LAS RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS: CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS

J. Jordana[1], R. Cuenca[1], M. Ponsà[2], M. Gómez[3], J. Pastor[1], J.A. Aranguren[1], E. García[1], N. Alaoui[1], y F. Vidal[2].

[1] Departament de Patologia i Producció Animals. Facultat de Veterinària. UAB. 08193-Bellaterra (Barcelona).
[2] Departament de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. UAB. 08193-Bellaterra (Barcelona).
[3] Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia. Avda. Lehendakari Aguirre, 9, 2ª. 48014-Bilbao.

INTRODUCCIÓN

La disminución en el número mundial de razas está afectando de forma dramática a todas o casi todas las especies, surgiendo la controversia de si se tienen o no que conservar [13,14]. Al perderse las razas, se pierden los genes que llevan, y el problema más grave es el gran desconocimiento, a todos los niveles, que tenemos de muchas de estas poblaciones con tendencia a la extinción.

En lo que se refiere a la población asnal española, así como a la caballar y mular, sus tamaños censales han ido disminuyendo ininterrumpidamente durante las últimas décadas. A principios de siglo existían aproximadamente un millón de ejemplares, siendo las décadas de los años 60 y 70 cuando se produce el gran descenso de los asnos, y de los équidos en general, probablemente debido a la intensa mecanización del campo. El último dato censal, correspondiente al año 1994, cifra el número total de asnos en España en unos 90.000, y la tendencia es a la baja.

Por lo que respecta a la situación de las razas autóctonas españolas (*Andaluza, Asno de las Encartaciones, Catalana, Mallorquina y Zamorana-Leonesa*), comentar que su censo global no supera ni el millar de ejemplares. En todas ellas, el número efectivo de hembras reproductoras es inferior a 100, con lo que las podemos clasificar, según la FAO, en la categoría de Razas Críticas. Sin ningún tipo de acción, su tamaño efectivo de población es inadecuado para prevenir continuas pérdidas genéticas en generaciones futuras. Razones y argumentos válidos para su conservación podemos encontrar tanto de tipo Genético-Productivo, como de tipo Científico, razones Histórico-Culturales, así como razones de tipo Ecológico-Ambiental.

En las poblaciones de reducido tamaño poblacional, como son las que nos ocupan, los problemas derivados de la consanguinidad suelen ser importantes, fundamentalmente por dos motivos: por la llamada Depresión Consanguínea, que comporta una disminución en los rendimientos promedio de los caracteres cuantitativos, sobretodo aquellos relacionados con la esfera reproductiva; y para evitar, así mismo, una disminución de la variabilidad genética de las razas debido a la homocigosidad creciente que comporta la consanguinidad. Por ello, los posibles Programas de Conservación que se pudieran instaurar en estas poblaciones de animales vivos "*in situ*", deberían tener como objetivos fundamentales y prioritarios el ***"Mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética"***, con el ***"Mínimo incremento de consanguinidad posible por generación"***. Para tener en cuenta este objetivo, el criterio de elección para el apareamiento óptimo de un macho con una hembra, tendría que ser aquel que maximizara el llamado Indice de Conservación Genética [1,3] y minimizara la Consanguinidad (F) de un hipotético hijo de la pareja.

El estudio que aquí se propone se enmarca dentro del proyecto CICYT (AGF98-0503), para la caracterización y análisis de las relaciones filogenéticas de estas razas autóctonas españolas, para así poder establecer las pautas o recomendaciones más idóneas tanto para la conservación genética *"in situ"* como *"ex situ"* de estas poblaciones, de forma similar a lo que se viene realizando en la *Raza Asnal Catalana* [4,5,6,7,8,10,11,12], programa de conservación iniciado en el año 1995 en colaboración con el DARP de la Generalitat de Catalunya, la asociación AFRAC (*Associació del Foment de la Raça Asinina Catalana*) y la Unidad de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo último del presente proyecto es sentar las bases para la posible puesta en marcha de los futuros *"Programas de Conservación y Mantenimiento de Recursos Genéticos Animales"* en las razas asnales españolas: *Andaluza, Asno de las Encartaciones, Catalana, Mallorquina y Zamorana-Leonesa.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Descripción general de las poblaciones: Recopilación de datos preliminares de interés general. Inventario censal, registro e identificación individual con microchips.

Objetivo 2: Caracterización de las razas.

2.1 Caracterización Morfológica: Se realizará tanto a nivel cualitativo como biométrico. Esto podrá permitir, entre otras cosas; crear, reglamentar, poner en marcha y gestionar (por parte de las diferentes Asociaciones) los correspondientes Libros Genealógicos de las razas.

2.2. Caracterización Hematológica y Bioquímica Clínica: La determinación de los perfiles hematológicos y bioquímico clínicos, permitirá establecer los rangos de referencia o de normalidad para las diferentes razas, para ser posteriormente comparados entre si y con los obtenidos en otras razas mundiales de asnos. Además de su utilidad en la caracterización racial, la determinación de estos perfiles podría ser de mucha utilidad para la práctica clínica veterinaria.

2.3. Caracterización Genética: A partir del análisis de polimorfismos bioquímicos y de *loci* moleculares microsatélites. Estudio y análisis del polimorfismo cromosómico. El análisis de los marcadores genéticos permitirá, a nivel general, caracterizar genéticamente las razas tal como ya hemos dicho, así como, la posibilidad de realizar estudios de la estructura poblacional y de las relaciones filogenéticas existentes entre las mismas. A nivel individual serán de utilidad para la identificación genética de los individuos, control de la paternidad en genealogías dudosas, o de forma rutinaria, en vistas a una mejor gestión del Libro Genealógico y a la programación de apareamientos. Además, cuando en alguna raza no se disponga de información genealógica, o ésta sea deficiente, el conocimiento de las combinaciones haplotípicas de los diferentes marcadores podrá ser de utilidad para identificar los individuos más heterocigotos de la población y/o aquellos con un mayor número de alelos raros [17], y así poder programar los apareamientos más idóneos para retener al máximo la variabilidad genética de la población.

2.4. Caracterización de la Estructura Genealógica y Demográfica: Si los objetivos prioritarios en los hipotéticos Programas de Conservación "*in situ*" que se pudieran establecer tenían que ser (1) el mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética, (2) con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación, resultaría de gran utilidad toda la información que se pudiera derivar del análisis de los pedigrees, ya que el conocimiento de las relaciones de parentesco entre los individuos así como del número de fundadores efectivos que existe en el pedigree de cada uno de ellos, sería de vital importancia para la programación de apareamientos que fueran óptimos para conseguir los objetivos anteriormente propuestos.

METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

La caracterización racial en los diferentes niveles que proponemos, ha sido ampliamente estudiada en muchas razas de las diversas especies, por lo que la metodología a utilizar aunque no sea novedosa, si que va a ser original en muchos de sus apartados en la especie asnal (*Equus asinus*), debido a la gran escasez de trabajos que existen a nivel mundial en esta especie. Intentaremos, dentro de lo posible, muestrear el máximo número de animales, todos idealmente. No obstante, y para que los diferentes análisis sean mínimamente fiables y estadísticamente significativos, el número de individuos muestreados no será nunca inferior a 50 animales por raza, procurando siempre y cuando ésto sea posible, mantener una ratio similar en el número de machos y hembras muestreados. Comunicaciones personales mantenidas con las diferentes asociaciones e instituciones, permiten avanzar esta cifra como punto de partida para el muestreo.

1. Caracterización Morfológica

La toma de medidas morfométricas se realizará en individuos adultos de ambos sexos, con una edad no inferior a 3 años. Se tomarán un total de 26 medidas corporales, 7 cefálicas, 13 troncales y 6 de las extremidades, mediante bastón zoométrico, compás de brocas y cinta métrica. A partir de estas variables se obtendrá asimismo información para 12 índices zoométricos.

La información generada se almacenará en una base de datos (Microsoft Access) y se analizará estadísticamente utilizando el paquete SAS. Asimismo, se estudiará de forma gráfica (dendrograma) la relación existente entre las variables, mediante el método del análisis de *clusters* utilizando el algoritmo UPGMA (PHYLIP computer package). El poder diferenciador de las variables analizadas se cuantificará mediante un análisis discriminante múltiple (SAS). A partir de los datos morfológicos cualitativos se procederá al cálculo de la distancia genética MCD (Mean Character Difference), que será utilizada para generar los correspondientes árboles filogenéticos mediante el programa PAUP. De forma similar, a partir de las variables morfológicas cuantitativas se calculará la distancia genética de Mahalanobis, procediendo posteriormente a la reconstrucción filogenética (programas PHYLIP y PAUP). Los dendrogramas resultantes se discutirán y compararán con los obtenidos a partir de marcadores genéticos

2. Caracterización Hematológica y Bioquímica Clínica.

Las extensiones para evaluación diferencial de los perfiles hematológicos se realizarán inmediatamente después de la llegada de la muestra al laboratorio, procediéndose a analizar un total de 16 variables hematológicas mediante metodologías analíticas estandarizadas. Así mismo, se analizarán un total de 12 variables séricas bioquímicas utilizando kits comercialmente disponibles. El efecto de los factores sexo y edad sobre dichos parámetros, serán analizados para las variables distribuidas normalmente o aproximadas a una normal después de una "*power transformation*". Para aquellas variables que no se puedan ajustar a una normal, se utilizarán análisis de test no-paramétricos. Todos los análisis se llevarán a cabo mediante el paquete estadístico SAS.

3. Caracterización Genética.

Se analizarán, en principio, un total de 7 *loci* génicos bioquímicos (TF, A1B, ALB, PI, GC, PGD y GPI), mediante técnicas convencionales de electroforesis [2]. El *Equine Paternity PCR Typing Kit* (PE, USA), permitirá analizar un total de 12 *loci* microsatélites (*VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, AHT5, ASB2, HTG7, HMS3, HTG10* y *HMS2*), y adicionalmente, otros 7 *loci* microsatélites, aislados de caballo, serán analizados de forma independiente mediante marcado fluorescente (MPZ001, MPZ002, HTG8, HTG14, HTG15, HMS1 y HMS5). Los productos amplificados de PCR, se analizarán con un equipo Applied Biosystems 310 DNA Sequencer (ABI, Foster City, CA) mediante el software de análisis GENESCAN (ABI). El estudio de la estructura genética poblacional se llevará a cabo mediante los F-estadísticos de Wright, siguiendo la metodología de Weir and Cockerham [18], programas FSTAT y MICROSAT. Para el estudio de las relaciones filogenéticas, se utilizarán como distancia y algoritmo de elección [16], para ambos tipos de marcadores, la distancia D_A de Nei et al. [15] y el algoritmo NJ (neighborn-joining method), utilizando para ello el programa DISPAN. No obstante, también se utilizará la distancia $(\delta\mu)^2$ de Goldstein et al. [9] para los microsatélites (programa MICROSAT), realizando posteriormente las oportunas comparaciones.

La variabilidad intraespecífica que corresponde a los polimorfismos cromosómicos es una parte muy importante de la biodiversidad y fundamental para entender la evolución. A partir de cultivos linfocitarios se obtendrán células en metafase. Los cromosomas se teñirán siguiendo las metodologías clásicas para estudiar las bandas eucromáticas (bandas G) y las heterocromáticas (bandas C), así como las bandas producidas mediante la utilización de diferentes enzimas de restricción. La variabilidad observada se analizará mediante los programas PHYLIP y PAUP.

4. Caracterización de la estructuración genealógica y demográfica.

Para aquellas poblaciones en las cuales dispongamos de suficiente información genealógica, se procederá al cálculo de los correspondientes parámetros demográficos. Los coeficientes de consanguinidad (F) de cada individuo serán calculados utilizando un programa especialmente diseñado para ello, a partir del algoritmo de Quass-Henderson; y a partir de los trabajos realizados por Boichard et al. [3], se procederá al cálculo del número efectivo de fundadores (f_e) que existen en el pedigree de un individuo, medida equivalente al Indice de conservación genética [1], como indicador de la capacidad que tiene un individuo para conservar la variabilidad genética ancestral de la población fundadora.

REFERENCIAS

[1] Alderson, G.L.H. (1992). In: *Genetic Conservation of Domestic Livestock*, CAB, Wallingford, 18-29.

[2] Bell, K. (1994). *Animal Genetics*, 25 (S1):109-113.

[3] Boichard, D., Maignel, L. and Verrier, E. (1997). *Genetics Selection Evolution*, 29:5-23.

[4] Folch, P.and Jordana, J. (1997). *J. Equine Vet. Sci.*, 17:102-111.

[5] Folch, P. y Jordana, J. (1997). *ITEA* Vol Extra 18, 348-350.

[6] Folch, P. and Jordana, J. (1998). *Genetics Selection Evolution*, 30:195-201.

[7] Folch, P., Jordana, J. and Sánchez, A. (1996). *Animal Genetics*, 27 (S2):34.

[8] Folch, P., Jordana, J. and Cuenca, C. (1997). *The Veterinary Journal*, 154:163-168.

[9] Goldstein, D.B., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L. and Feldman, M.W. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6723-6727.

[10] Jordana, J. and Folch, P. (1996). *J. Equine Vet. Sci.*, 16:436-441.

[11] Jordana, J. i Folch, P. (1998). *Catalunya Rural i Agrària*, 42:5-8.

[12] Jordana, J., Folch, P. and Cuenca, C. (1998). *Research in Veterinary Science*, 64:7-10.

[13] Land, R.B. (1986). In: *3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.*, Vol.XII, 486-491.

[14] Maijala, K., Cherekaev, A.V., Devillard, J.M., Reklewski, Z., Rognoni, G., Simon, D.L. and Steane, D.E. (1984). *Livestock Production Science*, 11:3-22.

[15] Nei, M., Tajima, F. and Tateno, Y. (1983). *Journal of Molecular Evolution*, 19:153-170.

[16] Takezaki, N. and Nei, M. (1996). *Genetics*, 144:389-399.

[17] Toro, M., Silió, L., Rodrigáñez, J. and Rodríguez, C. (1998). *Genetics Selection Evolution*, 30:585-600.

[18] Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). *Evolution*, 38:1358-1370.