios apunta a que las gallinas del grupo 1 pudieran ser las de mayor similitud con el grupo más primitivo. La asignación al clúster parece confirmar de alguna forma cierto aislamiento entre estas gallinas y el resto, aunque algunos ejemplares presentan claras trazas del cluster V y sobre todo del VI, que más adelante se comentarán. La información también debe interpretarse en el sentido inverso: El color

rojo indicativo del cluster 1 se encuentra también incluido en los grupos de otros orígenes, lo que señala que de alguna manera ha intervenido en su formación.

-El clúster II agrupa a la mitad de las gallinas del grupo 5 y a una mayor proporción del grupo 12. También incluye una del 3, además de haber dos animales del 4 con cierta probabilidad de pertenecer a él.

-Los grupos 6, 7 y 11 son muy homogéneos y se encuadrarían básicamente dentro del clúster III. Este resultado concuerda totalmente con el extraído del análisis FCA que se reflejaba en la Figura 2, donde estos grupos se sitúan en posiciones cercanas en la derecha de la gráfica

- El clúster IV incluye animales de los grupos 2, 3 y 4.

- Finalmente el clúster V incluye ejemplares de los grupos 3, 4, y 10.

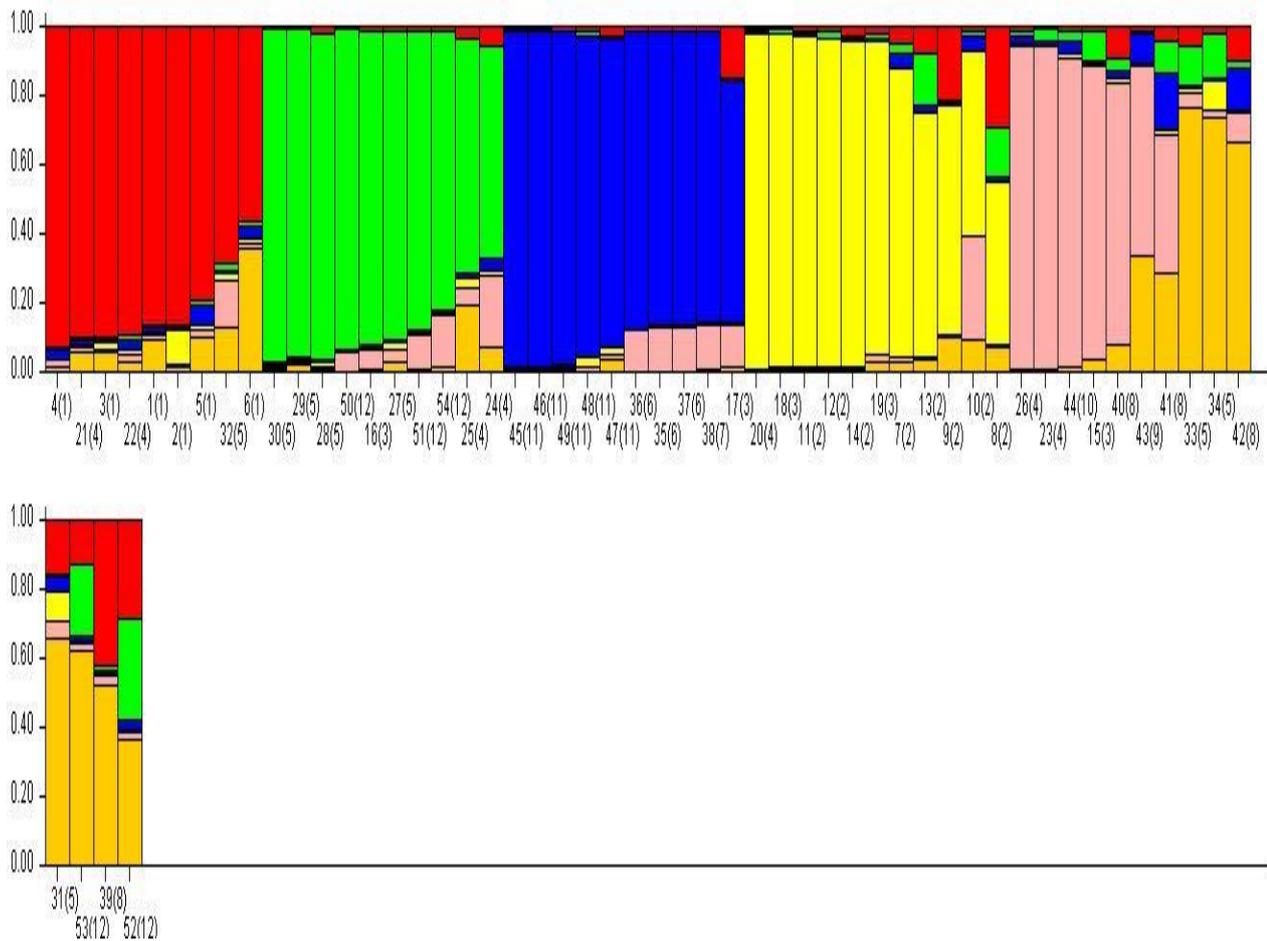
-El grupo 8 no asigna ninguno de sus miembros a ninguno de los clústers. Este hecho puede deberse a un origen mezclado de sus componentes. El único ejemplar del grupo 9 disponible tampoco es asignado.

-Son muy pocos los ejemplares que se asignan a un clúster con una probabilidad del 100% o muy cercana a ella. De hecho, sólo se da este fenómeno en dos ejemplares del clúster III procedentes del grupo 11. Ningún clúster se asocia en exclusiva a una sola población origen de los animales.

-Por lo demás, los individuos no asignados (los 8 últimos) tienen probabilidades inferiores al 80% de pertenecer a uno de los clústers. La gráfica señala a las claras sus probabilidades de pertenecer a cada clúster. Es de señalar que el clúster VI no tiene ejemplares asignados, pero sí algunos con probabilidad de pertenecer al mismo relativamente elevada.

En definitiva, del conjunto del Análisis de Distancias Genéticas, Correspondencias Factoriales y Análisis Bayesiano de Estructura de Población se deduce que, pese a detectarse entre muchos grupos cierta dispersión genética que pudiera proceder del aislamiento reproductivo, la mayor parte de las poblaciones tienen entre sí alguna relación directa o indirecta. Si no se señala por adelantado el origen de los animales y se agrupan en prueba ciega en función de su parecido real, está claro que en en algún momento del pasado pudieron tener cierta relación reproductiva. De hecho, son muy frecuentes los ejemplares con probabilidades no despreciables de pertenecer a dos o más clústers, y hasta a todos los detectados.

Figura 4: representación de todos los individuos en función de su probabilidad de pertenecer a uno u otro clúster.



En lo que se refiere al clúster VI, su presencia en ejemplares de todos los grupos, aún en proporción variable, puede considerarse debida dos posibles orígenes. Pudiera tratarse de trazas de un origen común de todos los grupos estudiados. Pero también puede tratarse de una introgresión relativamente reciente de animales foráneos que pudieran haberse introducido en las granjas procedentes incluso de líneas híbridas comerciales. La venta ambulante de pollitas ponedoras ligeras en la provincia de Teruel en las décadas de los años 60 y 70 del pasado siglo es perfectamente recordada. Clarificar esta cuestión requeriría una comparación con dichas líneas comerciales, sobre todo las derivadas de la gallina Leghorn, que caen fuera de las posibilidades de este estudio preliminar.

RESUMEN DE CONCLUSIONES:

-El coeficiente F_{IS} es significativo en los grupos 2, 3, 4 y 5. Pero en el caso de los grupos 2 y 5, esta significación puede proceder de la presencia de alelos nulos, por lo que sólo tenemos evidencias de la existencia de consanguinidad global en los grupos 3 y 4. El análisis de la identidad genética media confirma estos resultados, descartando la consanguinidad en 2 y 5.

-Con el juego de marcadores de DNA utilizado, la probabilidad de excluir un falso progenitor de un individuo cuando no se conoce al otro es del 96,4%. Pero si se conoce uno de los progenitores, la probabilidad se eleva al 99,6%.

-A la vista de los valores de F_{ST} , todas las poblaciones parecen diferenciarse significativamente entre sí, con la excepción de los pares 2-3 y sobre todo del 3-4, que se comporta en la práctica como una única población. La diferenciación puede deberse a efectos de fundación y también al aislamiento reproductivo entre las mismas.

- El análisis bayesiano de los datos de todos los ejemplares, tomados uno a uno, muestra la existencia de seis clústers de población, ninguno de ellos asociado a un único grupo de ejemplares, aunque sí hay grupos claramente vinculados a uno solo de los clusters (1, 2, 6, 7, 10 y 11).

- Son escasos los ejemplares con probabilidad 100% de pertenecer a uno sólo de los clústers. Por el contrario, muchos de ellos tienen probabilidad no despreciable de pertenecer a dos o más, y hasta a todos los establecidos, lo que indica que subyacen relaciones reproductivas entre ellos, que pudieran proceder de ancestros comunes, pero también de la introgresión de ejemplares de origen foráneo.

- Uno de los clústers (el VI) no tiene ningún individuo asignado, sino que se compone de individuos mezcla de diversos clusters. Su presencia se detecta en la mayoría de los grupos de población, y, como ya se ha señalado, puede deberse a efectos de fundación o de introgresión.

Anexo: Listado de todos los ejemplares muestreados y breve descripción básica de sus características externas en algunos casos.