

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN POBLACIONAL DEL BOVINO CRIOLLO YACUMEÑO SOBRE LA DIVERSIDAD MITOCONDRIAL

## EVALUATION OF THE EFFECT OF SPLITTING A HERD OF YACUMEÑO CATTLE ON THE MITOCHONDRIAL DIVERSITY

Medida de la diversidad nucleotídica a través del ADN mitocondrial.

Pereira, J.A.C.<sup>1</sup>, Posik, D.M.<sup>2</sup>, Hoyos, R.<sup>1</sup>, Lirón, J.P.<sup>2</sup>, Loza, A.<sup>1</sup>, De Luca, J.C.<sup>2</sup>, Peral-García, P.<sup>2</sup>, Giovambattista, G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Facultad de Ciencias Veterinarias. Santa Cruz – Bolivia. \*antonios8@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidad nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, IGEVET – CCT, LA Plata – CONICET, Argentina.

### Palabras clave:

Conservación *ex situ*  
D-loop mitocondrial  
Diversidad nucleotídica

### Keywords:

*Ex situ* conservation  
Mitochondrial D-loop  
Nucleotide diversity

### Abstract

An *ex situ* conservation program (CP) of Yacumeño cattle was established, in order to obtain the animals for the CP, the original herd was fragmented. With the aim to evaluate the effect of the fragmentation on the mitochondrial diversity 28 sequences of the D-loop mitochondrial of 14 individuals sampled in 1998 (original herd) and 14 animals sampled in 2010 (fragmented herd) were analyzed. The results of the nucleotide diversity and the mean of pairwise differences in the Creole cattle were  $0.110 \pm 0.073$  and  $1.757 \pm 1.051$  respectively. None of these estimations showed values higher than the animals sampled in the year 2010 ( $0.124 \pm 0.083$  and  $1.978 \pm 1.188$ ). The results show that no loss of mitochondrial diversity was detected due to the split of the original herd. In addition, the study determined that the European (T3) and the African (T1) haplogroups are present in the Yacumeño herd represented by 11 haplotypes. One of them is unique to the Yacumeño Herd.

### Resumen

Se estableció un programa de conservación *ex situ* de ganado criollo Yacumeño fragmentando el hato original. Con el fin de evaluar el efecto de la fragmentación, sobre la diversidad mitocondrial, se analizaron 28 secuencias del D-loop mitocondrial de 14 individuos muestreados en el año 1998 y 14 en el año 2010. El cálculo de la diversidad nucleotídica y la media de diferencias entre pares de secuencias en el bovino Criollo Yacumeño fueron de  $0,110 \pm 0,073$  y  $1,757 \pm 1,051$ , respectivamente. Ninguna de estas dos estimaciones mostró valores superiores al muestreo del año 2010 ( $0,124 \pm 0,083$  y  $1,978 \pm 1,188$ ). Por lo tanto, se puede afirmar que no existió una pérdida de diversidad mitocondrial en el hato fragmentado. Por otro lado, el estudio determinó que los haplogrupos europeo (T3) y africano (T1) se hallan representados por 11 haplotipos en el hato Yacumeño, uno de ellos es privativo de esta raza.

### Introducción

Existen trabajos acerca de las evidencias históricas de la llegada de los bovinos a Sudamérica (Sal Paz, 1986; Primo, 1992; De Alba, 2011). Independientemente del origen y los puntos de entrada del criollo a Bolivia, éste se convirtió en el único recurso zoogenético disponible en todos los ecosistemas del país hasta principios del Siglo XX. A partir de la década del 40, en los llanos subtropicales bolivianos, se utilizó el *Bos indicus* como fuente de cruzamiento sobre ganado criollo, ocasionando una paulatina disminución de los genes criollos (Pereira *et al.*, 2008). Un ejemplo de esta situación es la venta del plantel de ganado Yacumeño que ostentaba el título de ser el único hato criollo, a nivel nacional, seleccionado por fertilidad y ganancia de peso durante más de 40 años. Ante esta situación, la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de Santa Cruz - Bolivia toma la decisión de comenzar un programa de conservación (PC) *ex situ* del Criollo Yacumeño. Un paso importante del PC es diseñar un sistema de cruzamiento dentro del hato cerrado. Este último debe ser lo suficientemente eficiente como para mantener baja la consanguinidad y alta la variabilidad genética de dicha población. Para tener éxito en el PC se debe conocer el efecto de la fragmentación del hato original en la sub-población perteneciente al PC es decir, se debe determinar si se perdió diversidad genética al subdividir el hato en varias poblaciones. Afortunadamente, debido al gran avance en técnicas moleculares las relaciones filogenéticas entre

razas bovinas han sido estudiadas mediante marcadores autosómicos, tales como microsatélites y otros (Magee *et al.*, 2002; Lirón *et al.*, 2006; MacNeil *et al.*, 2006). Recientemente, varios trabajos describieron la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) en razas criollas americanas de Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia e islas del Caribe, entre otras (Lirón *et al.*, 2006, 2011; Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002, 2004; Carvajal-Carmona *et al.*, 2003; Mirol *et al.*, 2003; Ginja *et al.*, 2010), reportando la existencia de secuencias correspondientes a los haplogrupos africano, europeo y del Cercano Oriente en el criollo americano. Esto sugiere que el ADNmt puede ser utilizado para identificar grupos de individuos debido a que la herencia del genoma mitocondrial se transmite exclusivamente a través de vía materna y, que además, posee un fragmento denominado D-loop altamente polimórfico. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la fragmentación poblacional sobre la diversidad mitocondrial, calcular la diversidad nucleotídica y caracterizar la composición haplotípica del hato Criollo Yacumeño antes y después de la venta del hato original. Estos resultados servirán para definir matrilineajes y mejorar el PC del ganado bovino Criollo Yacumeño de la FCV.

## Material y métodos

Se seleccionaron muestras de ADN obtenido de sangre de 28 bovinos criollos Yacumeños. Las muestras corresponden a dos muestreos realizados en el mismo hato en años diferentes 14 en el año 1998 (hato completo, N<sub>1998</sub>) y otras 14 de un segundo muestreo (hato fragmentado, N<sub>2010</sub>). El ADN genómico se obtuvo de las muestras mediante los métodos de extracción orgánica o de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Un fragmento de la región hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial (Posiciones 16023 – 16262) fue amplificado mediante la técnica de PCR utilizando los primers L15960 y H16334 sugeridos por Troy *et al.* (2001). Los productos de amplificación fueron purificados con polietileno glicol 8000 y secuenciados en un secuenciador MegaBACE 1,000 utilizando el kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) y los mismos primers de amplificación. Las secuencias fueron editadas con el software MegaBACE Sequence Analyzer (GE Healthcare). Las secuencias obtenidas del D-loop fueron alineadas mediante el algoritmo CLUSTAL-W multiple alignment. Las variaciones del D-loop fueron definidas por comparación directa con la secuencia mitocondrial de referencia europea T3 (Número de acceso V00654), publicada por Anderson *et al.* (1982). La diversidad genética mitocondrial fue evaluada mediante la diversidad nucleotídica y la media de diferencias entre pares de secuencias. Se utilizó el software Arlequin Ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) para calcular dichos índices.

## Resultados y discusión

*Diversidad mitocondrial y composición haplotípica del bovino Criollo Yacumeño:* El análisis de D-loop mitocondrial evidenció un total de 16 sitios polimórficos, lo que permitió identificar 11 haplotipos mitocondriales. Como se puede observar en la tabla I estos polimorfismos incluyeron 14 transiciones y 2 transversiones en comparación con la secuencia de referencia bovina (Anderson *et al.*, 1982). El haplogrupo T3, el más abundante en Europa Occidental, presentó la mayor incidencia (84,7%) en la población estudiada. Este resultado concuerda con todos los trabajos reportados con respecto a estudios de ganado criollo realizados previamente (Lirón *et al.*, 2006, 2011; Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002, 2004; Carvajal-Carmona *et al.*, 2003; Mirol *et al.*, 2003; Ginja *et al.*, 2010). En este haplogrupo se encontraron 8 haplotipos diferentes: el CYa1 que coincidió con la secuencia de referencia y 7 que divergieron de la secuencia de consenso entre una o dos mutaciones. Los resultados además mostraron que el haplogrupo africano T1 está presente en la población Yacumeña. Este haplogrupo representado por tres haplotipos fue detectado en cuatro animales representando el 14,3% del total de la muestra analizada. Dos de los haplotipos africanos divergen en más de tres mutaciones con respecto a la secuencia nodal T1 y uno es idéntico a ésta. Estos resultados coinciden con otros trabajos, realizados en criollo, que reportan al haplogrupo T1 en poblaciones criollas del Caribe, Brasil, Colombia y Bolivia (Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Mirol *et al.*, 2003) y difieren del de Carvajal-Carmona *et al.* (2003) en el cual además encontraron haplotipos del grupo nodal del Cercano Oriente (T2). Cuando se analizaron los haplotipos por año de muestreo, se observó que 5 haplotipos fueron detectados en las muestras del hato original y 7 en las del hato fragmentado. El haplotipo CYa1 fue detectado en ambos muestreos (9 veces en el primer muestreo y 8 veces en el segundo). Cuando se comparan los 11 haplotipos encontrados en la población yacumeña con los datos del GenBank (Benson *et al.*, 2008), se observa que dos corresponden a los grupos nodales T3 y T1, uno (CYa10) es único a la población en estudio y el resto ha sido previamente reportado en otras razas. Todas las secuencias de ADN obtenidas fueron depositadas en la base de datos públicos GenBank (números de acceso JN382548 – JN382561).

**Tabla I.** Posiciones variables en las secuencias del D-loop en el bovino criollo Yacumeño. Seq. Ref = secuencia de referencia (Anderson *et al.*, 1982); N = número de haplotipos detectados [*Variable positions in the D-loop sequences of Yacumeño Creole cattle. Seq. Ref = reference sequence (Anderson et al., 1982); N = number of haplotypes detected*]

Haplotipo	N	Haplogrupo																
		16049	16050	16083	16084	16113	16119	16127	16137	16139	16167	16196	16200	16229	16231	16247	16255	
Seq. ref.		C	C	A	C	T	T	C	T	C	C	G	G	A	C	C	T	
CYa1	17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T3
CYa2	2	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T1
CYa3	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T3
CYa4	1	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T3
CYa5	1	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T3
CYa6	1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T3
CYa7	1	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T3
CYa8	1	.	T	.	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	C	T1
CYa9	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	T3
CYa10	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	T3
CC21	1	.	T	G	.	C	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	T1

*Comparación de la diversidad mitocondrial antes y después de la venta del hato original de bovinos Criollos Yacumeños:* El cálculo de la diversidad nucleotídica y la diferencia promedio tomada de a pares en el Yacumeño en el conjunto de las 28 secuencias fue de  $0,110 \pm 0,073$  y  $1,757 \pm 1,051$ , respectivamente (ver tabla II). Ninguna de estas dos estimaciones mostró valores superiores al muestreo del año 2010 ( $0,124 \pm 0,083$  y  $1,978 \pm 1,188$ ). Por lo tanto, se puede afirmar que observando la composición de los resultados a partir de las muestras colectadas en los años 1998 y 2010, no existió una pérdida de diversidad mitocondrial en el hato fragmentado. Además se calculó la diversidad haplotípica la cual fue de  $0,828 \pm 0,052$  para el conjunto de las 28 secuencias como se observa en la tabla II. Sin embargo, cuando se compara la composición haplotípica entre ambos muestreos, se observa que varios haplotipos sólo fueron detectados en alguno de los dos años. Aunque podría deberse al efecto del muestreo, esto debe ser confirmado y determinar si los haplotipos CYa2, CYa3, CYa4 y CC21 no se han perdido durante el proceso de venta y división de la población original.

**Tabla II.** Diversidad genética mitocondrial del Bovino Criollo Yacumeño (CYa) medida a través del número de haplotipos detectados (Na), del número de sitios polimórficos, del índice de diversidad nucleotídica, de las diferencias medias de a pares (NMP) y de la diversidad haplotípica (Hd), N = tamaño de la muestra [*Mitochondrial diversity of Yacumeño cattle (CYa) measured by the number of haplotypes detected (Na), the number of polymorphic sites, nucleotide diversity index, mean number of pairwise differences (NMP) and haplotypic diversity (Hd), N= sample size*]

Año de muestreo	N	Na	Nº de sitios polimórficos	Nº de transiciones	Nº de transversiones	Diversidad nucleotídica	NMP	Hd
CYa-1998	14	5	8	7	1	$0,099 \pm 0,070$	$1,582 \pm 0,999$	$0,593 \pm 0,143$
CYa-2010	14	7	13	12	1	$0,124 \pm 0,083$	$1,978 \pm 1,188$	$0,692 \pm 0,136$
TOTAL*	28	11	16	14	2	$0,110 \pm 0,073$	$1,757 \pm 1,051$	$0,828 \pm 0,052$

\* Datos analizados como un único grupo.

## Conclusiones

Los resultados demuestran que la diversidad mitocondrial del hato fragmentado que forma parte del PC no se ha perdido cuando se compara con el hato original. Además, por medio de este estudio se pudo determinar la composición haplotípica del hato la cual consiste en los dos grupos de mayor incidencia existentes en Sudamérica (T3 y T1). Con esta información el PC puede seguir adelante con la certeza de que la variabilidad genética del hato fragmentado es representativa del hato original. Por último, el haber encontrado un haplotipo (CYa10) privativo a los Yacumeños hace que se justifique aún más la conservación de este recurso zogenético

único en Bolivia. Sin embargo, se deben realizar otros estudios y añadir las otras poblaciones reluctantes del Yacumeño para poder determinar si efectivamente debido a la fragmentación del hato se perdieron ciertos haplotipos encontrados en el muestreo del hato original (año 1998).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Argentino de Cooperación Sur-Sur y triangular (FO.AR), al Proyecto de Conservación de ganado criollo Yabaré perteneciente a la FCV y a Estancias Espíritu por el apoyo recibido para poder lograr esta investigación.

### Bibliografía

- Anderson, S., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. and Young I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*. 156, 683-717.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Wheeler, D.L. (2008) GenBank. *Nucleic Acids Research*. 36 (Database issue), 25-30.
- Carvajal-Carmona, L.G., Bermudez, N., Olivera-Angel, M., Estrada, L., Ossa, J., Bedoya, G. and Ruiz-Linares, A. (2003) Variabilidad genética en el ganado bovino criollo Argentino de origen Patagónico. *Genetics*. 165, 1457-1463.
- De Alba J. (2011) El libro de los Bovinos Criollo de América. Ediciones Papiro Omega, S.A. de C.V.
- Ginja, C., Penedo, M.C., Melucci, L., Quiroz, J., Martínez López, O.R., Revidatti, M.A. Martínez-Martínez, A., Delgado, J.V. and Gama, L.T. (2010) Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal Genetics*. 41, 128-141.
- Lirón, J.P., Bravi, C.M., Mirol, P.M., Peral-García, P. and Giovambattista, G. (2006) African matrilineages in American Creole cattle: evidence of two independent continental sources. *Animal Genetics*. 37, 379-382.
- Lirón, J.P., Acosta, A., Rogberg-Muñoz, A., Uffo, O., Posik, D.M., García, J., Peral-García, P. and Giovambattista, G. (2011) Origin of Cuban Creole cattle inferred by patri- and matrilineages. *Archivos de zootecnia*. 60, 1-10.
- MacNeil, M.D., Cronin, M.A., Blackburn, H.D. and Alexander, L.J. (2006) Genetic relationships among breeds of beef cattle in The United States that originated from The British isles, Iberian peninsula, or West Central Europe. *8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18. Belo Horizonte, MG - Brasil*.
- Magee, D.A., Meghen, C., Harrison, S., Troy, C.S., Cymbron, T., Gaillard, C., Morrow, A., Maillard, J.C. and Bradley, D.G. (2002) A partial African ancestry for the Creole cattle populations of the Caribbean. *Journal of Heredity*. 93, 429-432.
- Miretti, M.M., Pereira, H.A. Jr., Poli, M.A., Contel, E.P.B. and Ferro, J.A. (2002) African-derived mitochondrial in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *Journal of Heredity*. 93, 323-330.
- Miretti, M.M., Dunner, S., Naves, M., Contel, E.P. and Ferro, J.A. (2004) Predominant African-derived mtDNA in Caribbean and Brazilian Creole cattle is also found in Spanish cattle (*Bos taurus*). *Journal of Heredity*. 95, 450-453.
- Mirol, P.M., Giovambattista, G., Lirón, J.P. and Dulout, F.N. (2003) African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. *Heredity*. 91, 248-254.
- Pereira, J.A.C., Hoyos, R. and Rojas, P. (2008) Conservación *ex situ* de ganado bovino Criollo Yacumeño en el trópico boliviano. *IX Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zootécnicos*. V. II, 495-499.
- Primo, A.T. (1992) El ganado bovino Ibérico en las Américas. *Archivos de Zootecnia*. 41, 421-432.
- Sal Paz, F. (1986) El ganado Criollo Argentino: definición y características principales, Ganado Bovino Criollo. Tomo I, Buenos Aires, Orientación Graf. Edit.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.0. Genetics and Biometry Lab. Department of Anthropology. University of Geneva.
- Troy, C.S., MacHugh, D.E., Bailey, J.F., Magee, D.A., Loftus, R.T., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C. and Bradley, D.G. (2001) Genetic evidence for Near - Eastern origins of European cattle. *Nature*. 410, 1088-1091.