

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MITOCONDRIAL DE LA RAZA CAPRINA BLANCA DE RASQUERA EN SUS DIFERENTES ZONAS DE PASTOREO

ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL DIVERSITY OF THE BLANCA DE RASQUERA GOAT BREED AT DIFFERENT SHEPHERDING AREAS

Ferrando, A. y J. Jordana

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona – 08193-Bellaterra – Barcelona. Jordi.Jordana@uab.cat

TÍTULO CORTO: Diversidad mitocondrial en Cabra Blanca de Rasquera

RESUMEN

La Cabra Blanca de Rasquera es la única población caprina autóctona de Catalunya. Es una raza de aptitud cárnica de tipo ambiental y su censo se estima en menos de 5000 animales. En el presente trabajo se presentan los resultados del análisis de la variabilidad genética mitocondrial, obtenidos a partir de la secuenciación de un fragmento de 561pb de la región D-loop de 75 animales de las tres zonas de pastoreo. Se obtuvieron 46 haplotipos pertenecientes a dos haplogrupos mitocondriales: haplogrupo A (44 haplotipos, 72 individuos) y haplogrupo C (2 haplotipos, 3 individuos). La diversidad haplotípica total fue elevada ($H_d=0,983$) y la diversidad nucleotídica de $\pi=0,0189$. La diversidad haplotípica fue similar en las tres zonas de pastoreo ($H_d=0,967-0,984$) y se encontraron haplotipos comunes en animales de diferentes zonas y explotaciones. La topología del *network* construido mediante *median joining* resultó compleja, formando pequeños *clusters* independientes, y de escasa relación con el origen geográfico de los animales. El análisis molecular de la varianza (AMOVA) no detectó subestructuración poblacional. Toda la variabilidad se detectó dentro de las zonas de pastoreo. Pese a la drástica reducción en el censo de la raza, a lo largo de la segunda mitad del s.XX, los valores de diversidad haplotípica observados continuaron siendo elevados. Actualmente, las explotaciones de Cabra Blanca de Rasquera mantienen un aislamiento reproductivo que no se ha detectado a nivel del análisis mitocondrial. Algunos individuos de diferentes zonas de pastoreo compartieron el mismo haplotipo, probablemente como reflejo de anteriores intercambios de animales.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: D-loop, conservación, peligro de extinción

SUMMARY

The Blanca de Rasquera goat breed is the unique autochthonous goat population located in Catalonia. It's a rustic breed of meat aptitude with a census estimated in less than 5000 animals. In this study are presented the results of the analysis of the mitochondrial genetic variability obtained by comparing 561-bp sequences of the D-loop from 75 animals from the three shepherding areas. A total of 46 haplotypes were obtained that belonged to two mitochondrial haplogroups: haplogroup A (44 haplotypes, 72 individuals) y haplogroup C (2 haplotypes, 3 individuals). Total haplotype diversity was high ($H_d=0.983$) and nucleotide diversity was $\pi=0.0189$. Haplotype diversity was similar in all shepherding areas ($H_d=0.967 - 0.984$) and some haplotypes were found in more than one area and farm. The median-joining network topology was complex, and showed some small independent clusters with little relation to the geographical origin of animals. The molecular analysis of the variance (AMOVA) did not detect any population structure. All the variability was detected within shepherding areas. Despite the severe reduction of the census size of the breed that took place during the second half of the XXth century, haplotype diversity values observed were still high. Nowadays, White of Rasquera farms maintain a reproductive isolation that was not detected with mitochondrial analysis. Some individuals from different areas shared the same haplotype, probably as a consequence of exchanges of animals between farms in the past.

ADDITIONAL KEYWORDS: D-loop, conservation, risk of extinction

INTRODUCCIÓN

La Cabra Blanca de Rasquera es la única población caprina autóctona de Catalunya (noreste de España). Es una raza de aptitud cárnica de tipo ambiental. Actualmente, se encuentra en grave peligro de extinción y su censo se estima en menos de 5000 animales. La población actual se distribuye en 12 explotaciones agrupadas en tres zonas de pastoreo. Esta raza pertenece al grupo de los descendientes del tronco *Capra prisca*. A nivel morfológico se ha evidenciado una cierta variabilidad biométrica, con la presencia de 3 subpoblaciones diferenciadas, en función de los principales territorios de pastoreo (zonas A, B y C) (Carné *et al.*, 2007). No obstante, estas diferencias apenas se reflejaron a nivel molecular con marcadores de ADN de tipo microsatélite (Jordana *et al.*, 2007). En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización genética de la raza mediante el análisis de un fragmento de la región control (D-loop) del mtDNA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo el ADN de muestras sanguíneas de 76 individuos de la raza caprina Blanca de Rasquera, procedentes de 12 explotaciones divididas en tres zonas de pastoreo: zona A (municipios de Rasquera y Tivenys, N=23), zona B (municipios de Tivissa y Vandellós, N=37) y zona C (municipio de Horta de Sant Joan, N=16). La región D-loop entera del ADN mitocondrial fue amplificada utilizando los marcadores mitocondriales Chi-pro (5' – AGC CAT AGC CTC ACT ATC AGC – 3') y tRNA-phe (5' – TCA TCT AGG CAT TTT CAG TG – 3', Hiendler *et al.*, 2002). Se prepararon las PCRs en un volumen final de 20µl que incluyeron: 1x buffer, 1.5mM de MgCl₂, 0.4mM dNTP, 0.5µM de cada primer, 1.2U de *Taq* polimerasa (Ecogen, Barcelona) y alrededor de 50ng de DNA. El programa del termociclador se inició con una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C 30 segundos, 60°C 60 segundos y 72°C 90 segundos, y finalizó con una extensión final de 10 minutos a 72°C. La secuenciación se realizó en una sola dirección mediante el marcador Chi-pro, en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems, CA, USA).

Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa BIOEDIT v.7.0.5 (Hall, 1999). Los valores de polimorfismo y los parámetros de diversidad genética fueron estimados con el programa DNASP v 4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003). La estructura poblacional se testó mediante el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) con el programa ARLEQUIN v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). El *network* de las secuencias fue obtenido mediante *median-joining* con el programa Network v4.5.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las secuencias obtenidas de 76 animales de las tres zonas de pastoreo fueron alineadas para un fragmento común de 561 pares de bases del D-loop. Una secuencia presentó una inserción de 77 pares de bases y fue descartada de los posteriores análisis. Se detectaron un total de 46 haplotipos diferentes entre las 75 secuencias analizadas (Tabla I). La comparación con secuencias de los 6 haplogrupos descritos en la actualidad (Naderi *et al.*, 2007) mostró que los haplotipos detectados pertenecían a los haplogrupos mitocondriales A (72 secuencias, 44 haplotipos) y C (3 secuencias, 2 haplotipos) (ver Tabla I y Figura 1).

Se observó una diferencia media de 39,07 mutaciones entre secuencias de ambos haplogrupos. Dentro del haplogrupo A, el número medio de diferencias nucleotídicas entre secuencias fue de $k=8,083$ (zona A, $k=7,026$; zona B, $k=8,608$; zona C, $k=10,133$). La diversidad haplotípica total fue elevada ($Hd=0,983$) y presentó valores similares en las tres zonas de pastoreo ($Hd=0,967-0,984$). La diversidad nucleotídica total fue de $\pi=0,01890$. Dentro del haplogrupo A, este valor fue de $\pi=0,01456$ (Tabla II).

Se encontraron haplotipos comunes en animales de diferentes zonas y explotaciones. La topología del *network* construido mediante *median-joining* resultó compleja, formando pequeños clusters independientes y de escasa relación con el origen geográfico de los animales (Figura 1). El análisis molecular de la varianza (AMOVA) no detectó subestructuración poblacional. Toda la varianza se detectó dentro de las zonas de pastoreo.

Pese a la drástica reducción en el censo de la raza durante la segunda mitad del siglo pasado, (pasando p.e. de los 30000 censados el año 1995 a los menos de 5000 en la actualidad), los valores de diversidad haplotípica fueron elevados. Actualmente, las explotaciones de Cabra Blanca de Rasquera mantienen un aislamiento reproductivo que no se detecta a nivel del análisis mitocondrial. Algunos individuos de diferentes zonas de pastoreo compartieron el mismo haplotipo, probablemente como reflejo de anteriores intercambios de animales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural* (DAR) de la Generalitat de Catalunya, y por el proyecto de investigación RZ2007-00005-C02-01 concedido por el Instituto Nacional de Investigaciones Agroalimentarias (INIA). También queremos agradecer a todos los ganaderos de la raza la colaboración, e inestimable ayuda, mostrada en todo momento.

BIBLIOGRAFIA

- Carné, S., N. Roig and J. Jordana. 2007. La Cabra Blanca de Rasquera: caracterización morfométrica y faneróptica. *Archivos de Zootecnia*, 56: 319-330.
- Hall, T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hiendleder, S., B. Kaupe, R. Wassmuth and A. Janke. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 269: 893-904.
- Network v4.5.0.0., Fluxus Technology Ltd., <http://www.fluxus-engineering.com>
- Jordana, J., J. Marmi, S. Carné and A. Ferrando. 2007. Caracterización genética del último reducto caprino autóctono de Catalunya: la Cabra Blanca de Rasquera. VIII Simposio Iberoamericano sobre conservación y recursos zoogenéticos, 13-15 de noviembre. Quevedo (Ecuador). Libro del Congreso.
- Naderi, S., H-R. Rezaei, P. Taberlet, S. Zundel, S-A. Rafat, H-R. Naghash, M.A.A. El-Barody, O. Ertugrul and F. Pompanon. 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *PLoS ONE*, 10: e1012.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

TABLA I. Número de haplotipos y haplogrupos detectados en cada zona de pastoreo (*Number of haplotypes and haplogroups detected in each shepherding area*).

Zona de Pastoreo	N	Nº de haplotipos diferentes	Haplogrupo A	Haplogrupo C
Zona A	23	19	18	1
Zona B	36	22	21	1
Zona C	16	14	16	1
Zonas A+B+C	75	46	44	2

N, número de individuos analizados.

TABLA II. Diversidad haplotípica y nucleotídica, número de posiciones nucleotídicas polimórficas totales e informativas en cada una de las zonas de pastoreo, para todas las secuencias y únicamente dentro del haplogrupo A (*Haplotype and nucleotide diversity, total number of nucleotide polymorphic and informative sites in each shepherding area, detailed for all sequences and for haplogroup A*).

Todas las secuencias	Diversidad Haplotípica (Hd)	Sitios Polimórficos totales	Sitios Polimórficos informativos	Diversidad Nucleotídica
Zona A	0,984 ± 0,017	58	22	0,0176 ± 0,0046
Zona B	0,967 ± 0,014	72	35	0,0185 ± 0,0031
Zona C	0,983 ± 0,028	60	30	0,0249 ± 0,0060
Zonas A+B+C	0,983 ± 0,005	80	67	0,0189 ± 0,0024
Haplogrupo A	Diversidad Haplotípica (Hd)	Sitios Polimórficos totales	Sitios Polimórficos informativos	Diversidad Nucleotídica
Zona A	0,983 ± 0,018	33	19	0,0127 ± 0,0011
Zona B	0,965 ± 0,015	50	32	0,0153 ± 0,0011
Zona C	0,981 ± 0,031	36	25	0,0181 ± 0,0017
Zonas A+B+C	0,982 ± 0,005	63	45	0,0146 ± 0,0008

FIGURA 1. Topología del *median-joining network* de las secuencias D-loop de la Cabra Blanca de Rasquera. Se aprecia la existencia de dos haplogrupos bien definidos. El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias por haplotipo y el color representa la zona de pastoreo: A (blanco), B (gris) y C (negro) (*Median-joining network of D-loop sequences of the Blanca de Rasquera goat breed. Two clearly separated haplogroups are detected. Each circle represents a different haplotype and its size is proportional to the number of sequences per haplotype. Each colour corresponds to a different shepherding area: A (white), B (grey) and C (black).*

