

VARIABILIDAD DEL DNA MITOCONDRIAL EN RAZAS OVINAS IBÉRICAS*

MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY IN SPANISH SHEEP BREEDS

San Primitivo, F.¹, S. Pedrosa¹, J.J. Arranz¹, N.V. Brito², A. Molina³ y Y. Bayón^{**1}

¹Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. España. ****Autor correspondencia:** yolanda.bayon@unileon.es

²Departamento de Ciências e Recursos Animais. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico Viana do Castelo. Ponte de Lima. Portugal.

³Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Variabilidad genética. Región D-loop. Razas autóctonas.

ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic variability. D-loop region. Indigenous breeds.

RESUMEN

Se estudió la variabilidad en el DNA mitocondrial en distintas razas ovinas ibéricas y los resultados obtenidos se analizaron para cada uno de los cuatro troncos etnológicos. Se identificaron los tres linajes maternos conocidos como B, A y C. La diversidad nucleotídica promedio estimada para cada uno de los grupos ovinos fue menor para el tronco churro, intermedia para los grupos entrefino y merino, mientras que el tronco *ibérico* mostró la mayor diversidad mitocondrial. En el tronco *churro* todas las secuencias de DNA mitocondrial correspondieron al haplogrupo B, también denominado europeo, y entre sus razas la Latxa fue la de menor diversidad de todas las razas Ibéricas analizadas. En el tronco *entrefino* se identificaron unos pocos animales del linaje materno A, o asiático, en concreto en la raza española Manchega y en la portuguesa Serra da Estrela. En la agrupación *merina* se encontraron diferencias entre la raza Merino Branco y el

resto, mostrando la primera una diversidad nucleotídica muy superior, así como la presencia de algunos animales del linaje A. Por el contrario, en el resto de las poblaciones *merinas*, entre ellas el Merino puro español, se detectó una variabilidad moderada y sus animales pertenecían en todos los casos al linaje materno B. Finalmente, el tronco *ibérico* presentó el valor promedio más elevado de diversidad nucleotídica y en esta agrupación ovina se identificó el linaje materno C. La presencia de este tipo de DNA mitocondrial fue puesta de manifiesto en ambas razas representantes de este tronco, Montesina y Ojalada. Este resultado es de particular relevancia dado que este linaje materno ha sido descubierto no hace mucho tiempo y fundamentalmente en ovinos asiáticos.

SUMMARY

Mitochondrial DNA variability was studied in indigenous Iberian sheep and results analysed for each of the four morphological trunks. Three

*Este trabajo fue elaborado con financiación de los proyectos INIA-RZ02-015 e INIA-RZ03-019.

maternal lineages, B, A and C were identified. Mean nucleotide diversity for each of the ovine groups was estimated, showing a lower value for the *churro* trunk, intermediate values for *entrefino* and *merino* trunks, while the *iberian* group had the greatest mitochondrial diversity. Within the *churro* trunk all mitochondrial DNA sequences belonged to haplogroup B, also known as European type, and among *churro* breeds Latxa sheep showed the lowest diversity of all Iberian sheep analysed. A few animals of the *entrefino* trunk showed a maternal A, or Asiatic, lineage, namely Spanish Manchega and Portuguese Serra da Estrela sheep. In the *merino* group Merino Branco breed showed differences with the rest of sheep, particularly much greater nucleotide diversity and the presence of animals of maternal lineage A. On the other hand, moderate diversity was evident among the rest of *merino* populations, as it was the case of Spanish pure Merino for which all animals belonged to maternal lineage B. Finally, the *iberian* trunk showed the highest mean nucleotide diversity and in this group maternal lineage C was identified. The presence of this mitochondrial DNA type was evident in both breeds corresponding to this trunk: Montesina and Ojalada. This result is of particular relevance since this maternal lineage has been discovered quite recently and mainly in Asiatic ovines.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se han extendido las investigaciones sobre la variabilidad en el DNA mitocondrial, cuyo potencial para el análisis del origen materno de las poblaciones de animales domésticos ha quedado ampliamente demostrado (revisado por Bruford *et al.*, 2003 y por Zeder *et al.*, 2006). Las características del DNA mitocondrial (mtDNA) que lo convierten en una herramienta básica para

este tipo de estudios son: su herencia fundamentalmente materna, la ausencia de recombinación y el presentar una tasa de mutación elevada y relativamente constante. En el caso de la especie ovina, estas investigaciones se han desarrollado en menor escala que en otras especies domésticas y ha sido recientemente cuando han surgido nuevos datos que han contribuido a modificar de forma drástica anteriores hipótesis acerca del proceso de domesticación en esta especie, con el descubrimiento de nuevos linajes maternos que sugieren un origen multifilético en la oveja (Guo *et al.*, 2005; Pedrosa *et al.*, 2005; Tapio *et al.*, 2006). El objetivo del presente trabajo fue investigar la variabilidad en el DNA mitocondrial de las razas ovinas ibéricas, y analizar esta información en el contexto de los cuatro grupos ovinos que se diferencian desde el punto de vista etnológico: los troncos *churro*, *entrefino*, *merino* e *ibérico*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo DNA de las siguientes razas ovinas ibéricas: Alcarreña (n=30), Castellana (n=27), Churra (n=29), Churra Galega Bragançana (n=16), Churra Lebrijana (n=14), Latxa (n=29), Manchega (n=26), Merino (n=18), Merino Branco (MEB, n=16), Merino de Beira Baixa (MBB, n=16), Merino Preto (n=15), Montesina (n=17), Ojalada (n=16), Rasa Aragonesa (n=16), Segureña (n=16), Serra da Estrela (n=21) y Xalda (n=24).

Se amplificó mediante PCR el fragmento comprendido entre las posiciones 15437 y 16616 correspondiente a

DNA MITOCONDRIAL EN OVINO

la región D-loop del DNA mitocondrial. La descripción detallada de la metodología laboratorial puede consultarse en Pedrosa *et al.* (2005). Después de alinear la secuencia (mediante el programa *DNA alignment software* <http://www.fluxus-engineering.com/>), se calcularon diversos índices de variabilidad mediante la aplicación DnaSP 4.00. Utilizando el programa *network* 4.1.0.9 (www.fluxus-engineering.com) se obtuvo una representación de los haplotipos para el conjunto de los animales analizados, así como para cada uno de los troncos etnológicos ovinos. Se utilizaron como muestras de referencia las secuencias de GenBank DQ097431, DQ097451 y DQ097457, que corresponden a los tipos de DNA mitocondrial ovinos B, A y C (Pedrosa *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La representación *network* obtenida para el conjunto de las secuencias permitió identificar, en el ganado ovino

de la Península Ibérica, las tres clases de DNA mitocondrial denominadas B, A y C, tomando como base las muestras de referencia previamente indicadas. La mayor parte de las secuencias ovinas correspondieron al tipo B de mtDNA, también denominado tipo europeo. Un reducido número de animales presentaron el tipo A o asiático. Finalmente, fue posible identificar dos únicos animales cuyo DNA mitocondrial corresponde al denominado tipo C, descubierto recientemente (Guo *et al.*, 2005; Pedrosa *et al.*, 2005) y que hasta la fecha se ha encontrado fundamentalmente en ovinos asiáticos. En la **figura 1** se incluyen las representaciones *network* correspondientes a cada uno de los troncos ovinos. En esta representación se agrupan las secuencias que muestran el mismo haplotipo en nodos con un tamaño proporcional a su frecuencia, siendo la longitud de las líneas entre haplotipos proporcional a las diferencias entre las secuencias. En la **figura 1** aparecen diferenciados, con diferente sombreado, los tres linajes maternos y para los poco frecuen-

Tabla I. Número de animales (*n*), diversidad nucleotídica (*p*), número de haplotipos (*h*), diversidad haplotípica (*Hd*), sitios polimórficos (*S*) y frecuencia de los tipos de mtDNA para cada uno de los troncos de ganado ovino. (Number of animals (*n*), nucleotide diversity (*p*), haplotype number (*h*), haplotype diversity (*Hd*), polymorphic sites (*S*) and frequency of mtDNA types for each ovine trunk).

Troncos	n	p	h	Hd	S	Haplotipo A	Haplotipo B	Haplotipo C
Churro	112 (5)*	0,0071	89	0,987	55	-	1	-
Entrefino	136 (6)*	0,0087	114	0,995	84	0,02	0,98	-
Merino	65 (4)*	0,0081	57	0,996	57	0,03	0,97	-
Ibérico	33 (2)*	0,0116	30	0,991	47	0,03	0,91	0,06

*Número de razas entre paréntesis.

tes (A y C) se señalan las razas a que corresponde cada haplotipo. Por otro lado, en la **tabla I** se muestran los índices de diversidad calculados para cada uno de los troncos ovinos, así como la frecuencia de los tipos de mtDNA en cada grupo.

Se puede observar que la distribución de haplotipos en el linaje mayoritario, B, presenta en general un patrón que se denomina *starlike*, con un haplotipo central del que divergen otras formas, representando los procesos de mutación que han originado los distintos haplotipos. Este fue el único

haplogrupo identificado en el tronco *churro*, en el que se obtuvo la menor diversidad nucleotídica promedio ($p=0,0071$) con un rango de variación no muy amplio (desde 0,0047 en la raza Latxa a 0,0068 en la Xalda). Es de destacar que la raza Latxa fue la de menor variabilidad en el DNA mitocondrial entre todas las razas ovinas ibéricas analizadas, lo que coincidiría con los resultados descritos previamente al estudiar el DNA nuclear mediante marcadores microsatélites (Arranz *et al.*, 1998; 2001).

El patrón que se observa en la re-

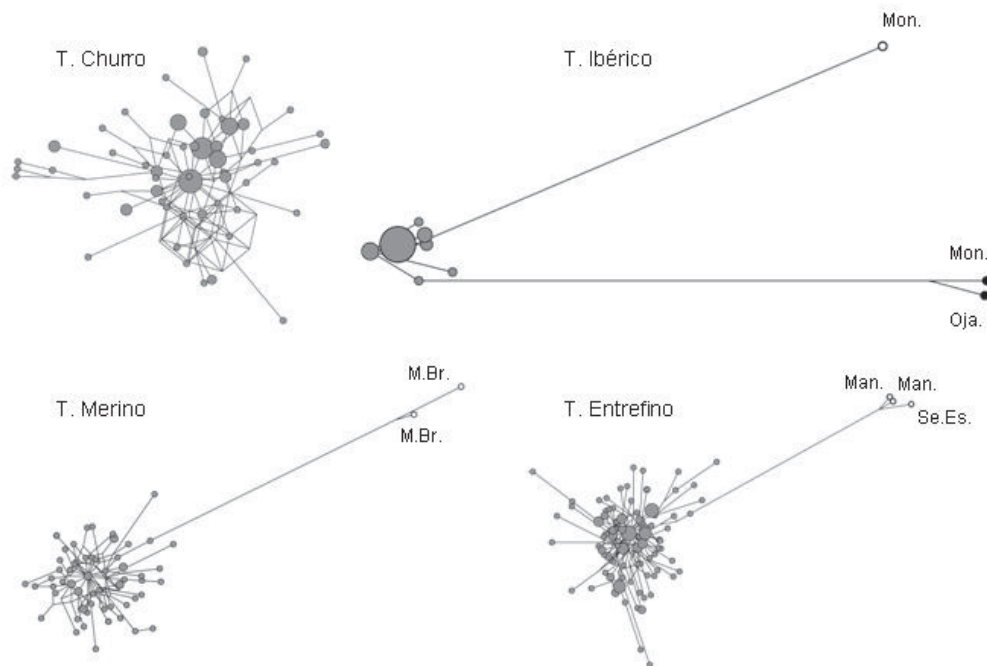


Figura 1. Representación “network” de los haplotipos identificados en cada uno de los troncos ovinos. Se diferencian, mediante sombreado los tres linajes maternos (B-gris, A-blanco, C-negro), y para los tipos A y C, se señalan las razas en las que se identificó cada haplotipo. (Network representation of the haplotypes identified in each ovine trunk. Shading differentiates the three maternal lineages (B-grey, A-white, C-black), and for types A and C, the breed for each haplotype is indicated).

DNA MITOCONDRIAL EN OVINO

presentación *network* (**figura 1**) en el caso del tronco *entrefino*, se corresponde con la identificación de tres haplotipos de la línea materna asiática (A) y que aparecen en la figura muy alejados del resto, indicando esta distancia una elevada diferencia en la secuencia de ambos tipos de mtDNA. Dos de estos animales eran de la raza española Manchega y un tercero de la portuguesa Serra da Estrela. La presencia del tipo de mtDNA asiático en los ovinos europeos había sido descrita con anterioridad y coincide con las propuestas de algunos autores que indican un elevado grado de flujo genético entre las poblaciones ovinas europeas y asiáticas (Meadows *et al.*, 2005). La variabilidad mitocondrial promedio en el tronco *entrefino* ($p=0,0087$) fue algo superior a la indicada para el grupo *churro*, con un rango de variación no muy amplio como en aquél (entre 0,0066 en la raza Segureña y 0,0098 en la Manchega). Los valores más elevados correspondieron, como era de esperar, a las dos razas en que se identificó la línea materna A.

La situación fue distinta para el tronco ovino *merino*, respecto a los anteriormente citados, dado que presentó una diversidad nucleotídica intermedia ($p=0,0081$), pero un elevado grado de variación entre las razas (desde 0,0055 en Merino de Beira Baixa hasta 0,0141 en Merino Branco). Esta última raza presentó una variabilidad

en el DNA mitocondrial muy superior al resto de las integrantes del tronco *merino*, siendo su diversidad nucleotídica la más elevada de las calculadas entre todas las razas ibéricas analizadas. Además, a diferencia de las otras tres razas pertenecientes al tronco *merino*, en el Merino Branco se identificaron animales correspondientes a la línea materna asiática. Estos resultados permiten confirmar que esta agrupación ha recibido influencias de otros ovinos no representantes del *merino* puro, tal y como indican los datos históricos recientes, que admiten cruzamientos durante el siglo XX, con otras poblaciones de *merino* mejorado como el francés Rambouillet (Sobral *et al.*, 1991).

Finalmente, ambas razas del tronco *ibérico* presentaron una elevada variabilidad ($p=0,0133$ en Montesina y $p=0,0101$ en Ojalada), con lo que su promedio (0,0116) señala a este grupo como el de mayor diversidad mitocondrial entre los troncos ovinos. Es precisamente en el tronco *ibérico* donde se obtuvieron los resultados más interesantes de este estudio, debido a la identificación en ambas razas del tipo mitocondrial C, de reciente descubrimiento. Además, hay que destacar que una de las razas de este tronco, la Montesina, fue la única de todos los ovinos de la Península en la que se identificaron los tres linajes maternos B, A y C.

BIBLIOGRAFÍA

Arranz, J.J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 1998
Genetic relationships among Spanish sheep

using microsatellites. *Anim. Genet.*, 29: 435-440.

SAN PRIMITIVO, PEDROSA, ARRANZ, BRITO, MOLINA Y BAYÓN

- Arranz, J.J., Y. Bayón and F. San Primitivo. 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Sel. Evol.*, 33: 529-542.
- Bruford, M.W., D.G. Bradley and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev. Genet.*, 4: 900-910.
- Guo, J., L.X. Du, Y.H. Ma, W.J. Guan, H.B. Li, Q.J. Zhao, X. Li, S.Q. Rao. 2005. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim. Genet.*, 36: 331-336.
- Meadows, J.R.S., K. Li, J. Kantanen, M. Tapio, W. Sipos, V. Pardeshi, V. Gupta, 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.
- Pedrosa, S., M. Uzun, J.J. Arranz, B. Gutiérrez-Gil, F. San Primitivo and Y. Bayón. 2005. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 272: 2211-2217.
- Sobral, M., C. Antero, J.D. Borrego y A.N. Domingos. 1991. Recursos genéticos. Raças autóctones. Espécies ovina e caprina. Associação de Criadores de Ovinos do Sul. Portugal.
- Tapio, M., N. Marzanov, M. Ozerov, M. Cinkulov, G. Gonzarzenko, T. Kiselyova, M. Murawski, H. Viinalass and J. Kantanen. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian and Central Asian areas. *Mol. Biol. Evol.* DOI: 10.1093/molbev/msl043.
- Zeder, M.A., E. Emshwiller, B.D. Smith and D. Bradley. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology, *Trends in Genetics*, 22: 139-155.