ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL EN POBLACIONES ASNALES

J.A. Aranguren-Méndez[1,2], A. Beja-Pereira[3], R. Avellanet[1], K. Dzama[4] y J. Jordana[1]

[1]Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Bellaterra, 08193. Barcelona.
[2]Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción Animal. Maracaibo 4001-A. Venezuela.
[3]Centro de Estudos de Biodiversidade, ICETA-Universidade do Porto, Campus Agrario de Vairão, 4485 661 Vairão, Portugal.
[4]Department of Paraclinical Veterinary Studies, University of Zimbabwe, P.O.Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe.

INTRODUCCIÓN

Trabajos previos, realizados a partir del análisis de marcadores moleculares de ADN del tipo microsatélite, permitieron realizar estudios de la estructura poblacional y las relaciones filogenéticas existentes entre cinco razas asnales de la península ibérica (Aranguren-Méndez y col. 2001, 2002a, 2002b). De forma general, los resultados mostraron que las cuatro razas asnales de capa negra del Norte de España (Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa) formaban un grupo más o menos sólido, mientras que la raza Andaluza se relacionaba más estrechamente con la población de Asnos de Marruecos, soportando la teoría de un hipotético origen africano a partir del *Equus asinus africanus*. Sin embargo, los valores relativamente bajos de bootstrap reflejaban una cierta inestabilidad de la topología.

El principal objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética y las relaciones existentes entre las razas asnales españolas, a partir del análisis de dos regiones conocidas del ADN mitocondrial, específicamente, una porción del gen del citocromo b y otra del D-loop. Para ello, además de las cinco razas peninsulares y la población Asno de Marruecos, se adicionó en el análisis una sexta raza asnal española, oriunda del archipiélago canario, la raza Majorera; así como, individuos de otra población asnal africana, el Asno de Zimbabwe, con el objetivo de que nos ayudaran a aclarar las relaciones filogenéticas entre estas razas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo ADN (genómico y mitocondrial) a partir de muestras sanguíneas de un total de 91 individuos muestreados al azar. 71 correspondían a las seis razas españolas: AND Andaluza (n=20), CAT Catalana (n=10), ENC Encartaciones (n=11), MAJ Majorera (n=10), MALL Mallorquina (n=10) y ZAM Zamorano-Leonesa (n= 10). Adicionalmente se obtuvieron 20 muestras de asnos africanos, de dos diferentes localizaciones: MOR Marruecos (n=9) y ZIM Zimbabwe (n=11). Estos se incluyeron como genuinos representantes del *E.a.africanus* y del *E.a.somaliensis*, respectivamente. Las secuencias publicadas del caballo (*E.caballus*), obtenidas del GenBank (nº de acceso X93337), se incluyeron en los análisis filogenéticos como un outgroup.

Los "primers" (oligonucleótidos) para la PCR de la región hipervariable del D-loop se diseñaron en base a la secuencia del ADNm de asno almacenada en el GenBank (Xu y col., 1996). Estas secuencias amplificaron un fragmento de 383 pb entre los sitios nucleotídicos 15387 y 15769. Asimismo se amplificó un fragmento de 312 pb de la región del citocromo b, entre los sitios nucleotídicos 14391 y 14703. Las condiciones de PCR, la secuenciación de sus productos, mediante un secuenciador automático (ABI Prism 310 DNA sequencer), y el análisis de los mismos mediante el software de secuenciación Genescan, así como el análisis de todos los estadísticos de diversidad mitocondrial, utilizando para ello los

programas Clustal-X, ARLEQUÍN, MEGA, NTSYS y REAP, están descritos en Aranguren-Méndez (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis de dichas regiones se obtuvieron 6 haplotipos para el citocromo b (SPAN-1 a SPAN-6) y 7 para el D-loop (ATI-1 a ATI-7). La región que aportó más información acerca de la diversidad genética entre las razas fue la D-loop, por lo que únicamente nos centraremos en ella. En la Tabla 1 se muestran las frecuencias de los haplotipos del D-loop en las 8 poblaciones analizadas. Cabe destacar que 4 de los 7 haplotipos estuvieron presentes únicamente en una o dos razas, y que ninguno se presentó en todas las razas a la vez. Los haplotipos más frecuentes, tanto en las razas españolas como africanas, fueron ATI-1 y ATI-3, presentes en 7 y 5 de las 8 poblaciones totales, respectivamente, resultando ser además los más ancestrales. Las relaciones entre estos 7 haplotipos se muestran en la Figura 1, pudiéndose observar dos grupos claramente definidos. El grupo formado por ATI-2, ATI-4, ATI-6 y ATI-7 se presentó únicamente en razas españolas. La diversidad nucleotídica (π) osciló entre 0,0006 para la raza Catalana y 0,0169 para la raza Andaluza.

A partir de los estadísticos de diversidad se calcularon las divergencias nucleotídicas (d_A) y las substituciones nucleotídicas (d_{XY}) entre poblaciones, las cuales nos dan una estimación de la distancia genética existente entre grupos. En la Figura 2 se puede observar el dendrograma obtenido a partir de los valores d_{XY} mediante el algoritmo neighbour-joining (NJ), que muestra unas relaciones totalmente incongruentes con la distribución geográfica de las razas y con las relaciones obtenidas con marcadores microsatélites. La raza Encartaciones es claramente excepcional al clusterizar sola, así como la agrupación de las dos poblaciones africanas con las razas Catalana y Mallorquina, al menos desde el punto de vista geográfico. Los efectos del tipo "cuellos de botella" o "efectos fundadores" podrían ser la explicación más plausible para comprender la inesperada y marcada separación existente entre la raza ENC con respecto a las demás razas españolas.

Otro hallazgo importante es la estrecha similitud o relación que presentan las razas Andaluza y Majorera. Ambas razas comparten la gran mayoría de haplotipos, tanto de citocromo b como de D-loop, y poseen dos haplotipos privados (SPAN-3 y ATI-5), presentes únicamente en estas dos razas. Estos resultados nos sugieren un posible origen ancestral común o un gran intercambio de reproductores entre ellas.

A modo de conclusión, los resultados obtenidos a partir del análisis del ADNm parecen indicar que el origen evolutivo del asno español podría derivarse de un único y común tronco ancestral con las razas africanas estudiadas. O bien que, procediendo de dos troncos ancestrales, las actuales razas españolas serían producto de una mezcla de diferentes líneas maternas como consecuencia de la gran afluencia africana que ha tenido España, directa o indirectamente, a través de los siglos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aranguren-Méndez, J.A. (2002). Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Aranguren-Méndez, J.A., Jordana, J. and Gómez, M. (2001). *Genetics, Selection, Evolution*, 33, 433-442.

Aranguren-Méndez, J.A., Gómez, M. and Jordana, J. (2002a). Heredity, 89, 3, 207-211.

Aranguren-Méndez, J.A., Jordana, J. and Gómez, M. (2002b). Journal of Animal Breeding and Genetics, 119, 256-263.

Xu, X., Gullberg, A. and Arnanson, U. (1996). Journal of Molecular Evolution, 43, 438-446.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT (AGF98-0503) y el DARP de la Generalitat de Catalunya.

Tabla 1. Frecuencias de los 7 haplotipos del D-loop mitocondrial observados en las 6 razas asnales españolas y las 2 poblaciones africanas.

Haplotipo	AND (20)*	CAT (10)	ENC (11)	MAJ (10)	MALL (10)	ZAM (10)	MOR (9)	ZIM (11)	Total (91)
ATI-1	0.20	0.90	—	0.20	0.70	0.80	0.78	0.91	0.517
ATI-2	0.30	—	—	0.30	—	0.20	—	—	0.121
ATI-3	—	0.10	0.09	—	0.30	—	0.22	0.09	0.088
ATI-4	0.10	—	—	—	—	—	—	—	0.022
ATI-5	0.40	—	—	0.50	—	—	—	—	0.143
ATI-6	—	—	0.82	—	—	—	—	—	0.099
ATI-7	—	—	0.09	—	—	—	—	—	0.010

* Número de animales analizados para cada población.

Figura 1. Dendrograma N-J para los 7 haplotipos del D-loop, con la secuencia de caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan el porcentaje de 1.000 replicaciones bootstrap

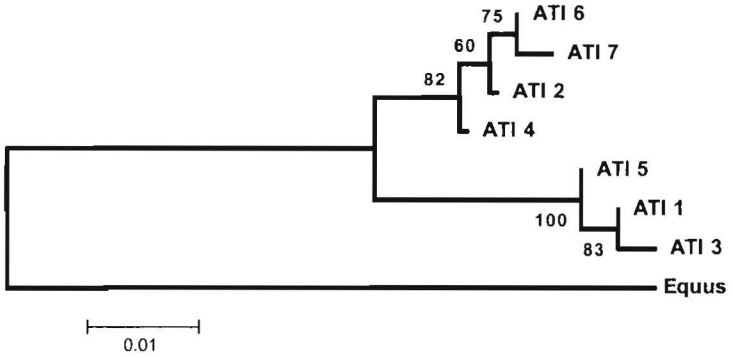


Figura 2. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y las dos poblaciones africanas, basadas en el número medio de substituciones nucleotídicas entre poblaciones (d_{XY}).

