RELACIONES GENÉTICAS ENTRE RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS A PARTIR DEL ANÁLISIS DE MARCADORES MICROSATÉLITE

J.A. Aranguren-Méndez [a], J. Jordana [a] y M. Gómez [b]

[a] Unitat de Genètica i Millora Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona.
[b] Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia, 48014-Bilbao.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones minoritarias ha tomado un gran auge, debido principalmente a la concienciación del hombre en la necesidad de preservar dichos recursos genéticos. La importancia de la biodiversidad quedó patente en la cumbre de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo, celebrada en Río de Janeiro (1992), estableciéndose la necesidad de estudiar los diferentes componentes de la diversidad biológica. La importancia e interés de la preservación se podría resumir en cuatro aspectos fundamentales: genético-productivos, científicos, histórico-culturales y ecológico-ambientales (Simon, 1984; Anonymous, 1992).

De las razas asnales españolas (*Andaluza, Asno de las Encartaciones, Catalana, Mallorquina y Zamorano-Leonesa*), se puede indicar que se encuentran catalogadas, según criterios de la FAO, en el estatus de razas críticas en inminente peligro de extinción, ya que atraviesan actualmente una regresión racial que conllevaría a su inevitable desaparición de no tomarse medidas urgentes de conservación (Jordana y Folch, 2000). Sus tamaños censales se han visto reducidos en un 80% desde la década de los 60 hasta nuestros días. El número efectivo de hembras reproductoras oscila entre 100 y 200 (Com. Pers. Asociaciones de Criadores de Asnos; Jordana y Folch, 1996), por lo que, sin ningún tipo de acción serían inevitables las constantes pérdidas de variabilidad genética en generaciones sucesivas (Bodó, 1992).

La caracterización genética de las razas, a partir del análisis de marcadores de ADN del tipo microsatélite, permitirá realizar estudios de estructura poblacional y conocer las relaciones filogenéticas existentes entre las mismas. Dicha caracterización será básica para lograr alcanzar uno de los objetivos fundamentales de cualquier programa de conservación, como es, el mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética posible.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 513 muestras sanguíneas de asnos españoles, distribuidos de la siguiente manera: 87 Andaluces (AND), 74 Asnos de las Encartaciones (ENC), 140 Catalanes (CAT), 104 Mallorquines (MALL) y 108 de la raza Zamorano-Leonesa (ZAM). Adicionalmente, 9 asnos de raza Marroquí fueron utilizados como genuinos representantes del *Equus asinus africanus,* y 24 caballos de la raza Merens fueron usados como población "outgroup". El ADN se obtuvo según protocolo estándar de extracción en sangre de Ausebel *et al.*(1987).

Los 15 marcadores microsatélites utilizados fueron: ASB2, AHT4, AHT5, HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, HTG15 y VHL20. Se amplificaron, utilizando "primers" marcados fluorescentemente, en tres múltiplex de 5 marcadores cada una, con el fin de evitar solapamiento entre los productos originados de la PCR. Las múltiplex se llevaron a cabo en una reacción final de 15 µl y se amplificaron en un termociclador 9700 (Perkin Elmer), a 95ºC durante 10 min., seguido de 30 ciclos que comprendían 95ºC por 30 seg., 60ºC por 30 seg. y 72ºC por 60 seg., y una extensión final de 60 min. a 72ºC. Los productos de la PCR se analizaron en un secuenciador automático de electroforesis capilar

(ABI 310), e interpretados posteriormente mediante el programa GENESCAN, utilizando el marcador de tamaños ROX 350.

Para el análisis de la variabilidad genética se calcularon las frecuencias alélicas, número medio de alelos por locus y valores de heterocigosidad (observada y esperada), utilizando el programa BIOSYS 2 (Swofford and Selander, 1999). Para el análisis de la subestructuración poblacional, mediante los F-estadísticos (F_{IS}, F_{IT} y F_{ST}), se utilizó el paquete FSTAT (Goudet, 2000). La distancia genética D_A (Nei et al, 1983) y el método de agrupamiento del algoritmo NJ (neighbour-joining), fueron de elección para la confección del dendrograma, lo cual fue llevado a cabo utilizando el programa DISPAN (Ota, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 15 *loci* microsatélites (aislados de caballo) amplificaron correctamente en asnos, con la excepción de ASB2. Los 14 que amplificaron fueron todos polimórficos, con la excepción de HMS1 (alelo 165 pb, para todas las razas). La variabilidad genética detectada por razas, se puede observar en la Tabla 1. Se obtuvieron como promedio 7,2 alelos por *locus*, aunque tan sólo 4,5 de éstos fueron comunes para las 5 razas bajo estudio. El *locus* con mayor número de alelos fue el AHT4, con 15 alelos, mientras que el que mostró menos resultó ser el HMS5 con 3 alelos por raza. El test ANOVA no mostró diferencias significativas para el número medio de alelos por raza, oscilando dichos valores entre 7,0 y 7,5 para las razas Andaluza y Mallorquina, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron con las heterocigosidades, que oscilaron entre 0,637 y 0,684.

Tabla 1. Estadísticos de variabilidad genética para las razas asnales españolas.

Raza	Número de individuos	No. Medio de alelos por locus	Heterocigosis	
			Observada	Esperada
Andaluza	87	7.0 ± 1.0	0.532 ± 0.052	0.679 ± 0.034
Catalana	140	7.1 ± 1.0	0.528 ± 0.062	0.663 ± 0.055
Mallorquina	104	7.5 ± 0.9	0.570 ± 0.063	0.637 ± 0.054
Encartaciones	74	7.4 ± 1.0	0.564 ± 0.066	0.646 ± 0.059
Zamorano-Leonesa	108	7.3 ± 1.1	0.539 ± 0.058	0.684 ± 0.044
Media		7.2 ± 1.0	0.546 ± 0.060	0.654 ± 0.048

Los F-estadísticos se muestran en la Tabla 2. En la misma se puede apreciar que cerca del 4% del total de la variación genética se puede explicar por las diferencias entre razas, correspondiendo el 96% restante a diferencias entre individuos. Como promedio, las razas mostraron un 17,8% de déficit de heterocigotos, oscilando entre el 11,2% para la raza Mallorquina y el 23,2% para la Andaluza. Estos valores nos muestran un elevado estado de déficit, característico y principal problema de las poblaciones de censos reducidos. Asimismo, debemos tener en cuenta que pueden ser varios los fenómenos biológicos causantes de este déficit, tales como: que el locus este asociado a algún carácter de interés selectivo (efecto de arrastre), presencia de alelos nulos, subestructura de la población (efecto Wahlund) y el apareamiento entre parientes (consanguinidad). Alguno (principalmente la consanguinidad) o la combinación de algunos de ellos podrían estar actuando en estas poblaciones.

Tabla 2. Análisis de la estructura poblacional mediante los F-estadísticos

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
AHT4	0.074 (0.030)***	0.107 (0.032)***	0.036 (0.020)***
AHT5	0.163 (0.034)***	0.201 (0.040)***	0.045 (0.010)***
HMS2	0.147 (0.032)***	0.159 (0.032)***	0.014 (0.006)***
HMS3	0.031 (0.042)	0.069 (0.045)**	0.039 (0.030)***
HMS5	- 0.032 (0.038)	0.105 (0.098)**	0.136 (0.071)***
HMS6	0.254 (0.067)***	0.286 (0.074)***	0.042 (0.029)***
HMS7	0.481 (0.065)***	0.496 (0.069)***	0.028 (0.022)***
HTG4	0.777 (0.046)***	0.791 (0.044)***	0.062 (0.044)***
HTG6	0.201 (0.064)***	0.258 (0.073)***	0.070 (0.020)***
HTG7	0.126 (0.039)***	0.155 (0.049)***	0.033 (0.017)***
HTG10	0.090 (0.019)***	0.126 (0.026)***	0.039 (0.013)***
HTG15	0.063 (0.030)**	0.078 (0.019)***	0.017 (0.012)***
VHL20	0.060 (0.090)	0.116 (0.123)***	0.057 (0.038)***
Media estimada	0.178 (0.047)***	0.211 (0.046)***	0.041 (0.005)***

**P< 0.01, *** P<0.001, a partir de test permutacionales mediante el programa FSTAT

La Figura 1 muestra las relaciones entre las razas asnales españolas. Podemos apreciar que las razas CAT y MALL forman un grupo muy consistente, así como las cuatro razas de capa negra del Norte de España (77% de confianza), descendientes del *E. a. europeus*. La raza AND ocupa una posición intermedia entre este grupo y el asno de Marruecos, apoyando así la hipótesis acerca de su posible origen africano (*E. a. africanus*), aunque las relaciones no están muy claras y estudios más específicos, como los del ADN mitocondrial, podrían ser necesarios para confirmar estas evidencias.

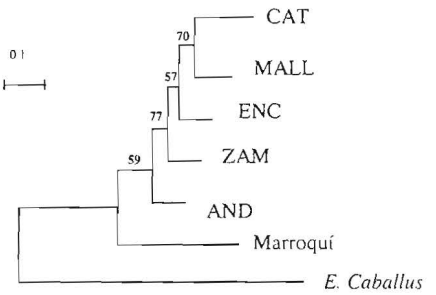


Figura 1. Dendrograma con D_A y NJ en las razas asnales españolas. (Los valores de las bifurcaciones representan el % de replicaciones bootstrap).

REFERENCIAS

Anonymous. (1992).The management of global animal genetic resources. Hodges J. (ed.), FAO, Rome, pp. 1-24.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman G.G., Smith J.A., Struhl K., (Eds.). (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Green pub. ass. and Wiley-Interscience, NY.

Bodó I. (1992). The management of global animal genetic resources. Hodges J. (ed.), FAO, Rome, pp. 91-105.

Jordana J. and Folch P. (1996). J. Equine Vet. Sci., 16, 436-441.

Jordana J. y Folch P. (2000). Catalunya rural i agrària. 63, 33-38.

Goudet J. (2000). FSTAT(version 2.9.1). http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html.

Nei M., Tajima F., Tateno T. (1983). J. Mol. Evol., 19, 153-170.

Ota T. (1993). DISPAN software. Genetic distance and phylogenetic analysis. University Park, PA.

Simon, D. L. (1984). Livestock Production Science. 11, 23-36.

Swofford D.L. and Selander R. B. (1999). BIOSYS-2. University of Illinois, Champaign, IL.

AGRADECIMIENTOS: Trabajo financiado por CICYT, AGF98-0503 y DARP.