

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL Y DEL CROMOSOMA Y EN LA RAZA BOVINA PARDA DE MONTAÑA

Calvo, J.H.¹, Sanz, A.², Blanco, M.¹, Zaragoza, P.², Revilla, R.³, Villalba, D.⁴, Rodellar, C.² y Casasus, I.¹

¹CITA-Aragón ²Universidad de Zaragoza ³CTA ⁴Universitat de Lleida
jhcalvo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En el marco de un proyecto de investigación cuyos objetivos son la caracterización morfológica y genética de la raza Parda de Montaña se ha realizado la caracterización del ADN mitocondrial y de tres microsatélites del cromosoma Y. El ADN mitocondrial ha demostrado su utilidad en el análisis de la estructura poblacional de origen materno, debido a sus características de herencia materna, haploidía, y falta de recombinación. El análisis del ADN del cromosoma Y resulta de gran interés para estudiar la estructura poblacional de origen paterno. En este trabajo se muestran los resultados preliminares de diversidad del ADN mitocondrial, cromosoma Y, y relaciones filogenéticas de 8 poblaciones de ganado bovino Pardo de Montaña en el Pirineo aragonés.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN fue obtenido de 82 muestras de sangre de animales macho de la raza Parda de Montaña distribuidas en 8 zonas o valles Pirenaicos de Aragón: Valles de Castanesa y Baliera (n=12), Valle de Chistau (n=9), Valle del Aragón (n=6), Valle de Hecho (n=11), Valle de Tena (n=8), Valle de Benasque (n=12), Valle de La Garcipollera (n=12) y Valle de Broto (n=12). Se procuró que los animales muestreados no estuviesen emparentados y que mostraran caracteres de la raza en pureza.

El ADN total fue extraído usando el kit BloodPrep y el extractor de ácidos nucleicos 6100 Nucleic Acid Prepstation de Applied Biosystem. El ADN mitocondrial fue amplificado en un volumen final de 25 µl conteniendo 30 ng de ADN, 5 pmol de cada cebador (F-5' CCT ACG CAA GGG GTA ATG TA 3'; R-5' CCT GAA GAA AGA ACC AGA TG3'), 200 mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100 y 0,5 U Taq polimerasa y 0,25 U de Pfu (Biotools). Se realizaron 30 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 s, de hibridación a 55°C durante 30 s, y de extensión a 72°C durante 45 s. Los fragmentos resultantes fueron purificados mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), y se secuenciaron con los cebadores anteriormente descritos.

Los índices de variación nucleotídica, estructura haplotípica, y test de neutralidad fueron calculados usando DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Se utilizó MEGA 2.0 para calcular la matriz de distancias entre poblaciones, y para construir árboles filogenéticos "neighbour joining", utilizando métodos de remuestreo "bootstrap" (Kumar *et al.*, 2001). El cálculo del estadístico F_{st}, así como la distribución de la variabilidad total encontrada entre poblaciones (AMOVA) se calculó usando el programa Arlequin (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>). Finalmente, Network version 4.1.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>), se utilizó para establecer conexiones en red (median joining networks) entre los haplotipos de la muestra.

Los microsatélites del cromosoma Y analizados fueron *BM861*, *BYM-1*, *INRA124* y *INRA189*. Se realizó un PCR multiplex usando el *Quiagen Multiplex PCR kit* combinando los oligonucleótidos marcados con cuatro fluorocromos diferentes (6-FAM, VIC, NED, PET). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 15 m, 30 ciclos de amplificación con 15 s. de desnaturalización a 94°C, 30 s. de hibridación a una temperatura inicial de 65°C que se fue reduciendo a razón de 2°C cada 5 ciclos hasta alcanzar la temperatura final de hibridación de 55°C, 30 s. a 72°C, finalmente una etapa de elongación de 30 m. a 72°C. Los diferentes alelos fueron visualizados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism 3130*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia analizada de 313 pares de bases de ADN mitocondrial mostró 33 haplotipos definidos por 31 sitios polimórficos, de los cuales 14 sólo fueron encontrados en un animal

(singletons). La diversidad nucleotídica y haplotípica encontrada fue elevada ($\pi = 0,006 \pm 0,003$; $Hd=0,890\pm0,028$). En la Tabla 1 se pueden ver los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica de las poblaciones analizadas. De los 33 haplotipos encontrados, 16 fueron haplotipos nuevos no descritos en la base de datos del GenBank, de los cuales 13 sólo aparecieron en un animal, 2 en 3 animales, y 1 en 5 animales (Figura 1).

Los índices de diferenciación genética mostraron que las poblaciones analizadas no se pueden considerar como poblaciones aisladas, con excepción de la población de la Garcipollera que mostró diferenciación genética ($p<0,05$) con todas las poblaciones excepto con los valles de Castanesa-Baliera y el Valle de Broto, que fueron las poblaciones que presentaron los índices de diversidad haplotípica más elevada. Estas poblaciones no presentaron diferencias significativas con ninguna población. El valle de Chistau también presentó diferencias significativas respecto a los de Broto, Benasque y La Garcipollera.

El análisis molecular de varianza (AMOVA), realizado teniendo en cuenta las 8 poblaciones, mostró que el 89,58% de la varianza total fue debida a diferencias genéticas entre individuos, mostrando una población mínimamente estructurada ($F_{st}= 0,104$), posiblemente asociado a un efecto valle.

Los índices de neutralidad fueron negativos y significativos para Fu 's F_s ($-35,008$; $p<0,0001$), Fu and Li 's F y $Tajima$'s D ($-2,11204$; $p<0,05$), y negativo pero no significativo para Fu and Li 's D ($-2,2383$; $p<0,10$), indicando una clara desviación de la neutralidad en la frecuencia de los alelos esperados, debido al excesivo número de alelos en baja frecuencia (Braverman *et al.*, 1995; Aris-Brosou y Excoffier, 1996). Esta baja frecuencia de mutaciones nuevas, puede ser un indicador de selección purificante o de expansión de la población tras un cuello de botella. El análisis de conexiones de red, que muestra una estructura filogenética de estrella (Figura 1), junto con los resultados de la distribución "mismatch", que resultó unimodal con el pico en la izquierda, se asocia con poblaciones que han sufrido una expansión demográfica reciente (Rogers y Harpending, 1992; Slatkin y Hudson, 1991).

En cuanto a los polimorfismos del cromosoma Y no se encontró variabilidad en los cuatro microsatélites analizados hasta el momento. En estos momentos se está buscando variabilidad en la población de Parda de Montaña en otros microsatélites del cromosoma Y (*UMN0307*, *UMN0103* y *BRY.1*).

Tabla 1. Índices de diversidad mitocondrial en las diferentes poblaciones de Parda de Montaña analizadas.

Poblaciones	N	H	Hd	π	k
Valle Castanesa – Baliera	12	8	0,924	0,005	1,773
Valle de Chistau	9	5	0,806	0,003	1,222
Valle del Aragón	6	4	0,867	0,003	1,200
Valle de Broto	12	7	0,773	0,004	1,333
Valle de Benasque	12	7	0,833	0,004	1,303
Valle de La Garcipollera	12	6	0,864	0,011	3,652
Valle de Hecho	11	8	0,927	0,008	2,582
Total	82	33	0,890	0,006	2,097

N: número de animales; H: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; K: número medio de diferencias nucleotídicas entre secuencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. 1996. *Molecular Biology Evolution* 13, 494–504.
- Braverman, J.M., Hudson, R.R., Kaplan, N.L., Langley, C.H. & Stephan, W. 1995. *Genetics* 140 (2), 783–796.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. 2001. *Bioinformatics* 17(12), 1244–1245.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. *Bioinformatics* 19(18), 2496–2497.
- Slatkin, M. & Hudson, R.R. 1991. *Genetics* 129(2), 555–562.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RZ2006-0007 y cofinanciado con fondos FEDER. Los autores agradecen a J.M Macarulla y a la Asociación

de Criadores de la raza Parda de Montaña (ARAPARDA) por poner a nuestra disposición las muestras.

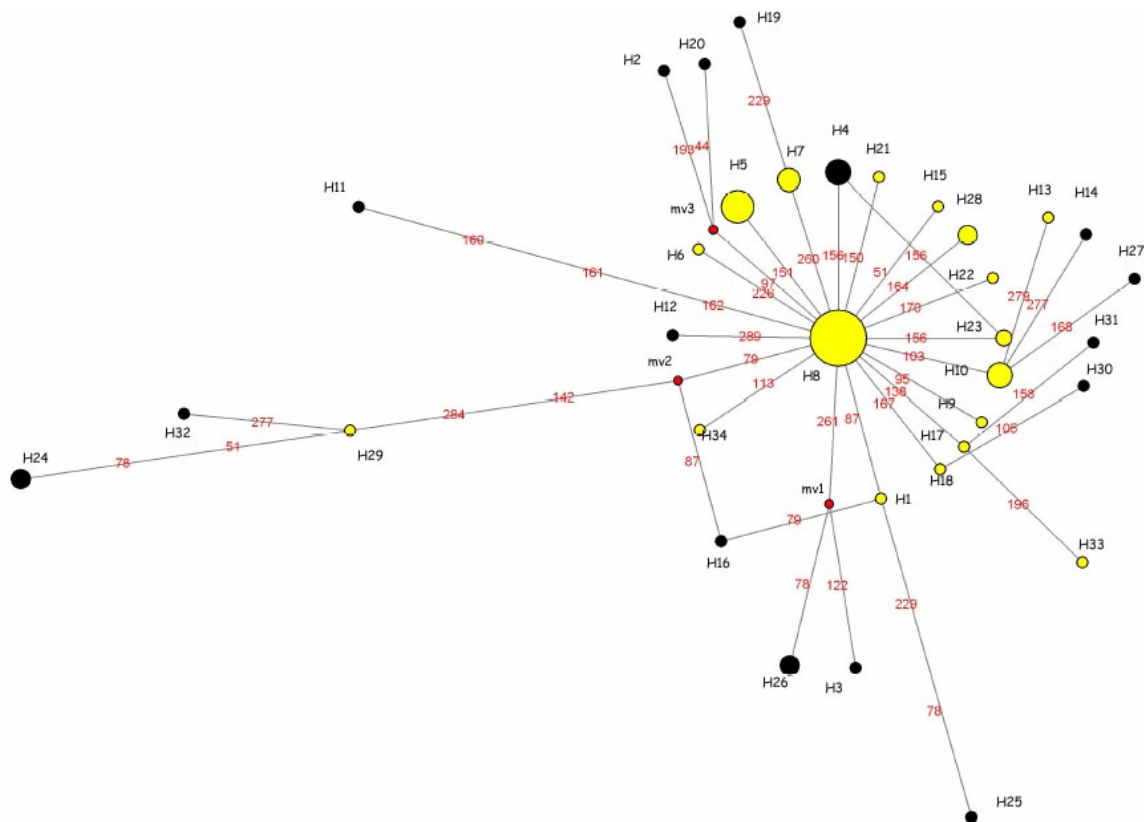


Figura 1. Análisis de conexiones de red (median-joining network). El diagrama muestra las conexiones entre haplotipos y la frecuencia de los mismos. El diámetro de H1 representa un animal. Los números indican la posición relativa del nucleótido mutado en relación a la secuencia. El haplotipo negro muestra haplotipos nuevos descritos en este estudio.

MITOCHONDRIAL AND Y CHROMOSOME DNA VARIABILITY IN PARDA DE MONTAÑA BREED

ABSTRACT: We have studied the genetic variability and relationship of eight populations of Parda de Montaña breed using mitochondrial DNA and four Y chromosome microsatellites (*BM861*, *BYM-1*, *INRA124* y *INRA189*). Y chromosome microsatellites showed monomorphics. Thirty- three mitochondrial haplotypes defined by 31 polymorphic sites (fourteen polymorphic sites were singletons) were found. The 17 phylogenetically informative sites were used to calculate nucleotide diversity ($\pi=0.006$) and haplotype diversity ($Hd=0.890$). A total of 16 previously undescribed haplotypes were found. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 10.4% of the genetic diversity was attributable to differences among populations. *Fu's Fs* (-35,008; $p<0.0001$), *Fu* and *Li's F* and *Tajima's D* (-2,11204; $p<0.05$) indicated a clear deviation from the expected allele frequency spectrum, in this case due to an excess of rare alleles. The construction of median networks showed a clear star-like phylogeny around the most frequent haplotype. The negative *Tajima's D*, *Fu* and *Li's F* and *Fu's Fs* values, as well as expected mismatch distributions and median networks suggest a population expansion.

Keywords: *Bos taurus*, mitochondrial DNA, microsatellites, chromosome Y, Parda de Montaña, cattle.