DETECCIÓN CUELLOS DE BOTELLA EN LA GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA

Grimal, A., Gómez, E.A. y Viudes de Castro, M.P.
Centro de Tecnología Animal (CITA). Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
Apartado 187. 12400 Segorbe. Castellón.
e-mail: grimal_amp@gva.es

INTRODUCCIÓN

Hemos de evitar que se produzcan cuellos de botella (reducciones drásticas en el censo efectivo de la población (N_e)) en especies amenazadas puesto que conllevaran aumentos de las tasas de consanguinidad, pérdidas de variabilidad genética y mayor probabilidad de fijación de alelos deletéreos, reduciendo, por tanto, el potencial adaptativo e incrementando la probabilidad de extinción (Cournet y Luikart, 1996). Existen varios modelos para detectar cuellos de botella, partiendo de datos de secuenciación de ADN. Estos dependen del proceso de mutación asumido para los diferentes loci. Clásicamente, se describen dos modelos de mutación, el IAM (Infinite Allele Model) en el que cada mutación genera un nuevo alelo no existente y el SMM (Stepwise Mutation Model) en el que el proceso de mutación consistiría en ganar o perder una unidad de repetición. Los microsatélites mutan de una manera intermedia entre estos modelos, por lo que se definió un tercero, TPM (Two-Phase Mutation model), que asume que la mayoría de las mutaciones conllevan la ganancia o pérdida de una unidad de repetición pero que también se producen mutaciones de mayor tamaño (Di Rienzo et al., 1994). El presente estudio, partiendo de una caracterización molecular basada en microsatélites, intenta detectar posibles cuellos de botella en la historia reciente de la Gallina Valenciana de Chulilla mediante cinco pruebas estadísticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotipó la población base de la Gallina Valenciana de Chulilla (77 animales) para 20 microsatélites (ADL268, MCW216, MCW248, LEI094, MCW295, MCW081, MCW069, MCW034, MCW111, LEI234, LEI166, MCW078, MCW067, MCW330, MCW098, ADL278, MCW016, MCW014, MCW183, MCW123, MCW165). Los datos obtenidos se analizaron con BOTTLENECK 1.2.02. que lleva a cabo cuatro pruebas para detectar severas reducciones recientes del tamaño efectivo de población, N_e, entendiendo como recientes las ocurridas en las últimas $2N_e$-$4N_e$ generaciones (Piry et al., 1999).

Un primer test es el *Sing Test* o prueba de exceso de heterocigosidad (Cournet y Luikart, 1996). Para loci selectivamente neutros, como son los microsatélites, la distribución del número de alelos y sus frecuencias en poblaciones naturales resulta de un equilibrio entre mutación y deriva, siendo los parámetros de este equilibrio la tasa de mutación (μ) y el N_e. Cuando ocurre una reducción drástica en el N_e de una población, se produce una disminución progresiva del número de alelos y de la heterocigosidad (H_e). Sin embargo, la diversidad alélica se reduce más rápidamente que H_e ya que se suelen perder primero los alelos raros, que contribuyen poco a la H_e, y como consecuencia hay un exceso de H_e con respecto a la heterocigosidad esperada en una población en equilibrio mutación-deriva según el número de alelos encontrados (H_{eq}). Este exceso de H_e persiste durante un cierto número de generaciones hasta que se establece un nuevo equilibrio mutación deriva. Este test determina si la proporción de loci con exceso de H_e es significativamente mayor que la esperada en equilibrio mutación deriva (H_{eq}). El segundo test, *Standardized Diferences Test,* establece si la media de las diferencias estandarizadas entre la heterocigosidad esperada y observada es significativamente distinta de cero, asumiendo un estadístico que se distribuye como una normal estandarizada (N(0,1)). La tercera de las pruebas, *Wilcoxon's signed Rank test,* utiliza un procedimiento no paramétrico, semejante una T de Student para muestras apareadas. Finalmente, la cuarta prueba fue desarrollada por Luikart et al. (1998) y se trata de un *método gráfico* que consiste en agrupar los alelos en 10 clases de frecuencias alélicas (0,001-0,1, …, 0,901-1) y representar el histograma de frecuencias. En poblaciones que no han sufrido un cuello de botella, aparecen una gran proporción de alelos en frecuencias bajas (0,001-0,1), dando un histograma denominado *L-shaped*, sin embargo aquellas poblaciones que habían sufrido una reducción en su N_e, mostraron menos alelos en

frecuencias bajas (<0,1) que en una o más frecuencias intermedias (0,001-0,9), debido a la pérdida de alelos raros, produciendo una forma denominada *mode-shifted* o distorsión en la distribución de frecuencias alélicas. Aunque BOTTLENECK 1.2.02. permite realizar los cálculos según los tres modelos de mutación, sólo se ejecutó la opción con el modelo de mutación en dos fases, TPM, siendo los parámetros utilizados una varianza igual a 10, una proporción de mutaciones simples del 90% y un número de iteraciones igual a 10.000.

La última prueba, *M-ratio test* presentada por Garza y Williamson (2001), detecta la presencia de cuellos de botella a partir del ratio entre el número de alelos y el rango de tamaño de los mismos según el estadístico $M = k/r$, donde k es el número de alelos y $r = S_{max}-S_{min}+1$ (siendo S el tamaño de los alelos), lo que permite interpretar M como el porcentaje medio de estados alélicos que están ocupados. Cuando una población sufre una reducción drástica de N_e, generalmente se pierden alelos, reduciendo el valor de k. El valor de r sólo se reduce si el alelo que se pierde es el de mayor o menor tamaño. Por tanto k disminuye más rápidamente que r dando un valor de M menor en poblaciones que han sufrido una reducción en tamaño que en poblaciones que se encuentran en equilibrio. Se propone la existencia de un valor crítico, M_C, por debajo del cual se asume que una población ha sufrido un cuello de botella, siendo este M_C elegido de manera que el 95% de las simulaciones de una población en equilibrio tienen $M > M_C$. El valor, por defecto, es de 0,68 para más de 7 loci. Este modelo depende de tres parámetros: $\theta = 4N_e\mu$ (siendo N_e el tamaño efectivo de población antes del cuello de botella, y μ la tasa de mutación = 5×10^{-4}), p_s, o la proporción de mutaciones simples, y Δ_g, o tamaño medio de las mutaciones no simples. Tras comparar simulaciones y datos reales, concluyeron que la parametrización más razonable era p_s= 90% y Δ_g= 3,5. Se calculó el estadístico M con *M_P_VAL.EXE*, mientras que para calcular el M_C se empleó *CRITICAL_M.EXE* con la parametrización recomendada y con valores de N_e de 500, 1000 y 5000 que corresponden a θ =1, 2 y 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La representación gráfica de las frecuencias alélicas (Figura 1) muestra una distribución *L-shaped,* lo que indicaría que la población se encuentra en equilibrio mutación-deriva, ya que hay una mayor proporción en frecuencias alélicas bajas (0,284 para el rango 0,001-0,1) que para frecuencias alélicas intermedias. Este resultado concuerda con los obtenidos con el resto de pruebas (Tabla 1). Sin embargo, el *M-ratio* test, aunque la población tiene un valor de M de 0,704, por encima del valor M_C= 0,68, no supera a ninguno de los tres valores críticos calculados para las tres situaciones supuestas, por lo que, según este enfoque, la población sí habría pasado por un cuello de botella.

En un reciente estudio de simulación para comparar diferentes métodos para la detección cuellos de botella (Williamson-Natesan, 2005) indicaban que, al utilizarse diferentes estadísticos, se consideran escalas de tiempo diferentes para detectar estas reducciones del N_e. El modelo que mostró la menor potencia fue el *"método gráfico*". El *M-ratio test*, mostró ser mejor cuando el cuello de botella había durado varias generaciones y posteriormente la población había tenido una recuperación demográfica y cuando el N_e antes del cuello de botella era grande. Sin embargo, los otros tres test eran mejores si el cuello de botella era menos severo, o era muy reciente o la N_e antes de su reducción era pequeña. Además, el *M-ratio* puede estar sesgado a la baja si se han introducido nuevos alelos de poblaciones vecinas (Garza y Williamson, 2001).

Hay evidencias de animales de plumaje giro de características similares a nuestra población, descritos a principios del siglo XX (1920), estando enmarcados dentro de las razas nacionales sin arquetipo (Grimal y Gómez, 2007). Dado el sistema de cría en corral que han tenido estos animales, sin control oficial hasta hace pocos años, no sería nada extraña la presencia de genes de otras poblaciones, lo que disminuiría el valor del estadístico M. Por tanto, de acuerdo a los resultados preliminares aquí indicados, se puede concluir que la población de Gallina Valenciana de Chulilla no ha sufrido un descenso reciente en el tamaño efectivo de población. Si bien, el valor del *M-ratio*, puede referirse a algún cuello de botella en el pasado (principios de Siglo XX), seguido de una reciente recuperación en el censo

poblacional. Se precisa continuar estudiando esta posibilidad, aumentando el número de marcadores y el número de muestras de animales de otros orígenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Cournet, J.M. & Luikart, G. 1996. Genet. 144:2001-2014. ● Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3166-3170. ● Garza, J.C. & Williamson, E.G. 2001. Mol. Ecol., 10: 305-318. ● Grimal, A. & Gómez, E. 2007. Arch. Zootec. 56: 523-528. ● Luikart, G., Allendorf, F.W., Cournet, J.M. & Sherwin, W.B. 1998. J. Hered. 89:238-247. ● Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. 1999. J. Hered. 90: 502-503. ● Williamson-Natesan, E. 2005. Conserv. Genet. 175: 219-233.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado con fondos FEDER-INIA para proyectos de conservación de recursos zoogenéticos (RZ2004-040 y RZ2008-279).

BOTTLENECK DETECTION IN CHULILLA VALENCIAN BREED

ABSTRACT: Several tests for detecting recent population bottleneck were applied to the Chulilla Valencian breed using allele frequency data, with a battery of 20 microsatellites. Sing test (or heterozygosity excess when compared with a population in equilibrium), Standardized differences test (differences between observed and expected heterozygosity in the equilibrium) and Signed rank test were not significant. Observed distribution of microsatellites frequencies was L-shaped, indicating mutation drift equilibrium, with a larger proportion of low frequencies. In recently reduced populations, M-ratio value is smaller than critical. Estimated M-ratio was 0.704, lower than critical values, but this ratio could be biased when new alleles were introduced coming from neighbourhood. Most sensible analyses must be done considering the prolonged small population size of Chulilla Valencian breed.
Keywords: *bottleneck, genetic resources, genetic diversity, microsatellite, Chulilla breed*

Tabla 1*. Test para la detección de reducciones recientes en el tamaño efectivo de población. (*N_e de 500, 1000 y 5000 se corresponden con θ =1, 2 y 10)

Bottleneck Tests		*M-ratio* Test	
Sing test	Exp = 11,30 Obs = 12 Prob. = 0,475	M	0,704
		Mc (θ= 1)	0,814
Standardized differences test	T2 = 1,099 Prob. = 0,136	Mc (θ= 2)	0,785
		Mc (θ=10)	0,747
Wilcoxon's signed rank test	Prob. = 0,108		

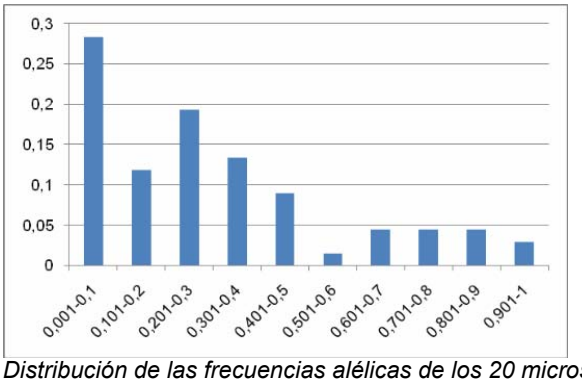


Figura 1*. Distribución de las frecuencias alélicas de los 20 microsatélites.*