

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN CINCO RAZAS OVINAS PIRENAICAS

Ferrando, A., Casas, M., Marmi, J., Parés, P.M. y Jordana, J.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V; 08193-Bellaterra (Barcelona). Jordi.Jordana@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El ADN mitocondrial posee una serie de características como la haploidía, la herencia materna y la falta de recombinación que lo convierten en una herramienta muy útil en estudios sobre el origen materno de las poblaciones domésticas. Actualmente, hay descritos cinco haplogrupos mitocondriales en ovino doméstico (*Ovis aries*) denominados A, B, C, D y E (Meadows et al., 2007). Los ovinos ibéricos se clasifican, según características morfológicas —especialmente el tipo de lana—, en cuatro troncos: *churro*, *ibérico*, *merino* y *entrefino*. El haplogrupo mitocondrial B, o haplogrupo europeo, es el más comúnmente extendido en los cuatro troncos. El haplogrupo A, o haplogrupo asiático, también se presenta en baja frecuencia en razas de los distintos troncos, mientras que el haplogrupo C, ha sido detectado en tan sólo algunos individuos de unas pocas razas (Pereira et al., 2006; Pedrosa et al., 2007).

En la zona de los Pirineos y pre-Pirineos Centrales y Orientales existen razas ovinas con diferente origen ancestral, como las razas Aranese, Ripollesa, Xisqueta en la vertiente española, o Tarasconese y Roja de Rosellón en la francesa. La raza Aranese está estrechamente emparentada con la raza Tarasconese y sus orígenes ancestrales se encuentran probablemente en la raza Merina. La oveja Ripollesa tiene su origen en cruces entre ovejas autóctonas de los Pirineos Centrales y ovinos trashumantes mejorados de la raza Merina, aunque también ha recibido influencias de otras razas ibéricas y extranjeras (<http://www.rac.uab.es>). La raza Xisqueta, en cambio, pertenece al *tronco ibérico*. La oveja Roja de Rosellón, por su lado, desciende de poblaciones originarias del norte de África. El análisis con marcadores microsatélites mostró que estas cinco razas tienen una elevada variabilidad genética y una diferenciación genética poco pronunciada, siendo la oveja Aranese y la Tarasconese las razas más cercanas y la Roja de Rosellón la más distante (Ferrando et al., 2007). En este trabajo se pretende estudiar la diversidad mitocondrial en estas cinco razas de la zona de los Pirineos Centrales y Orientales

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN fue obtenido de muestras de sangre de animales de la raza Aranese (N=40), Tarasconese (N=18), Ripollesa (N=21) y Roja de Rosellón (N=13). Se procuró que los animales muestreados no estuviesen emparentados y que mostraran caracteres de la raza en pureza. Se incluyó asimismo una muestra de 16 secuencias de la raza Xisqueta obtenidas anteriormente (Marmi et al., 2007).

Se amplificó parte del DNA mitocondrial y del gen tRNA-Phe con los cebadores OarMtF1 (5' – TAC AAC ACG GAC TTC CCA CTC C – 3') y tRNA-Phe (Hiendleder et al., 2002) que producen un fragmento de 1144 pares de bases, que engloban desde la posición 15521L a la posición 48H de la secuencia de referencia AF010406 (Hiendleder et al., 1998). Los productos de PCR fueron purificados con el kit *Exo-SAP-IT™* (GE Healthcare) y secuenciados con *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) utilizando el cebador interno HC3-b (5' – CAG ACG GCC ATA GCT GAG TCC AAG – 3') que hibrida entre las posiciones 16314H-16337H de la secuencia de referencia. Las reacciones de secuenciación fueron purificadas con el kit *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup* (Millipore) y secuenciadas en un ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron analizadas con el programa *Sequencing Analysis v.5.1.1* (Applied Biosystems) y alineadas con el programa *BioEdit v.7.0.5.1* (Hall, 1999). Se utilizó el programa *DnaSP v.4.5* (Rozas et al., 2003) para calcular los valores de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Hd) para cada raza, así como el número medio de diferencias entre secuencias (*mismatch distribution*). El programa *Network v.4.5.1.0*. (Fluxus

Technology Ltd) permitió construir el *median joining network* con todas las secuencias, incluyendo y excluyendo la región repetitiva del *D-loop*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se alineó un fragmento de 425-500 pares de bases de las 108 secuencias obtenidas. Todas las secuencias presentaron cuatro unidades repetitivas de 75 pares de bases excepto un individuo de la raza Ripollesa que sólo presentó tres. Esta secuencia fue excluida de la mayoría de los análisis, excepto en los que no se consideró la región repetitiva. Variaciones en el número de unidades repetitivas no son un hecho raro, y han sido también observadas en la raza Xisqueta (datos propios) y otras razas ibéricas (Pereira et al., 2006).

La *mismatch distribution* de las secuencias presentó una distribución bimodal, señal de la presencia de haplotipos divergentes. Casi todas las secuencias analizadas se agruparon con el haplogrupo mitocondrial B, excepto dos secuencias de la raza Aranesa que resultaron pertenecer al haplogrupo A. El individuo de la raza Ripollesa con tres unidades repetitivas también resultó pertenecer al haplogrupo A. El hallazgo de este haplogrupo asiático no es extraño pues también se encuentra en baja frecuencia en otras razas de los distintos troncos ibéricos y geográficamente distanciadas (Pereira et al., 2006; Pedrosa et al., 2007). Cabe destacar que, al contrario de lo que sucede en otras razas del *tronco ibérico* (Ojalada y Montesina) en las que se ha detectado hasta tres haplogrupos distintos (Pedrosa et al., 2007), la raza Xisqueta sólo presentó el haplogrupo B (Marmi et al., 2007).

La diversidad haplotípica fue muy elevada en las cinco razas (Tabla 1). Algunos haplotipos fueron compartidos por no más de dos individuos, generalmente de una misma raza. Pese a estar más estrechamente emparentadas, sólo se encontró un haplotipo común entre las razas Aranesa y Tarasconesa. No obstante, la Aranesa también compartió algún haplotipo con las razas Ripollesa y Xisqueta. Por otro lado, la raza Roja de Rosellón compartió un haplotipo con la raza Xisqueta. La diversidad nucleotídica fue más elevada en la raza Aranesa, en gran parte debido a la presencia de secuencias de dos haplogrupos. Tras excluir las secuencias del haplogrupo A, la raza presentó valores de diversidad nucleotídica y de diferencias medias entre secuencias más parecidos a las demás razas, pero también más elevados ($\pi=0,01840$, $k=8,889$). El *median-joining network* no permitió detectar ninguna estructura clara entre las secuencias de las cinco razas (Figura 1A). Se repitió el *median-joining network* sobre un fragmento común de 199 pares de bases en 108 secuencias, excluyendo la zona repetitiva. En este caso, el *network* presentó una forma típica estrellada, con un haplotipo central muy frecuente compartido por todas las razas, y no se apreció ninguna subestructuración definida en las distintas razas (Figura 1B).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferrando, A., Parés, P. M., Marmi, J., Avellanet, R. & Jordana, J. 2007. *ITEA* 28 (vol. extra): 516-518.
- Fluxus Technology Ltd., <http://www.fluxus-engineering.com>.
- Hall, T. A. 1999. *Nucl. Acids Symp. Res.* 41: 95-98
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R. & Janke, A. 1998. *J. Mol. Evol.* 47: 441-448.
- Hiendleder, S., Kaupe, B., Wassmuth, R. & Janke, A. 2002. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269: 893-904.
- Marmi, J. & Jordana J. 2007. *Arch. Zootec.* 56 Sup.1: 429-434.
- Meadows, J. R. S., Cemal, I., Karaca, O., Gootwine, E. & Kijas. J. W. 2007. *Genetics* 175: 1371-1379.
- Pedrosa, S., Arranz, J. J., Brito, N., Molina, A., San Primitivo, F. & Bayón, Y. 2007. *Genet. Sel. Evol.* 39: 91-103.
- Pereira, F., Davis, S. J. M., Pereira, L., McEvoy, B., Bradley, D. G. & Amorim, A. 2006. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1420-1426.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- San Primitivo, F., Pedrosa, S., Arranz, J. J., Brito, N. V., Molina, A. & Bayón, Y. 2007. *Arch. Zootec.* 56 (S1): 455-460.
- <http://www.rac.uab.es>.

Tabla 1. Parámetros de variabilidad mitocondrial en las cinco razas pirenaicas.

Razas	N	π	k	H	Hd	Haplotipo A	Haplotipo B
Aranesa	40	0,02253	10,768	34	0,992	2	38
Tarasconesa	18	0,01525	7,562	17	0,993	0	18
Ripollesa	20*	0,01587	7,905	17	0,984	0*	20
Xisqueta	16	0,01537	7,533	15	0,992	0	16
Roja de Rosellón	13	0,01756	8,744	13	1,000	0	13
Total	107	0,01825	8,575	92	0,997	2*	105

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

* No incluye una secuencia del haplogrupo A con tres unidades repetitivas.

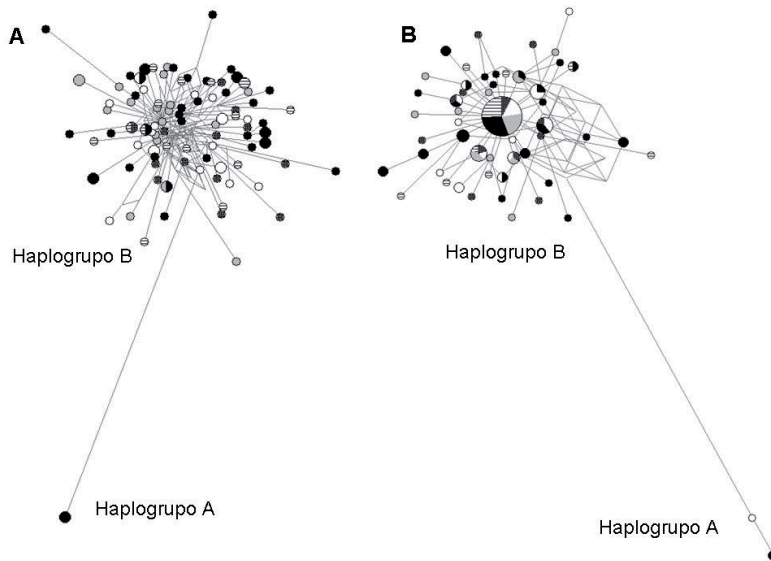


Figura 1, Median-joining network de las secuencias mitocondriales de las razas Aranesa (negro), Tarasconesa (gris claro), Ripollesa (blanco), Xisqueta (rayas) y Roja de Rosellón (gris oscuro): **A**, incluye la zona repetitiva; **B**, no incluye la zona repetitiva.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya*. También agradecemos a los ganaderos y a las diferentes asociaciones de las razas su ayuda y colaboración.

MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY IN FIVE PYRENEAN SHEEP BREEDS

ABSTRACT: The DNA mitochondrial variability of the control region was analysed in five sheep breeds located in the Pyrenean and pre-Pyrenean area: Aranese, Tarasconese, Xisqueta, Ripollese, and Roussillon Red. All breeds showed high levels of haplotype diversity, and all but three individuals belonged to haplogroup B, except two Aranese and one Ripollese animals that had sequences from haplogroup A. The median joining network constructed including and excluding the repetitive region did not show any clear phylogenetic structure among breeds.

Keywords: *Ovis aries*, D-loop, mitochondrial haplogroups, median joining network.