

## POSIBLE ORIGEN MATERNO COMÚN DE DOS POBLACIONES DE GALLINAS: RESULTADOS PRELIMINARES DEL ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL

Grimal A.<sup>1</sup>, Viudes de Castro M.P.<sup>1</sup>, Gómez E.A.<sup>1</sup>, Goyache F.<sup>2</sup> y Royo L.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Tecnología Animal. CITA-IVIA. Segorbe (Castellón)

<sup>2</sup>Centro de Biotecnología Animal-Deva. Serida. Gijón (Asturias)

amgrimo@gmail.com

### INTRODUCCIÓN

La gallina es una de las especies de animales domésticos más representadas en el mundo. Descubrimientos arqueológicos en India y China sugieren que las gallinas se domesticaron a partir del Red Jungle Fowl (*Gallus gallus*) con 5 subespecies como posibles progenitores: *G. g. gallus* en Tailandia y regiones, *G. g. spadiceus* en Birmania y la provincia china de Yunan, *G. g. Jabouillei* en el sur de China y el Vietnam, *G. g. murghi* en la India y *G. g. bankiva* en la Isla de Java. Sin embargo, todavía no está claro cuántas subespecies han contribuido al origen de los pollos. Un estudio previo (Liu et al., 2006) analizando 834 muestras de pollos domésticos (*G. g. domesticus*) y 66 muestras de Red Jungle Fowl (*G. g. gallus*) sugiere un múltiple origen materno en los pollos domésticos y que la domesticación ocurrió en, al menos, tres regiones del sur y el sureste de Asia. Este estudio encontró 169 haplotipos que se agruparon en 9 clados divergentes (A-I), sin encontrar un clado específico de población. Tradicionalmente, los ganaderos han clasificado a las diferentes razas de ganado según su tronco. En España, se diferencia entre gallinas de tronco atlántico (haciendo referencia a animales de mayor formato) y de tronco mediterráneo (con ejemplares más ligeros). Estas diferencias entre poblaciones se han observado al estimar distancias genéticas con marcadores microsatélites (Dávila et al., 2009), si bien no se ha investigado el origen de las poblaciones españolas a nivel mitocondrial. El objetivo de nuestro trabajo es un análisis preliminar del ADN mitocondrial de dos razas españolas bien diferenciadas fenotípicamente, la Gallina Valenciana de Chulilla (tronco mediterráneo) y la Pita Pinta Asturiana (tronco atlántico), y su inclusión dentro de los 9 clados descritos en la bibliografía.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre de dos poblaciones españolas, 20 de la Gallina Valenciana de Chulilla, de tronco mediterráneo, y 15 de la Pita Pinta Asturiana, de tronco atlántico. Se extrajo el DNA y se amplificó la región hipervariable HVS-I usando los primers L16750 (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3', (Fumihito et al., 1994)) y H522 (5'-ATGTGCCTGACCGAGGAACCAG-3', (Fu et al., 2001)). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl [Buffer 10x, 20 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 2 mM dNTP, 0,5µM de cada primer, 1 U/µl de Taq polimerasa], con 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C, con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C. En un gel de Agarosa al 2% se seleccionaron las muestras que habían amplificado, se purificaron los productos de PCR con Exosap (Pharmacia), se secuenciaron empleando ABI Prism® BigDye® Terminator v3-1 Cycle Sequencing Kit (ABI Applied Biosystems) y se volvieron a purificar antes de realizar la electroforesis en un secuenciador automático ABI310. Las secuencias fueron analizadas y editadas utilizando Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Se incluyeron secuencias del GenBank, procedentes de 66 individuos incluidos en el trabajo de Liu et al. (2006) como referencia de los 9 clados descritos. Con el paquete Clustal de Mega 4.0 (Tamura et al., 2007) se alinearon las secuencias de las dos poblaciones españolas con las del GenBank y se obtuvo un árbol unrooted neighbor-joining (NJ) con el modelo kimura-2-parámetros. Utilizando sólo las muestras de las poblaciones españolas, con DnaSP (Rozas et al., 2003) se obtuvieron los haplotipos.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la distribución de nuestras poblaciones dentro de los 9 clados encontrados por Liu et al. (2006). Se obtuvieron 35 secuencias mtDNA de la región HVS-I pertenecientes a las dos poblaciones fenotípicamente diferenciadas. Se identificaron un total de 25 sitios polimórficos, 14 en la Gallina Valenciana de Chulilla (CHU) y 21 en la Pita Pinta Asturiana (PIT). Las 35 secuencias dieron un total de 14 haplotipos (Tabla 1), 4 fueron exclusivos de individuos CHU y 9 de PIT, habiendo solo un haplotipo con individuos pertenecientes a las dos poblaciones (Tabla 1). Ello indica una mayor diversidad en la

población de Pita Pinta Asturiana, puesto que, aún empleando menos individuos, se encontraron más orígenes maternos que en la Gallina Valenciana de Chulilla en la que el 85% de las muestras compartían dos haplotipos.

Estos haplotipos se enmarcan mayoritariamente en el clado E de entre los 9 descritos por Liu et al. (2006), aunque algunos individuos aparecen en los clados A y C. Según el estudio de Liu et al. (2006), el clado H sólo contenía muestras de Red Jungle Fowl mientras que el C estaba sólo compuesto por razas domésticas. En el resto aparecen muestras tanto de Red Jungle Fowl como de razas domésticas, apareciendo el 33,3% de los Red Jungle Fowl dentro del clado D. A pesar de no haber un clado específico de raza, encontraron cierta distribución regional en los clados. Los clados A y B se distribuyeron principalmente en el Sur de China y Japón, apareciendo dos ejemplares de CHU y uno de PIT, éste último correspondiente a un fenotipo abedul. El clado E es el predominante en Europa, lo que concuerda con nuestros resultados puesto que el 88,6% de nuestras muestras son asignadas a este clado. Curiosamente, aparece un animal PIT en el clado C que está representado por animales de dos provincias de China y de Japón.

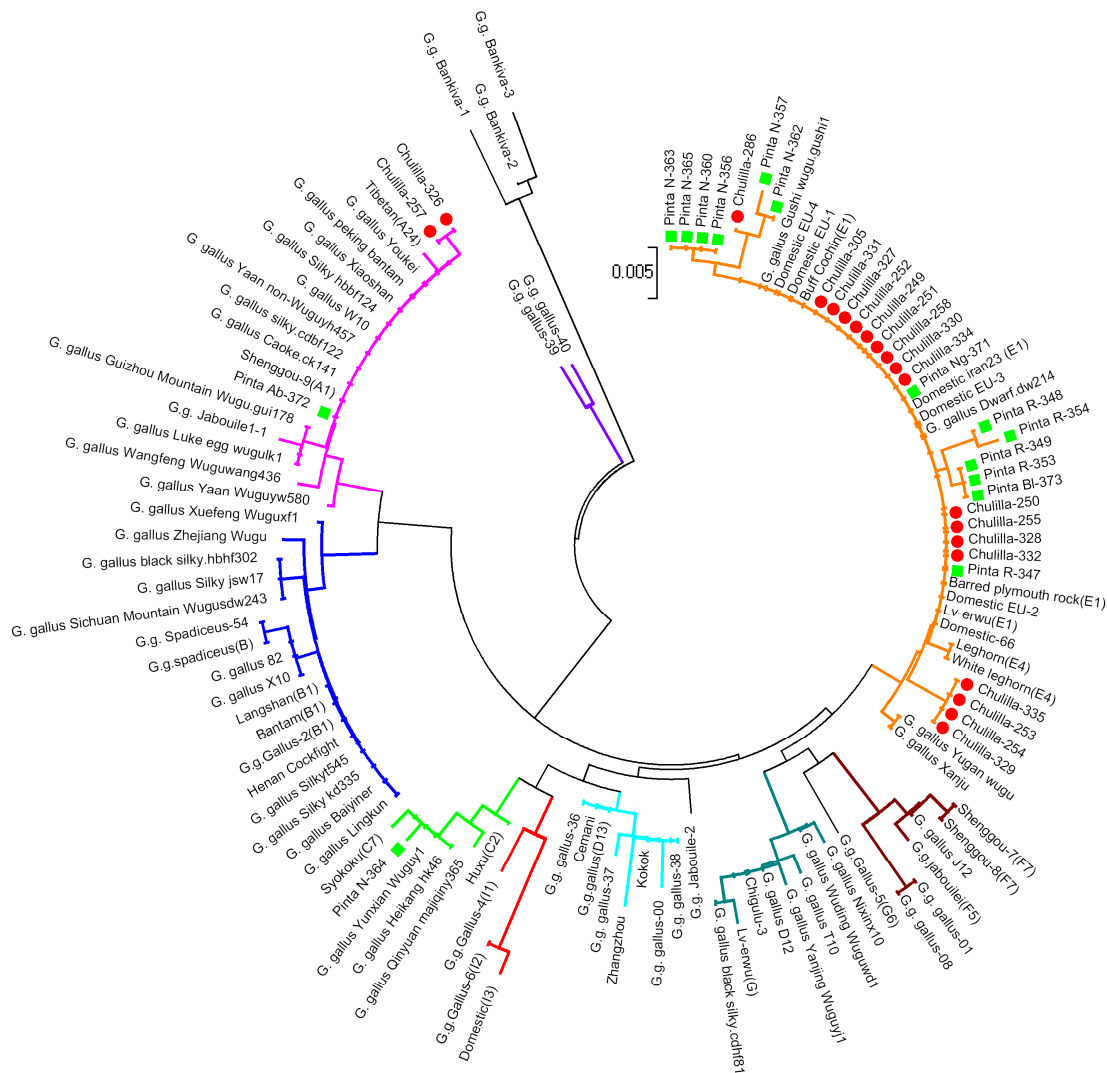
La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) conjunta fue de 0,0082, siendo de 0,0052 en la Gallina Valenciana de Chulilla y de 0,00997 en la Pita Pinta Asturiana, lo que sigue corroborando la mayor diversidad de esta última población. Estos valores son similares a los obtenidos por Liu et al. (2006), que encontraron valores de  $\pi$  entre clados que iban de 0,0018 a 0,0109. Ello parece indicar que, al igual que ocurrió al analizar la Gallina Valenciana de Chulilla con marcadores microsátélites (Grimal et al., 2007), se aprecia que su variabilidad genética es reducida, pero los valores son del mismo orden que en otras poblaciones bien establecidas, probablemente indicando los altos niveles de consanguinidad a los que se han sometido las poblaciones de gallinas. Se concluye que, a pesar de que los criadores hablan tradicionalmente de gallinas de tronco mediterráneo y de tronco atlántico, ambas parecen tener un origen materno común, aunque deberíamos realizar un muestreo mucho más amplio, incluyendo más poblaciones de gallinas españolas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dávila, S.G., Gil, M.G., Resino-Talaván, P. & Campo, J.L. 2009. Poultry Sci. 88:2518-2525.
- Fu, Y., Niu, D., Luo, J., Ruan, H., He, G.-Q. & Zhang, Y.-P. 2001. Acta Genet. Sin. 28:411-417.
- Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S. & Kondo, N. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 12505-12509.
- Grimal, A., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S. & Gómez, E.A. 2007. ITEA 28(II):432-434.
- Liu, Y.P., Wu, G.S., Yao, Y.G., Miao, Y.W., Luikart, G., Baig, M., Beja-Pereira, A., Ding, Z.L., Palanichamy, M.G. & Zhang, Y.P. 2006. Mol. Phylog. Evol. 38:12-19.
- Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. Bioinformatics 19:2496-2497.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.

**Tabla 1:** Haplotipos encontrados en 35 secuencias de mtDNA de dos poblaciones españolas y el clado en el que se enmarcan según Liu et al. (2006).

Haplotipo	N	Individuos	Clado
1	4	Chulilla (335; 253; 254; 329)	E
2	15	Chulilla (249; 250; 251; 252; 255; 258; 327; 328; 330; 331; 332; 334;305) Pinta (R-347; Ng-371)	E
3	1	Chulilla (257)	A
4	1	Chulilla (326)	A
5	1	Chulilla (286)	E
6	1	Pinta (R-348)	E
7	3	Pinta (R-349; R-353; BI-373)	E
8	1	Pinta (R-354)	E
9	1	Pinta (N-356)	E
10	1	Pinta (N-357)	E
11	3	Pinta (N-360; N-363; N-365)	E
12	1	Pinta (N-362)	E
13	1	Pinta (N-364)	C
14	1	Pinta (Ab-372)	A



**Figura 1:** Árbol NJ enmarcando las dos poblaciones españolas en los 9 clados descritos por Liu et al. (2006).

### POSSIBLE COMMON MATERNAL ORIGIN OF TWO HEN POPULATIONS: PRELIMINARY RESULTS OF MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS.

**ABSTRACT:** Traditionally farmers refer to Mediterranean and Atlantic stocks to differentiate between populations in order to guarantee the different origins of the breeds. The most probable wild progenitor of the domestic chicken belongs to the genus *Gallus*. Archaeological discoveries suggest that chickens were probably domesticated from the Red Jungle Fowl (*Gallus gallus*). Previous phylogenetic analyses with 834 domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) by analysing the mitochondrial DNA hypervariable segment I (HVS-I) revealed nine highly divergent mtDNA clades, with no breed-specific clade. Twenty Chullilla hens, belonging to a Mediterranean stock and fifteen Pinta Pintada Asturiana hens belonging to an Atlantic stock were studied. HVS-I was sequenced, analysed and compared with GenBank sequences in order to ascribe the individuals to one of the nine clades. The 35 sequences gave 22 haplotypes. Mostly, both breeds clustered in clade E, as observed in other domestic European populations. This preliminary study reveals the same maternal origin from those breeds, despite their phenotypic differentiation.

**Keywords:** mitochondrial DNA, haplotype, genetic resources, chicken.