

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA VACA DE LA REINA CON MICROSATÉLITES DE ADN



Foto: <http://imatgesdemenorca-magda.blogspot.com.es/2013/12/vaques-de-la-reina-150-anys-de-la-seva.html>

Amparo Martínez Martínez^{1,2}, Juan Vicente Delgado Bermejo²

¹Laboratorio de Genética Molecular Aplicada. Animal Breeding Consulting, S.L. Córdoba (España)

²Grupo de Investigación “Mejora y Conservación de los Recursos Genéticos de los Animales Domésticos” (AGR-218) Plan Andaluz de Investigación. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba (España)

15-junio-2017

INDICE

INDICE.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	4
METODOLOGÍA.....	4
Muestreo	4
Análisis de las muestras	6
Diversidad genética intra-racial:	7
Diversidad genética inter-racial:	7
Estructura genética:.....	8
RESULTADOS	8
Diversidad genética intra-racial	8
Diversidad genética inter-racial	12
Estructura genética.....	16
CONCLUSIONES.....	20
BIBLIOGRAFIA	20

INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es la variación de la vida en todas sus formas, niveles y combinaciones, incluyendo la diversidad genética, la diversidad en las especies y la diversidad en los ecosistemas. La pérdida de biodiversidad producida durante el último siglo debe tenerse en cuenta y alertar tanto a individuos como a instituciones para tomar medidas que eviten que esta pérdida continúe (FAO, 2000). La diversidad genética es un valor que condiciona otros muchos como son la adaptación y la viabilidad de una especie o raza a entornos muy variables y por es fundamental a la hora de plantear estrategias de conservación.

Cuando se plantea desarrollar un programa de conservación, las razas a conservar presentan escasos censos, nula estructura y son prácticamente desconocidas desde el punto de vista técnico-científico. Uno de los primeros pasos a seguir sería crear las estructuras necesarias para la recogida, clasificación y almacenamiento de información referente a las relaciones de parentesco entre los animales de la población, además de la información morfológica.

Los microsatélites de ADN son los marcadores recomendados en los estudios de genética de poblaciones y son los marcadores de elección para conseguir, no sólo un método fiable de identificación individual y de control de las genealogías, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas, así como para realizar asignaciones de individuos a razas con altos grados de fiabilidad. Con la información obtenida del estudio de las variantes de cada microsatélite se calcula el grado de heterocigosidad, es decir, de variabilidad que presenta cada uno de estos marcadores y la que se puede deducir del conjunto de ellos. Esto permite realizar estudios comparativos entre diferentes poblaciones y determinar la distancia genética que hay entre las mismas en función de las variantes detectadas. Algunas ventajas de los microsatélites son su distribución aleatoria por el genoma, su polimorfismo, su herencia codominante, además pueden ser caracterizados a partir de cantidades pequeñas de ADN y utilizados por distintos laboratorios a través de la difusión de las publicaciones de secuencias de cebadores.

En el presente informe se presentan los resultados de los estudios de la diversidad genética intrarracial de la Vaca de la Reina, así como sus relaciones genéticas con otras razas bovinas. Este estudio tiene como objetivo conocer los niveles de heterocigosis para observar la evolución de los niveles de consanguinidad en esta población sometida a un programa de recuperación. Se estudia también la posible subestructura de la población lo que permitirá encaminar las actuaciones de gestión en años sucesivos.

OBJETIVOS

1. Estudio de la diversidad genética intrarracial de la Vaca de la Reina con 33 microsatélites recomendados por la FAO.
2. Estudio de distancias genéticas con otras razas bovinas.
3. Estudio de la subestructura genética de la población.

METODOLOGÍA

Muestreo

Se han analizado 27 muestras pelo de Vaca de la Reina (Tabla 1). Las muestras se han recibido en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada y Caracterización de la empresa de base tecnológica Animal Breeding Consulting, S.L. (ABC), en la Universidad de Córdoba y se le ha asignado a cada una un número de laboratorio.

Tabla 1.- Muestras de Vaca de la Reina analizadas.

	Nº MUESTRA	IDENTIFICACIÓN	SEXO	F. NAC.	GANADERÍA
1	796296	ES020402180467	H	06/08/2010	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
2	796297	ES000402209761	H	18/10/2011	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
3	796298	ES080402011292	H	11/04/2013	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
4	796299	ES090402195770	H	19/10/2010	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
5	796300	ES060402219658	H	22/09/2013	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
6	796301	ES080402255096	H	22/09/2015	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
7	796302	ES010402222985	H	06/06/2013	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
8	796303	ES050402254318	H	12/07/2015	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
9	796304	ES000402255098	H	10/10/2015	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
10	796305	ES090402255097	H	04/10/2015	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
11	796306	ES030402256594	H	18/12/2015	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
12	796307	ES090402215717	H	26/12/2012	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
13	796308	ES040402277370	H	16/11/2016	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
14	796309	ES020402275816	H	20/11/2016	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
15	796310	ES030402259366	H	01/09/2016	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
16	796311	ES050402275819	M	18/11/2016	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
21	796316	ES030402213839	H	03/09/2012	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
22	796317	ES020402277823	M	20/01/2017	SON VICENT (ES07015-IB-0168)
18	796313	ES060402276506	H	30/10/2016	SON VIDAL DE GRANADA (ES07902-IB-06)
19	796314	ES010402252590	H	24/11/2014	SON VIDAL DE GRANADA (ES07902-IB-06)
20	796315	ES020402178809	H	23/08/2010	SON VIDAL DE GRANADA (ES07902-IB-06)
17	796312	ES090402254469	M	10/05/2015	SON XORIGUER (ES07015-IB-0169)
23	796318	ES070402282612	H		SO NA JAUME NOU (040-IB-0192)
24	796319	ES040402233656	H		SO NA JAUME NOU (040-IB-0192)
25	796320	ES060402209767	M		SO NA JAUME NOU (040-IB-0192)
26	796321	ES050402233657	H		SO NA JAUME NOU (040-IB-0192)
27	796322	ES030402213771	H		SO NA JAUME NOU (040-IB-0192)

Para los estudios de diferenciación genética, estructura y distancia genética se han utilizado además otras 32 razas bovinas de la base de datos del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada de Animal Breeding Consulting S.L. y del proyecto BioBovis (<https://biobovis.jimdo.com/>). El número de marcadores empleados en este estudio de comparación con otras razas es 19. En la tabla 2 se muestran las poblaciones utilizadas, su acrónimo y el número de individuos analizados de cada población.

Tabla 2.- Razas bovinas incluidas en el estudio

RAZA/POBLACIÓN	ACRÓNIMO	Nº MUESTRAS	RAZA/POBLACIÓN	ACRÓNIMO	Nº MUESTRAS
1 Vaca de la Reina	VR	27	18 Bruna de los Pirineos	BRP	46
2 Menorquina	MEN	43	19 Pasiéga	PAS	50
3 Mallorquina	MALL	50	20 Berrenda en Colorado	BC	40
4 Betizu	BET	43	21 Berrenda en Negro	BN	30
5 Monchina	MON	50	22 Marismeña	MAR	50
6 Toro de Lidia	TL	49	23 Pajuna	PAJ	38
7 Alistana	ALS	50	24 Negra Andaluza	NAN	50
8 Tudanca	TUD	50	25 Vaca Canaria	VCA	48
9 Asturiana de los Valles	ASV	50	26 Vaca Palmera	PAL	50
10 Asturiana de las Montañas	ASM	50	27 Aberdeen Angus	AA	62
11 Retinta	RET	50	28 Parda Suiza	BWS	28
12 Morucha	MOR	50	29 Charolais	CHAR	58
13 Avileña	AVI	50	30 Holstein	HOL	50
14 Pirenaica	PIRM	50	31 Limousin	LIM	47
15 Rubia Gallega	RGA	50	32 Simmental	SIM	19
16 Serrana de Teruel	STE	50	33 Galveich	GB	26
17 Parda de Montaña	PM	50			

Análisis de las muestras

El ADN se ha extraído de muestras de pelo mediante el método de Walsh y cols. (1991) y se han amplificado 33 microsatélites recomendados por la FAO para estudios de diversidad bovina (BM1818, BM1824, BM2113, BM8125, CRSM60, CSSM66, ETH003, ETH010, ETH185, ETH225, HAUT24, HAUT27, HEL09, HEL13, ILSTS006, ILSTS011, INRA023, INRA032, INRA035, INRA037, INRA063, MGTG04, MGTG07, MM12, RM067, SPS113, SPS115, TGLA048, TGLA053, TGLA057, TGLA122, TGLA126 y TGLA227).

Tras la amplificación de los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realiza la separación por tamaños de los fragmentos amplificados con una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador capilar ABI 3130XL. El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas

informáticos Genescan Analysis® 3.1.2 y Genotyper® 2.5.2 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños. Nuestro Laboratorio participa en las Pruebas de Intercomparación que organiza la International Society of Animal Genetics (ISAG) y el Laboratorio Central de Veterinaria del Ministerio de Agricultura y Pesca, de Alimentación y Medio Ambiente, por lo que los resultados obtenidos son válidos tanto a nivel nacional como internacional.

Diversidad genética intra-racial:

Se ha calculado el número medio de alelos por locus (MNA), las frecuencias alélicas, las heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) y el contenido de información polimórfica (PIC) con el programa MICROSATELLITE TOOLKIT software para Excel (Park, 2001). Se ha calculado el número efectivo de alelos con el programa PopGene (Yeh and Boyle, 1997). Los valores de F_{IS} (coeficiente de consanguinidad) con un intervalo de confianza del 95% se han calculado con el programa informático GENETIX v. 4.05 (Belkhir et al., 2003) y se ha realizado una prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) usando el programa GENEPOP v. 3.1c (Raymond and Rousset, 1995), que aplica el test exacto de Fisher usando el método en cadena de Monte Carlo Markov (Guo and Thompson, 1992) y la corrección de Bonferroni.

Diversidad genética inter-racial:

Para este estudio se ha incluido la Vaca de la Reina en un estudio más amplio que comprende 25 razas autóctonas de España, además de otras 7 razas europeas (Tabla 2). Se han calculado los estadísticos F de Wright (Wright, 1969): el coeficiente de consanguinidad F_{IT} (coeficiente de consanguinidad de cada individuo con respecto a la población total), el coeficiente de diferenciación genética F_{ST} (el efecto de las subpoblaciones en comparación con la población total) y F_{IS} (coeficiente de endogamia de cada individuo en relación a la subpoblación a la que pertenece). Estos estadísticos se han calculado mediante el programa GENETIX (Belkhir et al. 2003).

Se ha realizado un Análisis Factorial de Correspondencia con el programa GENETIX (Belkhir et al. 2003). Se han calculado la distancias genética D_A (Nei et al. 1983) con el programa informático POPULATIONS (Langella, 1999). Con los valores de distancia obtenidos se ha realizado un Neighbor-Net mediante el programa SPLITSTREE (Huson and Bryant, 2006) para representar gráficamente las relaciones genéticas entre las razas.

Estructura genética:

Se ha realizado un análisis de la subestructura genética de la Vaca de la Reina utilizando un algoritmo bayesiano del programa de análisis STRUCTURE v 2.1 (Pritchard et al., 2000), que emplea un modelo basado en método de cadenas Markov de Monte Carlo para estimar la distribución *a posteriori* del coeficiente de mezcla de cada individuo (q).

RESULTADOS

Diversidad genética intra-racial

En la tabla 3 se recogen las frecuencias alélicas (FA), expresadas en porcentajes, de los 33 microsatélites en la población estudiada. Todos los marcadores han sido polimórficos y se han observado entre un mínimo de 2 alelos en los marcadores HEL13, INRA35 y TGLA126; y un máximo de 9 alelos en el marcador TGLA122. Se observa en general una moderada diversidad alélica.



Tabla 3.- Frecuencias alélicas de 33 microsatélites en la Vaca de la Reina.

LOCUS/ALELO	FA	LOCUS/ALELO	FA	LOCUS/ALELO	FA	LOCUS/ALELO	FA	LOCUS/ALELO	FA
BM1818		ETH10		HEL13		MGTG04		TGLA48	
258	16,67	213	9,26	188	88,89	135	3,70	73	55,56
262	9,26	217	1,85	192	11,11	141	20,37	75	31,48
266	50,00	219	40,74	ILSTS6		143	31,48	77	12,96
268	24,07	221	16,67	293	25,93	145	25,93	TGLA53	
BM1824		223	25,93	295	29,63	147	3,70	152	1,85
180	62,96	225	5,56	297	16,67	149	5,56	160	16,67
182	16,67	ETH185		299	16,67	151	1,85	162	1,85
188	18,52	222	1,85	301	11,11	153	7,41	164	29,63
190	1,85	228	1,85	ILSTS011		MGTG07		166	7,41
BM2113		230	20,37	266	1,85	291	35,19	168	14,81
125	20,37	232	25,93	268	24,07	293	14,81	176	25,93
127	7,41	234	50,00	270	74,07	309	50,00	182	1,85
131	1,85	ETH225		INRA23		MM12		TGLA057	
133	11,11	140	1,85	200	1,85	177	12,96	96	59,26
135	35,19	146	1,85	202	5,56	179	7,41	98	35,19
137	11,11	148	20,37	206	22,22	191	79,63	100	1,85
139	12,96	150	53,70	210	38,89	RM067		102	3,70
BM8125		152	22,22	214	31,48	90	29,63	TGLA122	
110	1,85	HAUT24		INRA32		92	9,26	141	12,96
116	66,67	104	24,07	177	1,85	94	18,52	143	29,63
122	9,26	114	5,56	179	1,85	96	1,85	149	18,52
124	22,22	120	64,81	181	35,19	98	12,96	151	3,70
CRSM60		122	5,56	183	7,41	102	27,78	153	1,85
91	24,07	HAUT27		185	53,70	SPS113		155	1,85
95	11,11	128	1,85	INRA35		139	3,70	163	22,22
97	9,26	130	3,70	77	40,74	141	1,85	171	7,41
99	1,85	140	1,85	79	59,26	147	9,26	173	1,85
101	53,70	142	20,37	INRA37		149	3,70	TGLA126	
CSSM66		148	29,63	127	25,93	151	64,81	115	20,37
183	5,56	150	22,22	129	9,26	153	16,67	117	79,63
185	40,74	154	20,37	131	64,81	SPS115		TGLA227	
189	16,67	HEL9		INRA63		248	24,07	81	16,67
193	1,85	152	40,74	173	74,07	250	5,56	83	29,63
197	35,19	160	16,67	175	24,07	252	20,37	87	1,85
ETH3		162	7,41	183	1,85	254	5,56	89	7,41
117	35,19	164	31,48			256	35,19	91	18,52
119	12,96	168	3,70			258	5,56	93	20,37
127	3,70					260	3,70	97	3,70
129	48,15							103	1,85

En la tabla 4 se recogen los valores obtenidos de Heterocigosidad esperada, Heterocigosidad observada, Contenido de Información Polimórfica (PIC), los valores del estadístico Fis con sus desviaciones estándar y los marcadores desviados del equilibrio Hardy-Weinberg. Por los valores de PIC obtenidos, la mayoría de los marcadores son muy informativos ($PIC > 0,5$) siendo 10 de ellos medianamente informativos (PIC entre 0,25 y 0,50) sólo uno poco informativo (HEL13, $PIC = 0,178$).

Tras la corrección de Bonferroni, ningún marcador está desequilibrado en esta población. Siete marcadores muestran un defecto significativo de homocigotos mientras que el resto de los microsatélites muestran valores no significativamente diferentes de 0.

El promedio de alelos en una población (Tabla 4) indica en cierta manera la variabilidad genética de las poblaciones. Este número medio de alelos es moderado (4,85) en la Vaca de la Reina, con un número efectivo de alelos de 2,98. Este número medio de alelos es similar al encontrado en la Vaca Mallorquina (Martín-Burriel et al. 2011) y es inferior al mostrado en otras razas bovinas españolas y portuguesas. Estos valores son también inferiores a los encontrados en razas bovinas europeas (Martínez et al. 2012), aunque superiores a los hallados en algunas razas locales europeas (European Cattle Genetic Diversity Consortium 2006). Otra manera de apreciar la diversidad genética es mediante la proporción de individuos heterocigotos presentes o heterocigosidad. En la tabla 4 se recogen los valores de heterocigosidad media esperada ($H_e=0,619$) y heterocigosidad media por recuento directo ($H_o=0,632$) en esta población. El promedio de alelos y los valores de heterocigosidad indican que la Vaca de la Reina muestra una diversidad genética moderada-alta. El valor de F_{IS} con un intervalo de confianza al 95% con 1000 remuestreos es de -0.019 (-0,095-0,016), aunque no es significativo, lo que indica que la población no muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Se detecta un exceso de heterocigotos, aunque no es estadísticamente significativo.

A la vista de los resultados encontrados, se puede concluir que la Vaca de la Reina presenta una moderada-alta diversidad genética intra-racial, con valores de diversidad similares a los encontrados en otras razas bovinas españolas, aunque inferior a algunas razas europeas como Frisona, Charolais o Limousine (Martínez et al. 2012). La raza no se desvía significativamente del Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4.- Parámetros genéticos de la Vaca de la Reina: Microsatélites analizados, número de alelos detectados, Número efectivo de alelos (Ae), Heterocigosidades esperada insesgada (He) y observada (Ho), Contenido de Información Polimórfica (PIC), valores de Fis, su intervalo de confianza y las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE_d).

Microsatélite	N° Alelos	Ae	He	Ho	PIC	F _{IS}	F _{IS} IC	HWE _d
BM1818	4	2,90	0,668	0,704	0,604	-0,283	-0,458- -0,127	NS
BM1824	4	2,18	0,551	0,704	0,490	0,064	-0,229-0,342	ND
BM2113	7	4,70	0,802	0,889	0,760	-0,022	-0,269-0,201	ND
BM8125	4	1,99	0,507	0,593	0,445	-0,054	-0,289-0,164	ND
CRSM60	5	2,72	0,644	0,667	0,584	-0,116	-0,341-0,087	NS
CSSM66	5	3,12	0,692	0,519	0,620	-0,110	-0,260-0,024	ND
ETH003	4	2,68	0,638	0,704	0,556	0,022	-0,183-0,211	NS
ETH010	6	3,66	0,741	0,815	0,685	-0,173	-0,374 --0,001	ND
ETH185	5	2,78	0,653	0,667	0,580	-0,105	-0,359-0,124	NS
ETH225	5	2,63	0,632	0,704	0,563	-0,018	-0,323-0,296	NS
HAUT24	4	2,07	0,526	0,444	0,461	-0,208	-0,466-0,037	ND
HAUT27	7	4,50	0,792	0,741	0,742	0,157	-0,202-0,463	ND
HEL09	5	3,34	0,713	0,852	0,649	-0,106	-0,209- -0,019	ND
HEL13	2	1,25	0,201	0,222	0,178	0,066	-0,154-0,259	ND
ILSTS006	5	4,49	0,792	0,852	0,741	-0,198	-0,385- -0,037	ND
ILSTS011	3	1,65	0,400	0,370	0,329	-0,167	-0,292- -0,076	ND
INRA023	5	3,30	0,710	0,769	0,641	0,076	-0,277-0,444	ND
INRA032	5	2,39	0,593	0,741	0,505	-0,035	-0,250-0,162	NS
INRA035	2	1,93	0,492	0,370	0,366	0,015	-0,210-0,206	ND
INRA037	3	2,02	0,514	0,481	0,439	-0,077	-0,269-0,101	ND
INRA063	3	1,65	0,400	0,407	0,329	-0,044	-0,304-0,184	ND
MGTG04	8	4,56	0,795	0,778	0,748	0,053	-0,283-0,356	ND
MGTG07	3	2,53	0,616	0,741	0,526	0,588	0,302-0,854	NS
MM12	3	1,52	0,350	0,407	0,315	0,254	-0,026-0,502	ND
RM067	6	4,45	0,790	0,778	0,740	-0,156	-0,311- -0,021	ND
SPS113	6	2,18	0,551	0,556	0,507	-0,091	-0,252-0,052	ND
SPS115	7	4,28	0,781	0,630	0,732	-0,256	-0,529- -0,004	ND
TGLA048	3	2,36	0,586	0,556	0,501	-0,238	-0,405- -0,106	NS
TGLA053	8	4,73	0,804	0,926	0,758	-0,009	-0,224-0,152	ND
TGLA057	4	2,10	0,533	0,222	0,435	0,097	-0,122-0,289	ND
TGLA122	9	5,10	0,819	0,741	0,777	-0,102	-0,301-0,066	ND
TGLA126	2	1,48	0,331	0,407	0,272	0,196	-0,048-0,407	ND
TGLA227	8	5,03	0,816	0,889	0,773	0,251	-0,149-0,583	ND
Media	4,85	2,98	0,619	0,632	0,556	-0,019	(-0,095-0,016)	

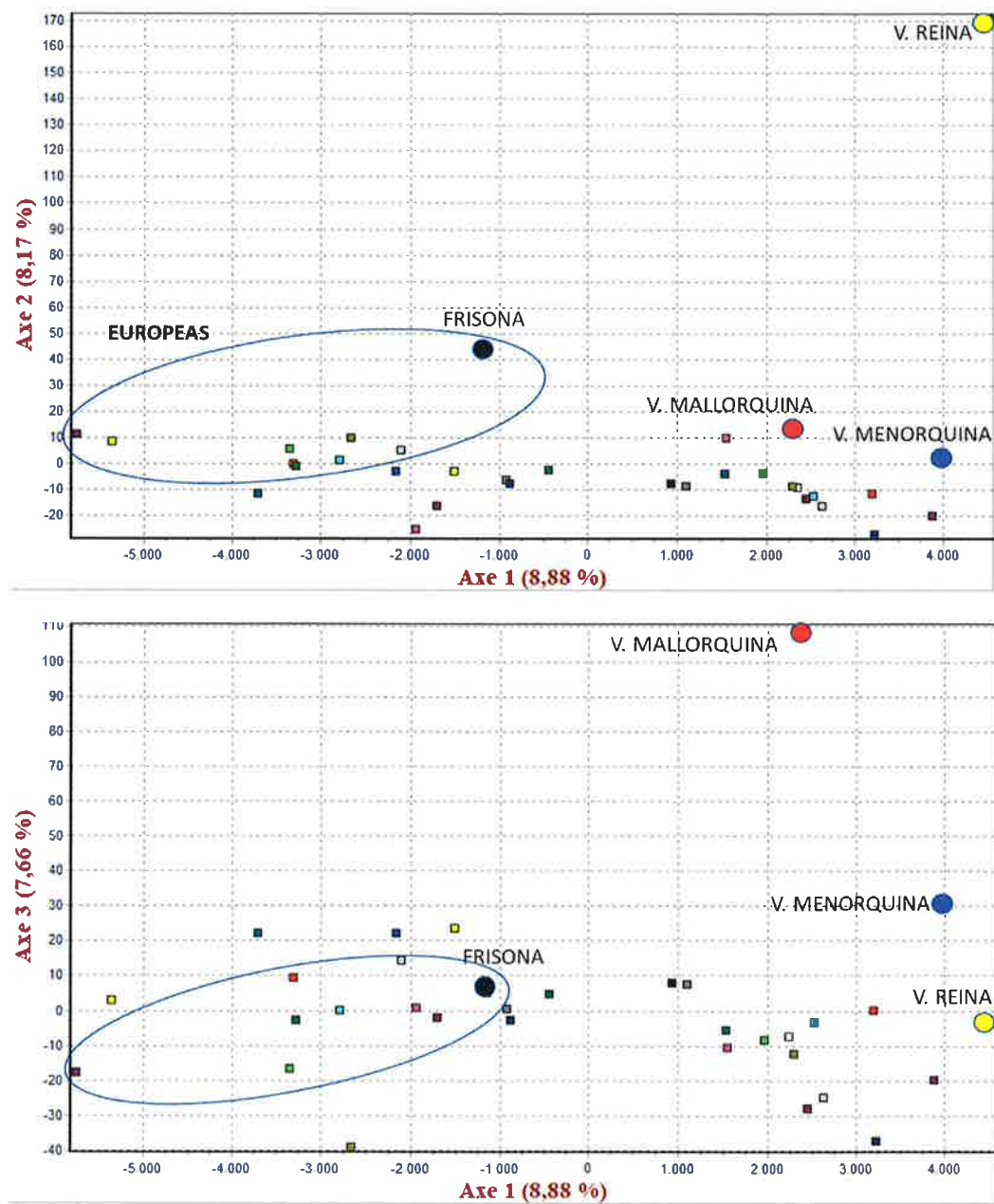
NS: No significativo; ND: No determinado.

Diversidad genética inter-racial

La diferenciación genética entre las 33 poblaciones bovinas incluidas en el estudio es moderada, con los siguientes valores de estadísticos F: $FIS=0,038$ (0,026-0,051), $FIT=0,129$ (0,111-0,150) y $FST=0,094$ (0,079-0,114). Estos valores son similares a los encontrados entre razas bovinas de España y Portugal (Martín-Burriel et al. 2011) y son ligeramente superiores a los encontrados en razas bovinas americanas (Delgado et al. 2012).

Los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (Figura 1) muestran que en el eje 1 se diferencian las razas europeas de las españolas, algunas razas españolas se agrupan con las europeas en este eje. Con el eje 2 es posible diferenciar la raza Frisona del resto de las razas y sobre todo se marca la gran diferencia de la Vaca de la Reina de todas las demás. En el eje 3, es la vaca Mallorquina la que se diferencia de todas las demás.

Figura 1.- Análisis Factorial de Correspondencia entre 33 poblaciones bovinas.



La matriz de distancias genéticas D_A y los valores de F_{ST} (coeficiente de diferenciación genética) entre pares de poblaciones están recogidos en la tabla 5. En

negrita están resaltados los valores de la Vaca de la Reina con el resto. Los valores más altos en ambos casos (subrayados) son con la vaca Mallorquina y, en el caso de la distancia genética, con la Berrenda en Negro. La elevada distancia genética con la vaca Mallorquina podría deberse en realidad al efecto de la deriva genética o la alta endogamia existente en la vaca Mallorquina. La menor distancia genética de la Vaca de la Reina es con la Frisona.

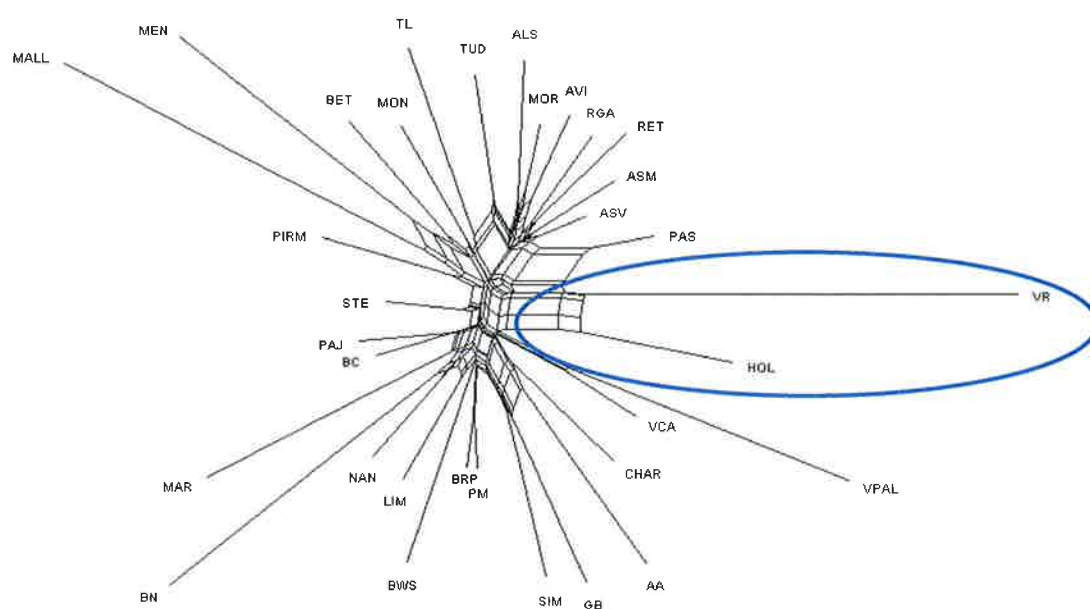


Tabla 5.- Distancias genéticas D_A (debajo de la diagonal) y de F_{ST} (encima de la diagonal) entre pares de poblaciones.

	VR	MEN	MALL	BET	MON	TL	ALS	TUD	ASV	ASM	RET	MOR	AVI	PIRM	RGA	STE	PM	BRP	PAS	BC	BN	MAR	PAJ	NAN	VCA	VPAL	AA	BWS	CHAR	HOL	LIM	SIM	GB
VR	0,00	0,18	0,24	0,14	0,12	0,18	0,17	0,17	0,12	0,14	0,14	0,13	0,15	0,14	0,14	0,12	0,15	0,15	0,12	0,13	0,22	0,23	0,15	0,17	0,14	0,21	0,18	0,15	0,16	0,13	0,13	0,16	0,17
MEN	0,34	0,00	0,19	0,11	0,13	0,17	0,16	0,15	0,11	0,13	0,12	0,13	0,14	0,12	0,12	0,11	0,13	0,13	0,12	0,13	0,19	0,22	0,14	0,15	0,13	0,24	0,17	0,15	0,16	0,16	0,14	0,17	0,17
MALL	0,38	0,31	0,00	0,14	0,17	0,20	0,18	0,19	0,14	0,15	0,16	0,14	0,13	0,14	0,15	0,14	0,13	0,14	0,16	0,13	0,22	0,20	0,15	0,16	0,14	0,23	0,22	0,15	0,17	0,16	0,14	0,20	0,18
BET	0,30	0,21	0,26	0,00	0,06	0,08	0,10	0,09	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,06	0,07	0,09	0,09	0,05	0,13	0,15	0,07	0,09	0,07	0,15	0,12	0,10	0,10	0,11	0,08	0,10	0,10
MON	0,26	0,22	0,32	0,13	0,00	0,10	0,09	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,04	0,08	0,09	0,07	0,05	0,14	0,15	0,07	0,10	0,06	0,15	0,12	0,09	0,09	0,09	0,06	0,10	0,11
TL	0,30	0,23	0,31	0,16	0,15	0,00	0,12	0,10	0,08	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,12	0,09	0,11	0,12	0,10	0,08	0,19	0,16	0,11	0,12	0,09	0,18	0,13	0,15	0,12	0,15	0,11	0,15	0,16
ALS	0,34	0,27	0,33	0,19	0,16	0,19	0,00	0,07	0,05	0,05	0,06	0,04	0,05	0,09	0,06	0,07	0,09	0,10	0,07	0,06	0,13	0,15	0,07	0,08	0,07	0,13	0,13	0,10	0,10	0,10	0,08	0,10	0,11
TUD	0,33	0,23	0,31	0,16	0,13	0,15	0,14	0,00	0,04	0,05	0,07	0,05	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08	0,10	0,07	0,07	0,13	0,17	0,08	0,09	0,08	0,14	0,13	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,14
ASV	0,26	0,19	0,27	0,16	0,11	0,15	0,12	0,10	0,00	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,05	0,06	0,02	0,03	0,11	0,12	0,04	0,05	0,05	0,12	0,10	0,06	0,07	0,06	0,05	0,07	0,08
ASM	0,29	0,23	0,27	0,17	0,14	0,14	0,12	0,11	0,07	0,00	0,04	0,03	0,04	0,05	0,04	0,05	0,07	0,08	0,03	0,05	0,13	0,13	0,05	0,07	0,06	0,13	0,10	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08	0,10
RET	0,31	0,23	0,31	0,17	0,16	0,18	0,13	0,14	0,09	0,10	0,00	0,03	0,04	0,05	0,04	0,05	0,07	0,08	0,04	0,04	0,12	0,14	0,05	0,06	0,06	0,14	0,10	0,07	0,08	0,09	0,07	0,08	0,08
MOR	0,30	0,25	0,28	0,16	0,14	0,18	0,09	0,12	0,10	0,10	0,00	0,02	0,06	0,06	0,04	0,05	0,07	0,08	0,04	0,04	0,11	0,13	0,04	0,06	0,06	0,11	0,11	0,07	0,06	0,08	0,06	0,07	0,09
AVI	0,31	0,25	0,25	0,18	0,15	0,17	0,12	0,13	0,09	0,10	0,12	0,08	0,00	0,07	0,03	0,05	0,08	0,08	0,04	0,04	0,13	0,14	0,05	0,05	0,07	0,14	0,11	0,08	0,07	0,08	0,06	0,09	0,11
PIRM	0,31	0,21	0,25	0,16	0,15	0,16	0,17	0,15	0,10	0,13	0,13	0,14	0,15	0,00	0,06	0,05	0,06	0,07	0,05	0,06	0,14	0,13	0,07	0,09	0,06	0,13	0,12	0,08	0,09	0,10	0,06	0,09	0,09
RGA	0,30	0,22	0,27	0,17	0,15	0,17	0,12	0,14	0,08	0,10	0,09	0,11	0,11	0,12	0,00	0,06	0,07	0,08	0,03	0,05	0,14	0,15	0,05	0,06	0,07	0,15	0,12	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09
STE	0,28	0,20	0,26	0,13	0,11	0,15	0,15	0,15	0,10	0,12	0,13	0,13	0,13	0,11	0,12	0,00	0,04	0,04	0,05	0,02	0,08	0,11	0,03	0,06	0,04	0,13	0,08	0,04	0,06	0,06	0,03	0,05	0,07
PM	0,29	0,22	0,24	0,16	0,14	0,18	0,18	0,16	0,12	0,14	0,17	0,15	0,15	0,13	0,15	0,10	0,00	0,02	0,07	0,04	0,12	0,11	0,05	0,07	0,05	0,14	0,09	0,05	0,07	0,06	0,04	0,05	0,07
BRP	0,29	0,22	0,24	0,17	0,15	0,19	0,17	0,17	0,13	0,14	0,16	0,16	0,16	0,14	0,16	0,10	0,04	0,00	0,08	0,04	0,09	0,11	0,06	0,06	0,07	0,15	0,09	0,05	0,08	0,08	0,04	0,05	0,06
PAS	0,26	0,22	0,30	0,19	0,14	0,16	0,15	0,13	0,08	0,10	0,12	0,12	0,11	0,12	0,09	0,12	0,16	0,16	0,00	0,05	0,15	0,14	0,06	0,07	0,06	0,15	0,11	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10
BC	0,29	0,24	0,27	0,13	0,13	0,15	0,13	0,15	0,11	0,14	0,14	0,12	0,13	0,15	0,14	0,09	0,11	0,11	0,14	0,00	0,09	0,09	0,01	0,04	0,03	0,11	0,07	0,05	0,05	0,06	0,03	0,06	0,06
BN	0,43	0,34	0,37	0,25	0,28	0,30	0,25	0,26	0,25	0,26	0,27	0,25	0,25	0,27	0,26	0,18	0,23	0,20	0,30	0,20	0,00	0,17	0,10	0,09	0,12	0,18	0,16	0,10	0,14	0,15	0,09	0,11	0,13
MAR	0,37	0,32	0,31	0,23	0,23	0,23	0,24	0,26	0,20	0,21	0,25	0,22	0,24	0,21	0,23	0,18	0,18	0,17	0,24	0,16	0,28	0,00	0,10	0,13	0,11	0,21	0,17	0,13	0,13	0,14	0,11	0,14	0,13
PAJ	0,31	0,24	0,29	0,15	0,14	0,18	0,14	0,16	0,11	0,12	0,13	0,12	0,14	0,15	0,13	0,09	0,12	0,12	0,14	0,07	0,20	0,16	0,00	0,04	0,04	0,13	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07
NAN	0,33	0,29	0,29	0,18	0,17	0,18	0,17	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,13	0,17	0,16	0,12	0,13	0,12	0,17	0,10	0,19	0,20	0,11	0,00	0,06	0,15	0,09	0,07	0,06	0,08	0,05	0,06	0,09
VCA	0,31	0,25	0,29	0,18	0,16	0,19	0,18	0,17	0,14	0,17	0,18	0,15	0,17	0,16	0,16	0,12	0,13	0,14	0,15	0,11	0,24	0,19	0,13	0,15	0,00	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,05	0,07	0,07
VPAL	0,37	0,38	0,33	0,25	0,26	0,27	0,24	0,23	0,24	0,25	0,27	0,22	0,27	0,24	0,27	0,24	0,24	0,25	0,26	0,22	0,32	0,29	0,23	0,25	0,16	0,00	0,17	0,16	0,15	0,16	0,13	0,16	0,17
AA	0,34	0,29	0,35	0,22	0,21	0,22	0,23	0,22	0,19	0,19	0,23	0,21	0,22	0,22	0,22	0,17	0,17	0,16	0,20	0,18	0,32	0,24	0,18	0,18	0,17	0,27	0,00	0,11	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10
BWS	0,33	0,27	0,29	0,21	0,20	0,24	0,23	0,20	0,16	0,19	0,20	0,19	0,20	0,21	0,19	0,15	0,13	0,13	0,19	0,15	0,24	0,21	0,16	0,16	0,16	0,28	0,22	0,00	0,08	0,07	0,05	0,07	0,07
CHAR	0,31	0,27	0,29	0,16	0,16	0,19	0,21	0,18	0,14	0,17	0,20	0,15	0,17	0,17	0,17	0,12	0,14	0,15	0,15	0,13	0,26	0,21	0,13	0,14	0,16	0,24	0,16	0,17	0,00	0,08	0,06	0,06	0,07
HOL	0,25	0,29	0,29	0,23	0,19	0,26	0,21	0,21	0,16	0,20	0,22	0,18	0,19	0,22	0,19	0,16	0,15	0,16	0,14	0,14	0,30	0,23	0,14	0,18	0,16	0,27	0,20	0,19	0,16	0,00	0,06	0,09	0,09
LIM	0,29	0,27	0,27	0,17	0,14	0,20	0,20	0,19	0,14	0,17	0,19	0,17	0,17	0,14	0,19	0,11	0,10	0,10	0,18	0,11	0,21	0,19	0,12	0,11	0,15	0,23	0,19	0,16	0,12	0,17	0,00	0,04	0,06
SIM	0,33	0,31	0,33	0,21	0,22	0,24	0,22	0,22	0,19	0,19	0,20	0,19	0,21	0,21	0,18	0,16	0,13	0,13	0,20	0,16	0,22	0,23	0,15	0,15	0,17	0,25	0,17	0,19	0,16	0,20	0,15	0,00	0,07
GB	0,33	0,31	0,33	0,21	0,22	0,26	0,22	0,25	0,19	0,21	0,21	0,22	0,23	0,19	0,20	0,16	0,15	0,14	0,20	0,16	0,26	0,21	0,17	0,19	0,17	0,27	0,17	0,19	0,15	0,20	0,13	0,15	0,00

En la representación gráfica de las distancias genéticas D_A en un dendrograma en red (Figura 2) se observa que la Vaca de la Reina está en el mismo clúster que la Frisona, aunque la distancia genética entre ellas es grande.

Figura 2.- Representación Neighbor-Net de las distancias genéticas D_A entre 33 poblaciones bovinas.



Estructura genética

Con este estudio se pretenden dos objetivos fundamentales que son, por una parte, conocer si existe una subestructura interna en la Vaca de la Reina y por otra evaluar la eficacia de un sistema objetivo de asignación de individuos a poblaciones. Este último objetivo es fundamental sobre todo en razas muy amenazadas con escasos censos ya que supone disponer de una herramienta que permita a los responsables de la gestión del Libro Genealógico tomar decisiones acerca de registrar o no animales con genealogía

desconocida o a aquellos en los que se podría sospechar cierto grado de cruzamiento con animales de otras razas.

Se ha realizado un análisis de la estructura de la población con el programa STRUCTURE v. 2.1 (Pritchard et al. 2000). Se ha utilizado un algoritmo bayesiano del programa que calcula la distribución *a posteriori* de cada coeficiente de mezcla de cada individuo (q). La media de esta distribución representa una estimación de la proporción que el genoma de cada individuo tiene de las poblaciones parentales. Con este programa se hace un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en un diferente número de clusters (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene.

En la figura 3 se presenta gráficamente la estructura poblacional de las 33 poblaciones utilizando el programa informático Structure v.2.1. Se ha realizado con 200000 iteraciones de Burn-in y con número de iteraciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 300000. Cada individuo se representa como una barra vertical y cada color representa la proporción del clúster correspondiente (raza en este caso) en forma proporcional. Cuando el número de poblaciones estimadas es 3 ($K=3$), se separan tres clústers (azul, verde y rojo). La Vaca de la Reina está en el clúster azul junto con la Frisona, y otras tres razas bovinas (las vacas Palmera y Canaria, de las Islas Canarias y la raza Aberdeen Angus). La Vaca de la Reina y la Frisona se agrupan en el mismo clúster a medida que va aumentando el número de K y en $K=10$ estas dos razas se agrupan en un mismo clúster integrado solamente por ellas. No se observa subdivisión de la Vaca de la Reina y desde $K=4$, más del 90% de los individuos analizados se asignan en el mismo clúster, siendo este valor el 89 % cuando $K=10$ (Tabla 6). En este K la Frisona se agrupa en el clúster 4 junto con la Vaca de la Reina en lugar de hacerlo con el resto de las razas europeas en el clúster 1. En $K=24$ la Vaca de la Reina forma un clúster independiente del resto de las razas bovinas incluidas en el estudio.

Figura 5.- Estructura genética de las 33 razas bovinas analizadas.

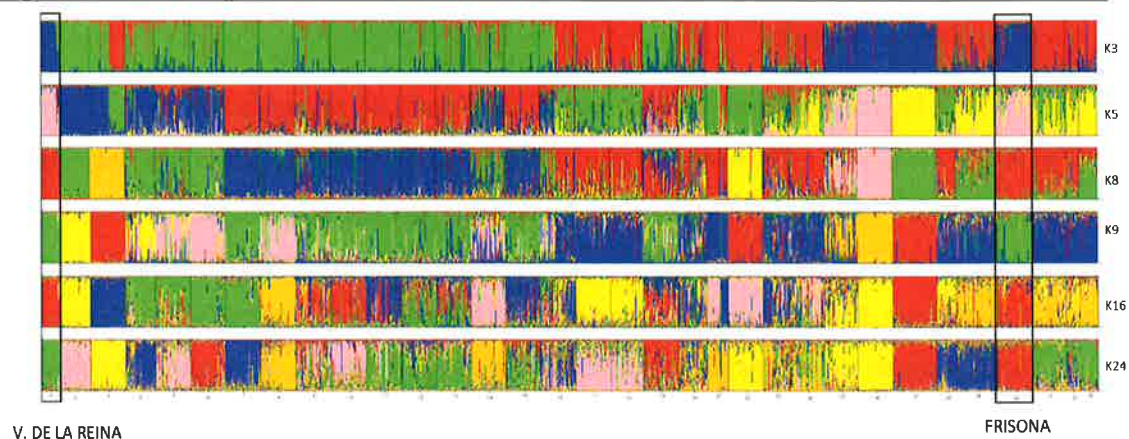


Figura 6.- Estructura genética de la Vaca de la Reina y la vaca Frisona.



Tabla 6.- Proporción de asignación (Q) de cada población a cada uno de los 9 clústers cuando K=9.

RAZA	ACRON	K=1	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8	K=9	K=10
1 Vaca de la Reina	VR	0.009	0.012	0.016	0.890	0.005	0.007	0.005	0.007	0.010	0.040
2 Menorquina	MEN	0.007	0.008	0.018	0.006	0.007	0.008	0.005	0.007	0.006	0.930
3 Mallorquina	MALL	0.005	0.005	0.004	0.005	0.005	0.949	0.007	0.005	0.009	0.007
4 Betizu	BET	0.064	0.039	0.713	0.015	0.033	0.021	0.015	0.036	0.014	0.051
5 Monchina	MON	0.045	0.052	0.586	0.103	0.023	0.010	0.018	0.086	0.022	0.054
6 Toro de Lidia	TL	0.016	0.020	0.858	0.010	0.020	0.011	0.013	0.019	0.022	0.012
7 Alistana	ALS	0.016	0.040	0.023	0.008	0.010	0.006	0.008	0.867	0.012	0.009
8 Tudanca	TUD	0.018	0.116	0.082	0.013	0.012	0.010	0.011	0.694	0.018	0.025
9 Asturiana de los Valles	ASV	0.060	0.516	0.079	0.033	0.047	0.013	0.017	0.181	0.015	0.038
10 Asturiana de las Montañas	ASM	0.024	0.420	0.055	0.022	0.023	0.015	0.024	0.381	0.014	0.022
11 Retinta	RET	0.011	0.815	0.030	0.011	0.025	0.011	0.013	0.056	0.010	0.018
12 Morucha	MOR	0.022	0.119	0.026	0.017	0.023	0.019	0.016	0.726	0.016	0.015
13 Avileña	AVI	0.019	0.242	0.024	0.037	0.045	0.046	0.025	0.532	0.012	0.016
14 Pirenaica	PIRM	0.111	0.562	0.140	0.011	0.040	0.030	0.013	0.030	0.029	0.033
15 Rubia Gallega	RGA	0.019	0.740	0.021	0.022	0.013	0.017	0.016	0.128	0.009	0.015
16 Serrana de Teruel	STE	0.306	0.172	0.164	0.059	0.139	0.018	0.030	0.046	0.019	0.048
17 Parda de Montaña	PM	0.718	0.050	0.025	0.017	0.050	0.056	0.017	0.028	0.013	0.027
18 Bruna de los Pirineos	BRP	0.747	0.022	0.019	0.014	0.066	0.035	0.030	0.020	0.013	0.034
19 Pasioga	PAS	0.028	0.523	0.059	0.181	0.019	0.011	0.019	0.104	0.021	0.034
20 Berrenda en Colorado	BC	0.183	0.093	0.140	0.064	0.271	0.027	0.027	0.135	0.041	0.019
21 Berrenda en Negro	BN	0.040	0.014	0.010	0.013	0.592	0.012	0.008	0.270	0.031	0.011
22 Marismeña	MAR	0.035	0.008	0.017	0.010	0.877	0.018	0.009	0.007	0.013	0.007
23 Pajuna	PAJ	0.178	0.212	0.034	0.074	0.299	0.014	0.026	0.100	0.034	0.027
24 Negra Andaluza	NAN	0.197	0.050	0.029	0.019	0.500	0.026	0.030	0.120	0.023	0.008
25 Vaca Canaria	VCA	0.162	0.062	0.033	0.050	0.066	0.024	0.057	0.073	0.442	0.030
26 Vaca Palmera	PAL	0.008	0.006	0.007	0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.947	0.004
27 Aberdeen Angus	AA	0.012	0.009	0.014	0.010	0.015	0.012	0.903	0.008	0.008	0.010
28 Parda Suiza	BWS	0.571	0.038	0.016	0.049	0.142	0.026	0.021	0.058	0.029	0.050
29 Charolais	CHAR	0.618	0.051	0.055	0.061	0.049	0.014	0.084	0.036	0.019	0.014
30 Holstein	HOL	0.050	0.016	0.010	0.818	0.021	0.016	0.024	0.015	0.022	0.009
31 Limousin	LIM	0.783	0.019	0.030	0.021	0.067	0.013	0.020	0.016	0.017	0.014
32 Simmental	SIM	0.735	0.032	0.014	0.019	0.061	0.007	0.082	0.026	0.014	0.009
34 Galveich	GB	0.840	0.029	0.009	0.012	0.025	0.009	0.046	0.010	0.011	0.008

La Vaca de la Reina es una población homogénea y no se observa subestructura ni mezcla con el resto de las poblaciones estudiadas. La mayoría de los individuos se asignan al mismo clúster con una probabilidad variable que oscila entre el 70 y el 90%. Dadas las características de esta población, en principio no sería fácil realizar asignaciones a la población con fiabilidad ya que es difícil diferenciar algunos de estos animales de la Frisona, sin embargo cuando sólo se consideran estas dos poblaciones, desde un principio

se diferencian claramente entre sí, asignándose el 97,6% de los individuos de la Vaca de la Reina a un clúster diferente al formado por los individuos de la raza Frisona (figura 6).

CONCLUSIONES

- La Vaca de la Reina muestra una diversidad genética moderada-alta y no está desviada del Equilibrio Hardy-Weinberg.
- Esta población bovina muestra una cierta relación genética con la vaca Frisona, mostrando la menor diferenciación y distancia genética con esta raza bovina que con el resto de las razas incluidas en el estudio. Esto podría deberse a la existencia de un ancestro común entre las dos razas.
- La Vaca de la Reina no muestra subdivisión poblacional, siendo una población genéticamente homogénea.
- La Vaca de la Reina y la vaca Frisona se diferencian genéticamente cuando se tienen en cuenta estas dos poblaciones, por lo que se podría realizar asignación de individuos a la población de la Vaca de la Reina, si fuese necesario.

BIBLIOGRAFIA

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2003, Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la genetique des populations In: U. d. Montpellier (ed.) Montpellier, France.
- Delgado JV, Martínez AM, Acosta A, Álvarez LA, Armstrong E, et al. (2012). Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. Anim Genet 43: 2–10. doi:10.1111/j.1365–2052.2011.02207.x.
- European Cattle Genetic Diversity Consortium. 2006. «Marker-Assisted Conservation of European Cattle Breeds: An Evaluation». Animal Genetics 37 (5): 475-81. doi:10.1111/j.1365-2052.2006.01511.x.
- FAO 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity (Roma, FAO).
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006, Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Molecular Biology and Evolution 23, 254-267.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. Biometrics, 48, 361-372.

- Langella, O. 1999. Populations 1.2.28 CNRS UPR9034 <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>.
- Martín-Burriel, I, C Rodellar, J Cañón, O Cortés, S Dunner, V Landi, A Martínez-Martínez, et al. 2011. «Genetic diversity, structure, and breed relationships in Iberian cattle». *Journal of Animal Science* 89 (4): 893-906. doi:10.2527/jas.2010-3338.
- Martínez, Amparo M., Luis T. Gama, Javier Cañón, Catarina Ginja, Juan V. Delgado, Susana Dunner, Vincenzo Landi, et al. 2012. «Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus». *PLoS ONE* 7 (11): e49066. doi:10.1371/journal.pone.0049066.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19:153–170.
- Page R.D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357–8.
- Park, S.D.E., 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection University of Dublin, Dublin.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-949.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248-249.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–13.
- Wright, S., 1969, The Theory of gene frequencies, In: *Evolution and genetics of populations*. pp. 291-293.
- Yeh, F.C. and Boyle, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.

