

INFERENCIA BAYESIANA DE ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL EN LA RAZA BOVINA BLANCA CACEREÑA.

Padilla, J. A.^a, Calero, R.^b, Sansinforiano, M.E.^a, Parejo, J. C.^a, Martínez-Trancón, M.^a, Bartolomé, P.^b, Rabasco, A.^a.

^a Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Campus Universitario s/n. 10071. Cáceres. ^b Censyra. Junta de Extremadura. Ctra de S. Vicente s/n. 06071. Badajoz. jpadilla@unex.es

INTRODUCCIÓN

La utilización de marcadores genéticos altamente polimórficos como los microsatélites se ha generalizado en estudios de diversidad genética y de estructura genética poblacional. El conocimiento de cómo la variación genética está partida entre poblaciones puede tener importantes implicaciones en la biología evolutiva, en la ecología y en el desarrollo de estrategias de conservación.

Las estimaciones convencionales de diferenciación genética entre poblaciones - F_{ST} de Wright (1951) y/o su análogo R_{ST} de Slatkin (1995) - son muy dependientes de las diferentes estrategias de muestreo (espacial o temporal) adoptadas, ignorando si la muestra está estratificada por reciente mestizaje, migración o hibridación (Balloux y Lougon-Moulin, 2002). Por otra parte, los métodos basados en distancias genéticas agrupan a los individuos en árboles filogenéticos, considerando los individuos como unidades taxonómicas operativas (Bowcock *et al.*, 1994). Estos métodos han sido muy utilizados ya que son fáciles de aplicar e intuitivos. Sin embargo, los clusters identificados pueden ser muy dependientes tanto del método de estima de la distancia utilizado, como de la representación gráfica elegida. Además, evaluar el significado estadístico de los clusters, que deben ser identificados visualmente, puede ser problemático (Pritchard *et al.*, 2000).

El reciente desarrollo de metodologías bayesianas (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) ha proporcionado la capacidad de inferir estructura de los datos por la presencia de desequilibrios de HWE y/o de ligamiento, asumiendo que el genotipo de cada individuo es una mezcla al azar de un número de poblaciones diferentes. La población muestreada es subdividida en las diferentes subpoblaciones (tantas como sea posible) que efectivamente agrupen los individuos, y en las que no existan desequilibrios o sean mínimos.

En este trabajo se pretende caracterizar, mediante métodos bayesianos, la estructura genética poblacional de la raza bovina Blanca Cacereña con objeto de adoptar las estrategias de conservación más adecuadas en el Plan de Conservación de la raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado muestras de sangre de 246 animales (67 ♂ y 179 ♀) de raza Blanca Cacereña, procedentes de las cinco ganaderías que constituyeron el actual núcleo de conservación y de seis ganaderías comerciales, y de los que se tenía evidencia molecular de su pureza racial. El ADN fue extraído utilizando el kit *Perfect gDNA Blood Mini* (Eppendorf AG). Todos los animales se genotiparon con los 20 loci microsatélites (Tabla 1) que fueron más polimórficos en los estudios de variabilidad genética realizados en la raza. Los microsatélites se amplificaron en reacciones de PCR múltiple y los amplicones marcados fluorescentemente se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, USA) y se analizaron mediante GeneMapper[®] 3.7.

Las estimaciones del número de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, y los estadísticos F se estimaron mediante el programa GENETIX 4.05.2 (Belkir *et al.*, 2001). La estructura poblacional fue examinada utilizando el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) sin información previa poblacional (suponiendo que todas las muestras pertenecen a una única población), usando 100.000 replicaciones MCMC, después de descartar un período de 10.000, para alcanzar la estacionalidad de la cadena. Dado que la estima del número de subpoblaciones (K) con STRUCTURE, puede depender del modelo utilizado (Falush *et al.*, 2003), hemos corrido varias simulaciones bajo el modelo con mestizaje (con igual y diferente grado de mestizaje, α , para cada población) y

con los modelos de frecuencias alélicas no correlacionadas y correlacionadas (Modelo F) entre las poblaciones. Los valores previos de K se fijaron entre 1 – 6, y se compararon los Ln de la probabilidad de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran el nº de alelos (NA), la heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) y el déficit de heterocigotos (F_{IS}) de cada locus analizado en la raza.

Locus	NA	He	Ho	F_{IS}	Locus	NA	He	Ho	F_{IS}
MM12	7	0,7244	0,7286	-0,006	INRA023	4	0,5213	0,5897	-0,132
HAUT27	5	0,7164	0,8115	-0,133	TGLA53	8	0,4633	0,4274	0,078
HEL5	5	0,6945	0,6955	-0,001	ETH185	3	0,5287	0,6098	0,154
CSSM66	8	0,6791	0,7276	-0,072	BM2113	4	0,4477	0,4735	-0,058
INRA032	7	0,6703	0,7073	-0,055	INRA063	4	0,439	0,449	-0,023
ETH3	5	0,6812	0,6955	-0,021	INRA005	3	0,501	0,5066	-0,011
TGLA122	5	0,6694	0,7231	-0,080	TGLA227	4	0,4435	0,4468	-0,008
HAUT24	5	0,6517	0,7059	-0,083	INRA037	4	0,4431	0,3934	-0,112
BM1818	3	0,6528	0,6157	0,057	BM1824	4	0,4022	0,4303	-0,07
HEL9	6	0,6238	0,6531	-0,047	ETH152	5	0,4445	0,5188	-0,168

Tabla 1. Número de alelos (NA), heterocigosidades esperada (He) y observada (Ho) y el déficit de heterocigotos (F_{IS}) de cada locus analizado en la raza Blanca Cacereña.

En los 246 animales de pura raza analizados hemos encontrado un total de 99 alelos con los 20 loci microsatélites analizados. El nº de alelos por locus varió de 3 – 8, con una media de $4,95 \pm 0,34$ alelos por locus. Las heterocigosis medias esperada y observada fueron de $0,595 \pm 0,025$ y $0,570 \pm 0,026$, respectivamente. El déficit medio de heterocigotos en la población total fue de $-0,045 \pm 0,017$.

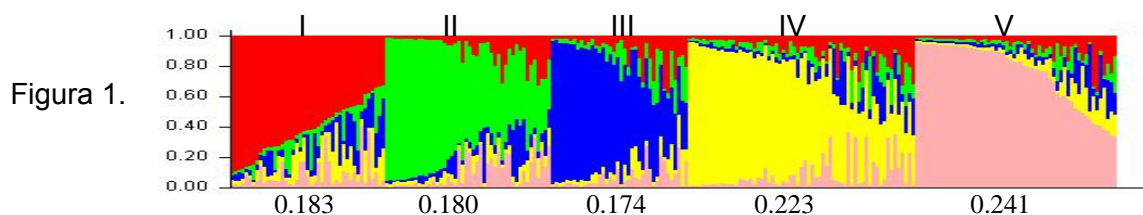
En la Tabla 2 se presenta el resumen de las simulaciones realizadas para inferir el número de subpoblaciones (K) existentes en la raza. Hemos obtenido los mismos resultados en cada uno de los modelos utilizados, las probabilidades de los datos [Ln P(D)] aumentaron hasta K = 5, estimándose 5 subpoblaciones en la raza Blanca Cacereña.

K	MODELOS							
	Frecuencias No correlacionadas				Frecuencias correlacionadas. El "Modelo F"			
	idéntico α en todas las poblaciones		α Individual para cada población		idéntico α en todas las poblaciones		α Individual para cada población	
	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	Ln P(D)	Var[LnP(D)]
1	-9842.0	39.4	-9841.9	39.3	-9843.2	40.5	-9843.0	40.3
2	-9603.5	242.2	-9632.1	270.3	-9588.3	223.3	-9586.4	218.3
3	-9410.5	385.3	-9518.8	536.3	-9402.1	365.1	-9412.3	379.4
4	-9370.2	632.7	-9445.0	726.9	-9334.8	564.2	-9344.9	463.8
5	-9228.8	656.3	-9391.9	904.6	-9276.7	615.6	-9297.7	689.2
6	-9252.0	877.9	-9549.4	1410.2	-9341.9	985.9	-9332.8	839.2

Tabla 2. Inferencia del número de subpoblaciones (K) existentes en la raza Blanca Cacereña con los modelos de frecuencias correlacionadas y no correlacionadas, con iguales y diferentes grados de mestizaje (α) estimados con el programa STRUCTURE.

El valor de K puede estar sobreestimado por la presencia de alelos nulos, por la existencia de parentesco críptico o por una alta consanguinidad (Falush *et al.*, 2003). En nuestro estudio no hemos detectado alelos nulos en los análisis realizados con el programa Micro-Checker v.2.3.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004). Además, el parentesco es suficientemente conocido, ya que se realizan controles genealógicos desde hace décadas, y por último el nivel de consanguinidad estimado no es suficiente para justificar una sobreestimación de K.

En la Figura 1 se muestra la proporción de afiliación de cada genotipo a cada uno de los 5 cluster encontrados en la población BC analizada, ordenados dentro de cluster.



La Tabla 3 muestra la proporción de individuos de cada ganadería asignados a cada cluster. El superíndice ⁽ⁿ⁾ muestra el número de individuos con una $q_n > 0,8$ (% de procedencia de cada genotipo individual en ese cluster).

Ganaderías	Siglas	Clusters Inferidos					n
		I	II	III	IV	V	
Conservacionistas	CC	0.084	0.137	0.048	0.631⁽⁷⁾	0.100	12
	DX	0.060	0.205 ⁽¹⁾	0.550⁽¹¹⁾	0.138 ⁽²⁾	0.046	25
	EC	0.084	0.051	0.084 ⁽¹⁾	0.144 ⁽¹⁾	0.637⁽²¹⁾	42
	EP	0.126	0.074	0.201 ⁽³⁾	0.400⁽¹²⁾	0.199 ⁽³⁾	47
	SR+P	0.066	0.672⁽¹⁶⁾	0.105	0.073	0.083 ⁽¹⁾	28
Comerciales	ML+BC+FS+O	0.487⁽⁶⁾	0.249	0.070	0.061	0.133	23
	ON	0.289 ⁽²⁾	0.106	0.158	0.225 ⁽⁷⁾	0.222 ⁽⁶⁾	69
Tabla 3.	Total	45	44	43	55	59	246

Estos resultados indican que existe una tendencia de agrupación de los animales según la ganadería de procedencia. En 4 de los 5 cluster se agrupan los animales procedentes de las ganaderías conservacionistas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Parejo *et al.* (2002) con análisis RAPD en esta raza, y a los de Rosenberg *et al.* (2002) en humanos. El modelo F asume que las K poblaciones representadas en la muestra divergieron desde una población ancestral común, y experimentaron diferentes cantidades de deriva. Las ganaderías actuales proceden en su mayor parte de una única población que en los años 70 constituyó el núcleo de conservación (Calero *et al.*, 2000), y en las que ha existido cierto grado de aislamiento reproductivo y escaso flujo genético entre las ganaderías.

Estos métodos además de inferir estructura poblacional, permiten conocer la ascendencia de los individuos y su grado de mestizaje lo que nos permitirá planificar adecuadamente los apareamientos de la siguiente generación para el mantenimiento de la variabilidad genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F. 1996-2004. GENETIX 4.05, Université de Montpellier II, (France).
- Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L. 1994. *Nature* 368: 455-457.
- Calero, R., Padilla, J.A., Parejo, J.C., Bartolomé, P., Martínez-Trancón, M., García-Barreto, L.J., Tabasco, A., Sansinforiano, E., Bravo, J.A. 2000. *Feagas* 17: 70-76.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. 2003. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Parejo, J.C., Padilla, J.A., Tabasco, A., Sansinforiano, M.E., Martínez-Trancón M. 2002. *Genes & Genetic Systems* 77: 51-58.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. *Genetics* 155: 945-959.
- Rosenberg, N.A., Pritchard, J.K., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivotovsky, L.A., Feldman, M. 2002. *Science* 298: 2381- 2385.
- Slatkin, M. 1995. *Genetics* 139: 457-462.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538
- Wright, S. 1951. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.

Este trabajo es fruto de un Convenio Junta de Extremadura-UEx en materia de Conservación de Razas. Cofinanciado con fondos europeos FEOGA-ORIENTACIÓN medida 7.8 del programa operativo integrado de Extremadura 2000-2006.