

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL EN LA RAZA OVINA XISQUETA

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION IN THE XISQUETA SHEEP BREED

Marmi, J., R. Avellanet y J. Jordana*

Unitat de Ciència Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona. España. *Correspondencia: jordi.jordana@uab.cat

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Raza ovina local. Conservación.

ADDITIONAL KEYWORDS

Local sheep breed. Conservation.

RESUMEN

Dentro del programa de conservación de la raza ovina Xisqueta, iniciado el año 2000 por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya y la Universitat Autònoma de Barcelona, se está analizando la variabilidad genética de su genoma mitocondrial. Para ello, se ha analizado un fragmento de 666 pares de bases de la región control del DNA mitocondrial en 71 individuos pertenecientes a 13 subpoblaciones, distribuidas en diferentes comarcas. Los resultados revelaron que, a pesar de su reducido tamaño poblacional, la raza ovina Xisqueta conserva altos niveles de variabilidad genética ($\pi=0,01165\pm0,00056$; $h=0,998\pm0,003$). Por otro lado, no se detectaron evidencias de estructuración poblacional.

SUMMARY

The conservation program of the Xisqueta sheep breed, which is carried out by the Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya and the Universitat Autònoma de Barcelona, started in the 2000. One of the objectives of the program was the study of genetic diversity of this endangered breed. We

have analysed a fragment of 666 bp of the mtDNA control region in 71 individuals belonging to 13 subpopulations distributed around different regions. The results have revealed that the Xisqueta sheep breed has high levels of genetic diversity ($\pi=0.01165\pm0.00056$; $h=0.998\pm0.003$) although its reduced population size. On the other hand, we have not found evidences of population structuring.

INTRODUCCIÓN

La oveja Xisqueta es una raza autóctona catalana en peligro de extinción que se distribuye en las comarcas leridanas del Pallars Jussà, Pallars Sobirà y Alta Ribagorça y, también, en la Ribagorza oscense. Desde mediados del siglo XX su censo ha disminuido notablemente; estimándose que en la actualidad sólo existen entre 12000 y 15000 individuos puros.

La región control del DNA mitocondrial tiene una alta tasa de mutación por lo que es un marcador ideal para

estudiar la variabilidad genética a nivel intraespecífico, en estudios filogeográficos y en genética de la conservación de especies amenazadas (Pasboll y Arctander, 1998). En ovino (*Ovis aries*), la región control presenta dos linajes principales, A y B; este último presente en razas europeas (Hiendleder *et al.*, 2002); aunque otros tres linajes adicionales también han sido descritos en la especie ovina: el C (Pereira *et al.*, 2006) y más recientemente el D y E (Meadows *et al.*, 2007). En este trabajo se analiza la región control de la raza ovina Xisqueta para estimar sus niveles de variabilidad genética y posible estructuración poblacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de 71 individuos procedentes de diferentes subpoblaciones de las comarcas del Pallars Jussà [JE-Les Esglèsies (n=1), JF-Vall Fosca (n=3), JI-Isona (n=3), JP-Pobla de Segur (n=7), JT-Torre de Tamúrcia (n=8)]; de l'Alta Ribagorça [RB-Vall de Boí (n=5), RP-Pont de Suert (n=7), RS-Senet (n=7)]; del Pallars Sobirà [SA-Vall d'Assua (n=6), SE-Esterri d'Àneu (n=5), SF-Vall Ferrera (n=7), SS-Sort (n=5)]; y de la Ribagorça de Huesca [HU-Valle de Isábena (n=7)]. El DNA se extrajo siguiendo el protocolo de Ausubel *et al.* (1989). La región control entera fue amplificada utilizando los *primers* tRNA-Pro y tRNA-Phe según el protocolo de Hiendleder *et al.* (1998). La secuenciación se realizó en una sola dirección mediante el *primer* tRNA-Pro, en un secuenciador automático

ABI3730 (Applied Biosystems, CA, USA), obteniéndose secuencias de 666 pares de bases.

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 4.10.3 (Rozas *et al.*, 2003). Con el mismo programa se realizó el análisis de la *mismatch distribution* y se estimó el valor del estadístico F_s de Fu. La estructura poblacional se testó por medio del análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el programa ARLEQUIN v 2000 (Schneider *et al.*, 2000). La filogenia de los haplotipos se exploró mediante el método de *neighbor-joining*, aplicando el modelo evolutivo de Tamura-Nei con el programa MEGA v3 (Kumar *et al.*, 2004). El parámetro α de la distribución gamma, fue estimado con el programa TREE PUZZLE v 5.2 (Strimmer y von Haeseler, 1996). El valor obtenido fue $\alpha = 0,12 (\pm 0,02)$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 71 individuos analizados proporcionaron 67 haplotipos, diferenciándose por una media de 8,5 ($\pm 1,04$) diferencias nucleotídicas. Todos los haplotipos pertenecían al linaje mitocondrial ovino B. Sólo cuatro haplotipos (Xis21, Xis22, Xis32 y Xis49) se hallaban compartidos entre diferentes individuos (dos individuos, tan sólo, por haplotipo). El alineamiento de las secuencias presentó 93 posiciones polimórficas, 42 de las cuales correspondían a *singletons*. Las estimacio-

VARIABILIDAD GENÉTICA MITOCONDRIAL EN LA OVEJA XISQUETA

nes de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (h) fueron $0,01165 \pm 0,00056$ y $0,998 \pm 0,003$, respectivamente. En razas ovinas portuguesas se obtuvieron valores de diversidad haplotípica muy semejantes a los del presente trabajo ($h = 0,996-0,998$; Pereira *et al.* 2006), los cuáles eran generalmente superiores a los obtenidos en razas centroeuropeas ($h = 0,680-0,909$; Meadows *et al.*, 2005). Todo esto sugiere que, a pesar de tratarse de una raza en peligro de extinción, la oveja Xisqueta conserva todavía niveles moderadamente elevados de diversidad genética en su genoma mitocondrial. Esto también es consistente con los altos valores de variabilidad encontrados en su genoma nuclear, utilizan-

do marcadores microsatélites ($H_o = 0,71$ y $H_e = 0,76$) (Avellanet *et al.*, 2005; Avellanet, 2006).

El análisis de la *mismatch distribution* presentó una distribución unimodal (**figura 1**). Esta distribución, junto al valor negativo de F_s de Fu ($F_s = -90,39$; $p < 0,001$), sugiere que el genoma mitocondrial de la raza Xisqueta conserva todavía señales de expansiones poblacionales. La distribución unimodal de la *mismatch distribution* también indica que no hay grupos divergentes de haplotipos. El análisis filogenético de los haplotipos mostró una topología tipo *star like*, sin grupos definidos robustamente, sugiriendo que no hay diferencias apreciables entre comarcas y entre subpoblaciones (**figura 2**).

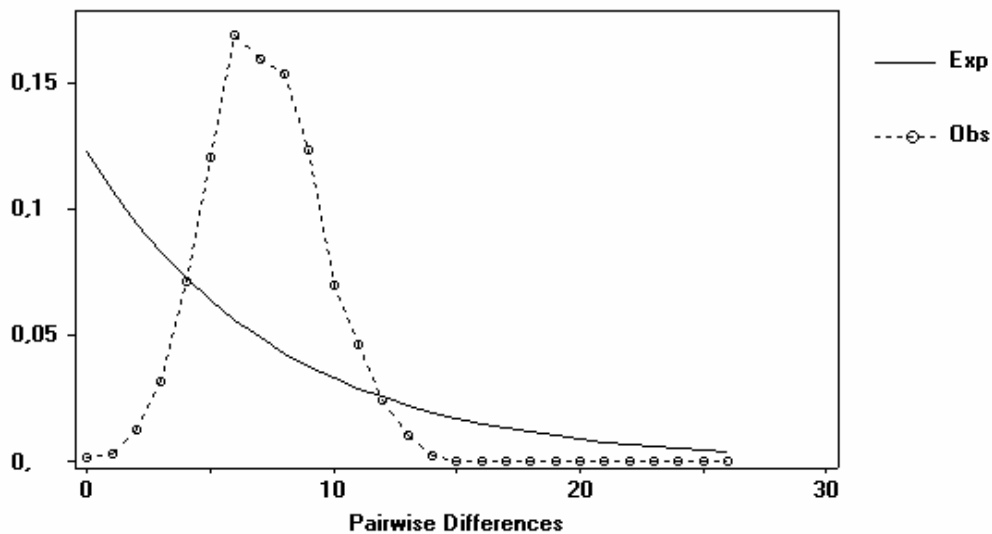


Figura 1. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (mismatch distribution) en la región control de la oveja Xisqueta. La línea continua representa la distribución esperada en el caso de una población estacionaria. La línea discontinua representa la distribución observada en la raza Xisqueta. (Frequency distribution of nucleotide differences number between pairs of sequences -mismatch distribution- in the control region of the Xisqueta sheep breed).

Tabla I. Distancias genéticas entre subpoblaciones de la raza Xisqueta, basadas en el modelo evolutivo Tamura-Nei ($\alpha= 0,12$). (Genetic distances between subpopulations of the Xisqueta breed, based in the evolutionary model by Tamura-Nei).

Subpoblación	JE	JF	JI	JP	JT	RB	RP	RS	SA	SE	SF	SS
JE-Esglésies												
JF-Vall Fosca	0,009											
JI-Isona	0,012	0,017										
JP-Pobla	0,011	0,015	0,015									
JT-Tamúrcia	0,009	0,013	0,015	0,014								
RB-Boí	0,015	0,018	0,016	0,017	0,017							
RP-Suert	0,013	0,017	0,016	0,016	0,016	0,017						
RS-Senet	0,011	0,015	0,014	0,014	0,013	0,016	0,015					
SA-Àssua	0,012	0,016	0,016	0,015	0,014	0,017	0,016	0,015				
SE-Esterri	0,009	0,015	0,015	0,015	0,014	0,018	0,015	0,014	0,015			
SF-Farrera	0,014	0,019	0,017	0,017	0,018	0,019	0,018	0,017	0,018	0,017		
SS-Sort	0,009	0,015	0,015	0,014	0,013	0,016	0,015	0,013	0,015	0,014	0,016	
HU-Isábena	0,009	0,015	0,015	0,014	0,013	0,016	0,015	0,013	0,014	0,013	0,016	0,013

En la **tabla I** se muestran los valores de distancia genética entre subpoblaciones, los cuáles fueron bajos y muy parecidos entre sí. El valor mayor ($D_{T-N}=0,019$) se encontró entre SF-Vall Farrera y RB-Vall de Boí, no siendo precisamente éstas las poblaciones más distantes geográficamente. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) no mostró evidencias de estructuración poblacional ya que toda la variabilidad (100%) se explicaba por diferencias entre individuos localizados en una misma población. Resultados similares se obtuvieron con el análisis de los marcadores microsatélites en esta misma raza (Avellanet *et al.*, 2005; Avellanet, 2006). En general, la oveja Xisqueta se distribuye en áreas de orografía muy accidentada; no obstante, este factor no ha sido motivo suficiente para que se puedan apreciar diferencias a nivel genético entre sus

subpoblaciones, sugiriendo que, en cierto modo hay, o antiguamente hubo, un activo intercambio de individuos reproductores entre explotaciones o que la raza se fundó a partir de un único *pool* génico. Como conclusión, tanto el análisis del genoma nuclear como mitocondrial nos confirman la gran uniformidad genética existente entre todas las subpoblaciones de la raza Xisqueta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. También se agradece a los criadores de oveja Xisqueta y a su asociación ACOXI, la ayuda y colaboración recibida durante el periodo de muestreo.

VARIABILIDAD GENÉTICA MITOCONDRIAL EN LA OVEJA XISQUETA

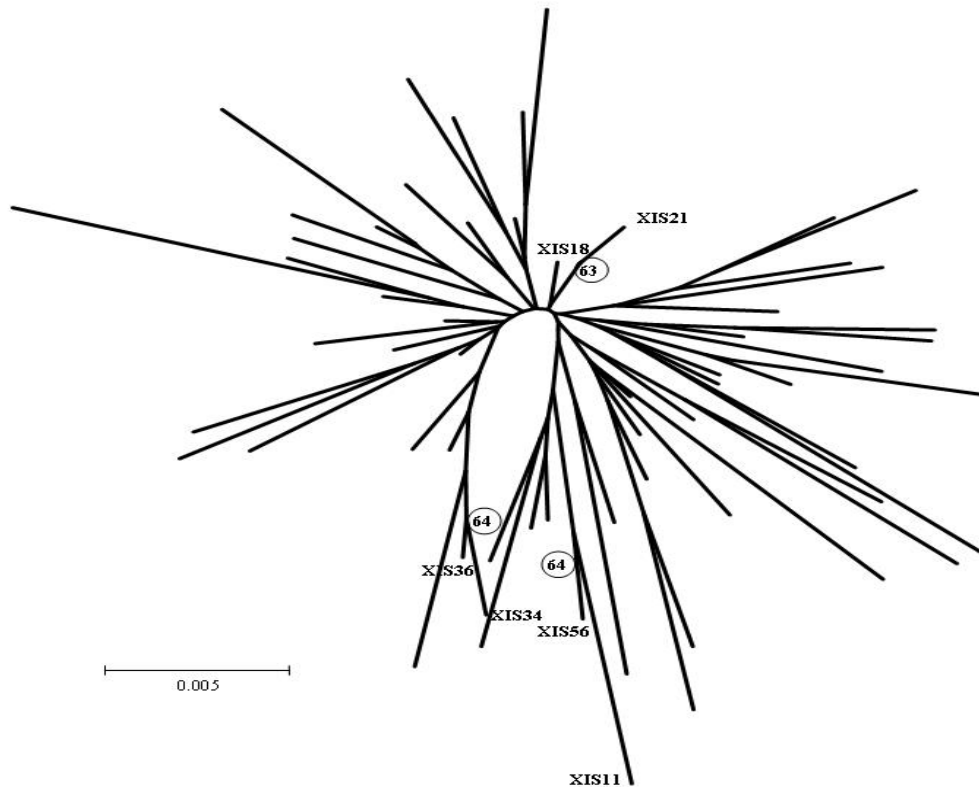


Figura 2. Árbol neighbor-joining de los 67 haplotipos de región control encontrados en la oveja Xisqueta. Sólo se muestran los valores de bootstrap (en círculos) superiores al 60% y los haplotipos que agruparon. Xis11 se localizó en JP-Pobla de Segur; Xis18 en JT-Torre de Tamúrcia; Xis21 en JT-Torre de Tamúrcia y SA-Vall d'Assua; Xis34 y Xis36 en RS-Senet; y Xis56 en SS-Sort. (Neighbor-joining tree of the 67 haplotypes of the control region found in the Xisqueta sheep breed).

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1989. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Avellanet, R., J. Marmi y J. Jordana. 2005. Análisis de la variabilidad genética intrarracial en la raza ovina xisqueta; una población en peligro de extinción. V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Montevideo (Uruguay). Libro de Resúmenes, pp. 104.
- Avellanet, R. 2006. Conservación de recursos genéticos ovinos en la raza Xisqueta: caracterización estructural, racial y gestión de la diversidad en programas *in situ*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Hall, T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological

MARMI, AVELLANE Y JORDANA

- sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hiendleder, S., H. Lewalski, R. Wassmuth and A. Janke. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.*, 47: 441-448.
- 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.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5: 150-163.
- Meadows, J.R.S., K. Li, J. Kantanen, M. Tapio, W. Sipos, V. Pardeshi, V. Gupta, J.H. Calvo, V. Whan, B. Norris and J.W. Kijas. 2005. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J. Hered.*, 96: 494-501.
- Meadows, J.R.S., I. Cemal, O. Karaca, E. Gootwine and J.W. Kijas. 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the Near East. *Genetics*, 175: 1371-1379.
- Pasboll, P.J. and P. Arctander. 1998. Primers for animal mitochondrial DNA: the importance of species-specific primers. In: A. Karp, P.G. Isaac, D.S. Ingram (Eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Chapman and Hall, London. pp. 249-255.
- Pereira, F., S.J.M. Davis, L. Pereira, B. McEvoy, D.G. Bradley and A. Amorim. 2006. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol. Biol. Evol.*, 23: 1420-1426.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-del Barrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- Strimmer, K. and A. von Haeseler. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 964-969.