

Unidad de Genética y Mejora Animal
Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Autónoma de Barcelona

Programa de Doctorado de Producción Animal

**CARACTERIZACIÓN Y RELACIONES FILOGENÉTICAS DE
CINCO RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS EN PELIGRO DE
EXTINCIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MARCADORES
MICROSATÉLITES: SU IMPORTANCIA EN LOS PROGRAMAS
DE CONSERVACIÓN.**

Memoria presentada por

José Atilio Aranguren Méndez

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Bellaterra, Abril del 2002

**CARACTERIZACIÓN Y RELACIONES FILOGENÉTICAS
DE CINCO RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS EN PELIGRO
DE EXTINCIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
MARCADORES MICROSATÉLITES: SU IMPORTANCIA
EN LOS PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN.**

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso. A Mirella, mí querida madre y a Xomaira mi amantísima esposa, quien me ha dado la mayor felicidad de mi vida, mis dos angelitos: José Atilio Jr. y Andrea Lucia

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad del Zulia, por darme la oportunidad de superar la oscuridad de la ignorancia, permitiéndome la salida para cursar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Jordi Jordana Vidal, el cual además de ser mi director de tesis, es también un gran colega y amigo.

A los Dres. Armand Sánchez y Jesús Piedrafita, quienes me guiaron por la ruta de la genética molecular y el mejoramiento genético.

A la Universitat Autònoma de Barcelona y en especial al personal docente y de investigación del Dpto. de Ciència Animal i dels Aliments, por abrirme las puertas y permitirme continuar con mi formación académica-investigativa.

A los Dres. Ninoska Madrid, Carlos González-Stagnaro, Rafael Róman y Javier Goicochea, por siempre haber sido un ejemplo a la ética, profesionalismo y superación; también por su continuo asesoramiento y amistad.

A mis colegas Venezolanos en Barcelona, Armando Quintero, William Mejías, María Rodríguez, Aixa Urdaneta, Wilfido Briñez, Jorge Ruiz, Fanny Gallardo, Gabriela y Gustavo quienes han compartido sus experiencias con mi persona. Y por supuesto a sus respectivas costillas. Y en especial a la memoria del amigo Douglas Osuna, que Dios lo tenga en su gloria.

A mis compañeros de labores y faena en el estudio del asno español: Naima Alaoui, Elizabeth García y Rudy Gutiérrez.

A los amigos del Dpto. Rosa, Guillermo, Txiki, Habib, Elisenda, Oriol, Maria, Ana T., Ana M., Alex, Oscar, Laura, Natalia, Betlem, Marimar, quienes han sabido compartir grandes momentos con el autor.

A los Dres. Olga Francino, Marcel Amillis y José M^a Folch; que siempre estuvieron allí, a la hora de cualquier duda y asesoramiento en aspectos moleculares.

Al Dr. J.L. Foulley (INRA, Quantitative & Applied Genetics) por su ayuda en los análisis de Weitzman. Y al colega A. Beja-Pereira por hacernos llegar las muestras del asno de Zimbabwe.

A las asociaciones de criadores de asnos, por la colaboración prestada, al momento de la recolección de las muestras y por permitirnos disponer de sus animales.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han colaborado tanto conmigo, como con la ejecución del proyecto de tesis.

El trabajo ha estado financiado por la CICYT (AGF98-0503) y el DARP (Generalitat de Catalunya).

RESUMEN

ARANGUREN-MÉNDEZ, JOSÉ ATILIO. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsátélites: Su importancia en los programas de conservación. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. xv, 213 h. (Tesis Doctoral).

El estudio se llevó a cabo con el objeto de sentar las bases para los futuros programas de conservación de las razas asnales españolas. En esta tesis se caracteriza genéticamente a las mismas, ya que ello representa uno de los puntos de partida para lograr alcanzar uno de los objetivos fundamentales de cualquier programa de conservación, cómo es el mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética posible. Para ello se realizó una caracterización detallada de las razas a partir del análisis de 15 *loci* microsátélites (AHT4, AHT5, ASB2, HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, HTG15 y VHL20), aislados de caballos, en un total de 513 individuos, distribuidos de la siguiente manera: Andaluza (87), Catalana (140), asno de las Encartaciones (74), Mallorquina (104) y Zamorano-Leonesa (108). Adicionalmente se incluyeron 9 asnos de Marruecos, utilizados como población de referencia y cómo genuinos representantes del *Equus asinus africanus*, y 24 caballos de la raza Merens, que fueron utilizados como población “outgroup” en algunos de los análisis realizados. De forma similar se evaluaron dos regiones parciales del mtDNA, específicamente del citocromo b y del D-loop, en 79 y 91 secuencias, respectivamente, de las razas antes mencionadas, así como, de 10 y 11 secuencias adicionales correspondientes a la raza Majorera y al asno de Zimbabwe, respectivamente. Los análisis mostraron que los microsátélites amplificaron exitosamente en asnos, excepto el ASB2, que falló en amplificar. Todos fueron polimórficos, excepto el HMS1 que resultó ser monomórfico con 165 pb en todas las razas. La diversidad genética media (H_r) sobre todos los *loci* fue 0.683, sin diferencias significativas entre razas, mientras que el número medio de alelos osciló entre 3 (HMS5) y 15 (AHT4), con ligeras diferencias entre las razas. La PE global resultó ser del 99.99%, para todas las razas. El grado de diferenciación genética resultó ser del 4.1%, contribuyendo todos los *loci* a ella. El déficit promedio de heterocigotos por raza fue del 17.8%, mientras que en la población total ese déficit fue del 21.1%. A nivel jerárquico la diferencia entre razas fue del 6.4%; y las principales causas del déficit de heterocigotos intrarracial resultaron ser la consanguinidad, en las razas AND, CAT y ZAM, y la subestructuración reproductiva en ENC y MALL; no obstante no podemos obviar la posible presencia de alelos nulos en la población, pero debido a la carencia de registros genealógicos no se pudo corroborar. Otros indicadores de

variabilidad, tales como la diversidad de Weitzman, indicaron que la raza Catalana presentaba un mayor porcentaje (29.11) de contribución genética a la diversidad de las razas asnales y las que menos aportaban fueron el asno de las Encartaciones (19.19%) y la raza Mallorquina (20.16%). Las relaciones genéticas mostraron que las razas más próximas siempre fueron la Catalana y Mallorquina, estando la Andaluza siempre más alejada de las razas del norte de España. Por otro lado, el análisis de las secuencias del mtDNA, nos permitió detectar entre 6 y 7 haplotipos, para el citocromo b y el D-loop, respectivamente, con este número reducido los valores de diversidad nucleotídica correspondieron a 0.001 y 0.007, para ambas regiones, respectivamente. Los resultados del mtDNA nos permiten indicar que el estado actual de las razas asnales españolas parecen corresponder al producto de una mezcla de líneas maternas debido a un elevado flujo de genes entre ellas, o bien qué, su origen, se corresponde con la de un ancestro único y común con las razas africanas. Los análisis con marcadores moleculares del tipo microsatélite resultan muy útiles y valiosos para la caracterización genética de las poblaciones asnales, y de esta manera ayudan y contribuyen a una mejor gestión de los planes o programas de conservación de esta especie.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 El problema general de la conservación.	2
1.2 Origen de los asnos.	5
1.3 Las razas asnales españolas.	9
1.4 Protocolo de la FAO para la conservación de poblaciones en peligro de extinción	14
1.5 Variación genética y métodos de detección.	19
RFLP	20
RAPD	20
VNTR	22
STRs	22
1.6 Marcadores Microsatélites.	23
1.6.1 Aplicaciones de los microsatélites.	23
Identificación individual y pruebas de paternidad.	23
Mapas genéticos y genómica comparativa.	25
Estudios de genética poblacional.	26
1.6.2 Mutación, alelos nulos y homoplasia.	27
Mutación.	27
Alelos nulos.	30
Homoplasia.	31
1.7 Análisis de la variabilidad genética.	32

Porcentaje de <i>loci</i> polimórficos.	32
Número medio de alelos por <i>locus</i> .	33
Heterocigosidad.	33
Índice de contenido polimórfico (PIC).	34
Probabilidad de Exclusión (PE).	35
Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W).	35
1.8 Análisis de la estructura de la población.	36
1.9 Diferenciación Genética.	38
Distancias genéticas.	38
Métodos de agrupamientos o algoritmos.	43
Análisis de remuestrados.	44
Diversidad de Weitzman.	45
1.10 Asignación de individuos a raza.	46
1.11 Análisis del ADN mitocondrial.	49
2.- OBJETIVOS	52
Objetivo generales.	53
Objetivos específicos.	53
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1 Material biológico.	56
3.2 Extracción de ADN.	56
3.3 Marcadores microsatélites.	59
3.4 Condiciones de la PCR.	60
3.5 Análisis estadísticos.	62
Variabilidad genética.	62
Estructura de la población.	63
Distancias y relaciones filogenéticos.	64
Asignación de individuos a raza.	65
3.6 Análisis de ADN mitocondrial.	66
Individuos muestreados.	66

PCR y secuenciación de la región D-loop.	67
PCR y secuenciación de la región del citocromo b.	69
Análisis estadísticos	69
Diversidad molecular	69
<i>Minimum spanning tree</i>	73
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.1 Variación genética.	75
4.2 Estructura de la población.	85
4.3 Relaciones filogenéticas y asignación de individuos a raza.	95
4.4 Análisis mitocondrial.	111
5.- DISCUSIÓN GENERAL.	129
6.- CONCLUSIONES.	137
7.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.	140
8.- ANEXOS.	157

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Número de razas de cada una de las 7 principales especies de animales domésticos que están registradas en la FAO (FAO Global Databank for Animal Genetic Resources) y las estimadas en peligro de extinción.	4
TABLA 2. Categorías de las poblaciones de animales domésticos.	6
TABLA 3. Principales tipos de marcadores de ADN.	21
TABLA 4. Descripción poblacional de las 5 razas de asnos españoles analizadas.	58
TABLA 5. Secuencias de los “ <i>primer</i> ” utilizados y su ubicación en el mapa equino	61
TABLA 6. Razas asnales, número de individuos analizados para la secuenciación de la región del D-loop y el citocromo b.	66
TABLA 7. Número total y rango de los alelos observados, heterocigosidad promedio H_S y H_T , coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}), PIC y PE en las razas asnales españolas.	77
TABLA 8. Tamaño muestral, número de alelos por <i>locus</i> y heterocigosidades media (\pm error estándar) a partir del análisis de 13 <i>loci</i> microsatélites en las razas asnales españolas.	79
TABLA 9. Análisis de los F-estadísticos para cada uno (\dagger) de los 13 microsatélites polimórficos en cinco razas de asnos españoles y (\ddagger) media estimada para estas razas.	87
TABLA 10. Estructura genética de las razas asnales españolas a través del análisis de sus subpoblaciones.	88
TABLA 11. Análisis de los F-estadísticos a nivel jerárquico y componentes de varianza a dos niveles de subdivisión en las razas asnales españolas	89

TABLA 12. Consanguinidad global estimada ($F \cong F_{IT}$) a nivel jerárquico, en las razas asnales españolas.	90
TABLA 13. Estimaciones F_{ST} (debajo de la diagonal), como medida de distancia genética entre las poblaciones de asnos españoles, el número efectivo de migrantes por generación ($N_e m$) (arriba de la diagonal).	92
TABLA 14. Matriz de distancia genética D_A entre las cinco razas de asnos españoles, el asno de Marruecos y la raza equina Merens.	97
TABLA 15. Distancias genéticas de Reynolds (arriba de la diagonal) y estándar de Nei (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas.	101
TABLA 16. Análisis de Weitzman en las razas asnales españolas.	103
TABLA 17. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza a partir de 13 microsatélites, estimados mediante distintas metodologías.	105
TABLA 18. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza, estimado por cada uno de los microsatélites, utilizando el método Bayesiano.	107
TABLA 19. Poblaciones y número de animales secuenciados para el D-loop y el citocromo b, y la frecuencia de haplotipos del citocromo b.	113
TABLA 20. Sitios nucleotídicos polimórficos en el citocromo b (haplotipos) observados en 79 asnos españoles y africanos.	114
TABLA 21. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) estimada a partir del fragmento de 251 pb de mtDNA (citocromo b) para cada una de las razas asnales de origen español y africano.	117
TABLA 22. Matriz de distancia d_A (divergencia nucleotídica del citocromo b) entre seis razas asnales españolas y dos africanas.	118
TABLA 23. Sitios nucleotídicos polimórficos en el D-loop y sus respectivos haplotipos presentes en los 91 asnos españoles y africanos analizados.	119

TABLA 24. Frecuencia de los 7 haplotipos del D-loop mitocondrial en las 6 poblaciones de asnos españoles y las dos razas africanas.	120
TABLA 25. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) estimada a partir del mtDNA D-loop, para cada una de las razas asnales españolas y africanas.	121
TABLA 26. Matriz de distancias d_A (divergencia nucleotídica del D-loop entre poblaciones, arriba de la diagonal) y diferenciación poblacional θ_{ST} (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas y africanas.	124

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Evolución del censo asnal y mular en España.	10
FIGURA 2. Principal distribución de las razas asnales españolas.	13
FIGURA 3. Microsatélites, un ejemplo de un di-nucleótido A-C(n).	22
FIGURA 4. ADN mitocondrial del asno doméstico.	50
FIGURA 5. Localización geográfica de las razas asnales españolas.	57
FIGURA 6. Localización geográfica de las subpoblaciones asnales españolas y su código de referencia.	59
FIGURA 7. Electroferograma de la leyenda de los microsatélites (ABI 310).	62
FIGURA 8. Región D-loop, entre los nucleótidos 15387 y el 15769, secuenciada en las razas asnales.	68
FIGURA 9. Región citocromo b, entre los nucleótidos 14391 y el 14703, secuenciada en las razas asnales.	70
FIGURA 10. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura y Nei.	72
FIGURA 11. Frecuencias alélicas y su distribución en las poblaciones asnales.	81
FIGURA 12. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos, y la raza equina Merens (outgroup), utilizando la distancia D_A y el algoritmo NJ. Los valores indican el porcentaje de replicaciones bootstrap entre los grupos.	98

- FIGURA 13. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y el *E. caballus* usado como outgroup, utilizando la distancia de Reynolds y el algoritmo NJ. Los números en los nodos corresponden a los Porcentajes de 1000 replicaciones bootstrap. 99
- FIGURA 14. Dendrograma de las relaciones establecidas por el método de Weitzman, utilizando la distancia estándar de Nei, entre las cinco razas asnales españolas. 102
- FIGURA 15. Análisis de los componentes principales a partir de las frecuencias de los 13 microsátélites en las cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. El primer PC explica el 52.0% de la variación, el segundo el 15.0% y el tercero el 13.8% de la variación total. 104
- FIGURA 16. Dendrograma NJ construido a partir de la distancia de los alelos compartidos entre 109 individuos de la cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. Los números a la derecha indican la fracción de individuos de la raza. 106
- FIGURA 17. Dendrograma NJ para los 6 haplotipos del citocromo b en seis razas de asnos españoles, dos africanas y la secuencia del caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan a los porcentajes sobre 1000 replicaciones bootstrap. 115
- FIGURA 18. *Minimum spanning tree* mostrando los network de interrelación entre los 6 haplotipos del citocromo b. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo. 116
- FIGURA 19. Dendrograma NJ para los 7 haplotipos del D-loop en seis razas de asnos españolas, dos africanas y la secuencia del caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan el porcentaje 1.000 replicaciones bootstrap. 122

- FIGURA 20. *Minimum spanning tree* mostrando los network de interrelación entre los 7 haplotipos del D-loop. Las líneas entre los haplotipos, entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo. 123
- FIGURA 21. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas , basadas en la divergencia nucleotídica (d_A) entre las poblaciones. 125
- FIGURA 22. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en el número medio de sustituciones nucleotídicas entre poblaciones (d_{xy}). 126

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Secuencias haplotípicas del citocromo b en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al <i>primer</i> CITB-F.	158
Anexo 2. Secuencias haplotípicas del D-loop en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al <i>primer</i> DONK-A.	159
Anexo 3. Distancias F_{ST} entre las subpoblaciones de los asnos Españoles (en negritas distancias dentro de razas).	160
Anexo 4. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. Manuscrito publicado en la Revista <i>Genetics., Selection and Evolution</i> 33 (2001) 433-442.	161
Anexo 5. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. Manuscrito enviado a publicar a la revista <i>Heredity</i> .	172
Anexo 6. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breed. Manuscrito enviado a publicar a la revista <i>Journal of Animal Breeding and Genetics</i> .	194



Raza Catalana

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 EL PROBLEMA GENERAL DE LA CONSERVACIÓN

Durante los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones ha ido tomando un gran auge, debido principalmente a la concienciación del hombre en la necesidad de preservar dichos recursos genéticos. La importancia de la biodiversidad y su conservación quedó patente a partir de la cumbre de la Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, celebrada en Río de Janeiro (1992), estableciéndose entonces la necesidad de estudiar los diferentes componentes de la diversidad biológica.

Los recursos genéticos animales, ya se utilicen en la explotación agropecuaria, la cría convencional o la ingeniería genética, constituyen “*per se*” un patrimonio de inestimable valor. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción y productividad pecuaria y la agricultura sostenible, y reduce la aptitud para hacer frente a posibles nuevas condiciones ambientales (FAO, <http://fao.org/dad-is>).

Según estadísticas de la FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) se estima que el 30% de las razas de ganado corren riesgo de extinción y que cada mes se pierden aproximadamente unas seis razas y lo más grave aún, es que más de la mitad de éstas, se pierden en países desarrollados (FAO, 1995). Las afirmaciones de Mason y Mall, deberían ser razón suficiente para justificar cualquier programa de conservación en la especies y razas en peligro de extinción: “*Cualquier extinción o desaparición de un especie o raza, representa un irremplazable elemento de la diversidad de la vida que se pierde*” (Mason, 1974) y “*Las razas domésticas son recursos genéticos que tienen que ser protegidos como parte de la herencia mundial de la biodiversidad*” (Hall, 1993).

Sin embargo, se pueden dar otros puntos de vista, relacionados con la importancia e interés para la conservación de razas, resumiéndose prácticamente en cuatro aspectos: el primero de ellos es de orden genético-productivo, ya que la diversidad es necesaria para mantener la viabilidad de las poblaciones, la cuál permite la adaptación a diferentes ambientes, algunas veces adversos; el segundo es de aspecto científico, ya que, el estudio de cada raza en particular puede ser de interés para detectar posibles genes únicos y valiosos, en el momento actual o en el futuro, en estas poblaciones, proporcionando por lo tanto un excelente material de investigación; el tercero es de orden histórico-cultural, dado que la conservación de determinadas razas representa un patrimonio genético de un país y como historia viva y paralela al desarrollo de la población humana y el cuarto es de índole ecológico-ambiental, ya que los ecosistemas son el resultado del equilibrio entre clima, flora y fauna, y cualquier factor que afectara a alguno de estos componentes, estaría atentando contra ese equilibrio, deteriorando el medio y la simbiosis ecológica de la zona (Simon, 1984; Anonymous 1992).

Los recursos genéticos animales globales comprenden alrededor de unas 4.500 razas, de unas 40 especies que el hombre utiliza como ganado doméstico para satisfacer sus necesidades de alimentación, vestido, tracción, etc., aunque el verdadero número es desconocido. Dentro de ellas, las 7 principales especies de mamíferos domésticos, presentes en la lista de la FAO (asnos, búfalos, bovinos, cabras, caballos, cerdos y ovejas), representan unas 2.944 razas, de las cuáles, y a pesar de su gran importancia para el sustento del hombre, solo se tienen datos de tamaños de población de 2.126, es decir solo el 72.2%, llamando poderosamente la atención que unas 498 (23.4%) se encuentran en peligro de extinción (Tabla 1) (Barker, 1999).

Respecto a las razas asnales, en España se cuenta con seis razas reconocidas oficialmente en el catálogo de razas autóctonas de animales domésticos (R.D. 1682/1997) siendo éstas: la raza Andaluza, Asno de la Encartaciones, Catalana, Mallorquina, Majorera y Zamorano-Leonesa, estando todas ellas encuadradas en el apartado de Razas de Protección Especial entendiendo que se encuentran en grave regresión o en trance de desaparición (BOE, 1997)

Tabla 1. Número de razas de cada una de las 7 principales especies de animales domésticos que están registradas en la FAO (FAO Global Databank for Animal Genetic Resources), y las estimadas en peligro de extinción.

<i>Especie</i>	<i>Razas Registradas</i>	<i>Razas con datos de tamaño de población</i>	<i>En riesgo*</i>	<i>Porcentaje *</i>
Asnos	77	24	9	37.5
Búfalos	72	55	2	3.6
Bovinos	787	582	135	23.2
Cabras	351	267	44	16.5
Caballos	384	277	120	43.3
Cerdos	353	265	69	26.0
Ovejas	920	656	119	18.1
Total	2 944	2 126	498	23.4

* Estimado a partir de las de razas con datos de tamaño de población.

Fuente: Barker, 1999.

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 (Majjala y col., 1984; Land, 1986), Al perderse las razas se pierden los genes que llevan, y el

problema más grave es el gran desconocimiento que tenemos de muchas de estas poblaciones con tendencia a la extinción; en cuanto a su posible respuesta a la mejora genética, a su productividad en un ambiente determinado, a si son o no portadoras de algunos genes mayores interesantes y valiosos en los momentos actuales o en el futuro, etc.

Con respecto a la situación de las razas autóctonas españolas (Andaluza, Asno de las Encartaciones, Catalana, Mallorquina, Majorera, y Zamorano-Leonesa), la podemos considerar crítica, ya que el censo global de todas ellas no supera ni el millar de ejemplares (Com. Per. Asociaciones de Criadores). En cualquiera de ellas, el número efectivo de hembras reproductoras es inferior a 100 (quizás con la excepción de la raza Zamorano-Leonesa; Com. Per. Asociación Criadores), con lo que las podemos clasificar en la categoría de Razas Críticas, según el baremo realizado por el Comité de Expertos de la FAO (Tabla 2), lo cuál implica que dichas razas se hallan en inminente peligro de extinción.

1.2 ORIGEN DE LOS ASNOS

El verdadero origen del asno doméstico es incierto y está aún por resolver. Aunque parece ser que emergió del tronco común de los équidos, se desconoce en que momento exacto se separó del género *Equus*. Algunos autores sostienen que fue a finales de la era Terciaria - en el Plioceno superior-, hace más de 2 millones de años; sin embargo otros, suponen que el fenómeno se produjo a comienzos de la era Cuaternaria en el Pleistoceno (Ramírez de la Fe y col., 1996; Yanes, 1999).

Actualmente existen varias teorías que podrían ayudar a establecer el origen del asno doméstico, aunque existen contradicciones

entre ellas. Darwin (citado por Salvans y Torrens, 1959) propuso una teoría monofilética a partir de un único tronco común africano, del que luego se derivarían todas las razas asnales actuales. Esta forma única correspondería al llamado “asno de las estepas”, al que Kronacher (citado por Salvans y Torrens, 1959) llamó *Equus asinus taenopius*.

Tabla 2. Categorías de las poblaciones de animales domésticos.

Categoría	Número de Hembras	Comentarios adicionales
Extinguida	-----	No hay posibilidades de restaurar la población.
Crítica	< 100 Hembras y 5 Machos	Próxima a la extinción. Variabilidad genética inferior a la de la población ancestral. Prioritario incrementar el tamaño efectivo de la población.
En Peligro	100-1.000 Hembras y entre 5 y 20 Machos	En peligro de extinción ya que su Ne es demasiado pequeño para evitar la pérdida de variabilidad genética debida a la consanguinidad.
Vulnerable	1.000 a 5.000 Hembras y > 20 Machos	Algunos factores podrían poner en peligro la existencia de la raza, por lo que se deben tomar medidas para evitar la disminución de su censo.
Insegura	5.000 a 10.000 Hembras	El número de individuos podría disminuir por cruzamientos.
Normal	> 10.000 Hembras	La población no esta en peligro y se puede reproducir sin pérdidas genéticas.

Fuente: Anonymous, 1992 (FAO).

Frente a esta teoría de origen único, se encuentran otras de orden difilético. Entre ellas tenemos a la citada por varios autores (Adametz, 1943; Epstein, 1984; Clutton-Brock, 1987 y Camac, 1989), quienes indican que los asnos domésticos actuales, y entre ellos los españoles, y a los cuáles a partir de ahora nos vamos a ceñir, provienen de dos fuentes ancestrales: la primera a partir del Asno de Nubia o *Equus asinus africanus*, nativo de la cuenca del Nilo y que habría dado origen a las razas del Norte de África y entre ellas a la Andaluza (de capa parda y/o torda rodada), y la segunda, a partir del Asno de Somalia o *Equus asinus somaliensis*, el cuál daría origen a los asnos del suroeste de Asia y probablemente a la mayoría de razas asnales Europeas, entre ellas la Catalana, Mallorquina, Asno de las Encartaciones y Zamorano-Leonesa (las cuatro de capa negra).

La segunda teoría, también difilética, es la aportada por Dechambre y Sansón, citados por diferentes autores (Aparicio, 1960; Sotillo y Serrano, 1985; Lorenzo, 1997 y Yanes, 1999). Uno de los troncos correspondería al mismo *Equus asinus africanus* citado anteriormente, y el otro al *Equus asinus europeus*, el cuál sería originario de la cuenca Mediterránea, en concreto de las Islas Baleares, y habría dado origen a la mayoría de las actuales razas europeas, incluyendo a las 4 razas del norte de España de capa negra. Ambos grupos se diferencian esencialmente por las características osteológicas craneales; siendo por lo tanto braquicéfalos el europeo (predominio de la anchura y cráneo corto) y dolicocéfalo el africano (predominio de la longitud craneal) (Adametz, 1943).

Romagosa (1959) apoya la teoría difilética acerca del origen de las actuales razas asnales españolas: *E. a. africanus* y *E. a. europeus*, diferenciándolos por las características referentes a perfiles, dimensiones craneales, color, tamaño y proporciones corporales. Así mismo, afirma que en España, por la afluencia africana directa, o

indirectamente a través de los movimientos poblacionales que han ocurrido, las guerras e intercambios comerciales durante siglos, o bien por simple preferencia de algunos criadores, se ha ocasionado un verdadero trasiego de asnos africanos que se han cruzado con europeos.

A pesar de desconocerse su origen real, estudios realizados partir de ADN mitocondrial, indican que su separación evolutiva del caballo podría haber ocurrido hace unos \cong 9 millones de años (Xu y col., 1996), mucho antes de la reportada por otros autores a partir de estudios paleontológicos, que la situaban entre 3 a 5 millones de años (Lindsay y col., 1980).

Los asnos actuales fueron domesticados hace unos 6.000 años en Egipto o Mesopotamia y mucho antes que el caballo. Los patriarcas de los pueblos hebreos poseían abundantes asnos, siendo este animal, en todos los conceptos, tan bíblico como la oveja (Aparicio, 1960). En España hay que remontarse a la época romana, ya que fue esta civilización la que más aportaciones ha realizado a la cabaña equina española, con una especial atención a la cría de mulos para los largos viajes que estos realizaban. Prueba de ello es que en las postas de las vías romanas existían encargados para los animales que se llamaban *mulomedicus* y el tratado más importante de la veterinaria romana lleva el nombre de *Mulomedicina* (Littauer y Crouwel, 1979).

Mas en la actualidad, el desarrollo de las poblaciones asnales se ha visto principalmente influido por su utilización extensiva como animal de carga y monta, ya que es capaz de acarrear más de 100 kg. Su otra utilidad era para la producción de otro animal doméstico, la «mula», la cuál es el producto del apareamiento entre un asno y una yegua, ampliamente utilizada tanto como animal de carga como para el laboreo de las tierras, especialmente en huertos y viñedos donde su uso era muy indicado. A partir del Real Decreto del 17 de Febrero de 1834,

en el que se declaró la libre hibridación entre asnos y caballos (ya que anteriormente estaba penalizado, con multas económicas y destierros de los propietarios, el uso del asno para fines de producción mular, favoreciéndose la crianza caballar), el censo asnal y mular dio un incremento espectacular. El mulo era el animal más económico para trabajar en el campo, manteniéndose hasta principios de la década de los 60, en dónde comienza a descender a pasos agigantados producto de la mecanización del campo, la presión urbana y el cada vez mayor despoblamiento rural y abandono de la actividad agraria (Aparicio, 1960).

1.3 LAS RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS

De las razas asnales españolas estudiadas aquí (Andaluza, Catalana, Encartaciones, Mallorquina, Majorera y Zamorano-Leonesa), podemos indicar que se encuentran catalogadas como poblaciones en peligro de extinción, ya que atraviesan actualmente una regresión racial que conllevaría a su inevitable desaparición de no tomarse medidas urgentes de conservación.

Su censo se ha visto reducido en aproximadamente un 80 % desde la década de los 60 hasta nuestros días (Figura 1). En la actualidad sólo quedan entre 100 a 200 hembras reproductoras en cada una de estas razas españolas (Comunicaciones personales de las Asociaciones de Criadores de Asnos); catalogándose como razas en peligro de extinción (RD 1682, 1997). Con este número tan reducido de reproductores es imposible prevenir la constante pérdida de variabilidad genética en futuras generaciones (Bodó, 1992).

Las principales características morfológicas de estas razas se pueden resumir en:

Raza ANDALUZA: se caracteriza por una gran alzada que oscila entre 145 a 158 cm. en los machos y de 135 a 150 cm. en las hembras. De conformación robusta y armónica y de caracteres etnológicos que responden a una raza hipermétrica, subconvexilínea y sublongilínea. Su capa característica es la torda blanca rodada formada por pelos finos y cortos, muy suaves al tacto. Su principal área de dispersión geográfica se extienden en sentido ascendente, por los terrenos de las provincias de Jaén y Córdoba y en sentido descendente abarca la provincia de Sevilla y en menor extensión la provincia de Cádiz, hasta llegar a la campiña de Jerez (Navero, 1987).

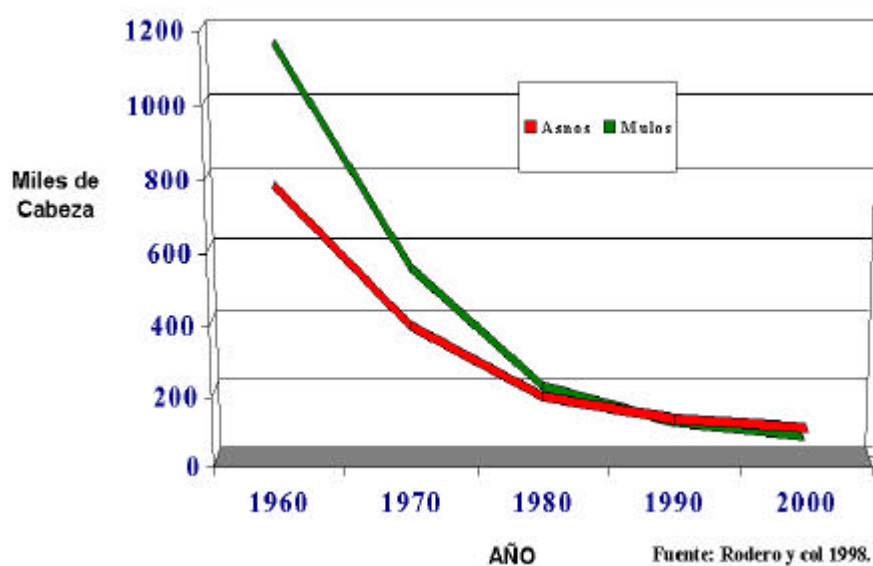


Fig. 1. Evolución del censo asnal y mular en España.

Raza CATALANA: Se caracteriza por una alzada que oscila entre 145 a 160 cm. en los machos y 135 a 150 cm. en las hembras. De conformación armónicamente compensada en todas sus regiones dentro de su silueta esbelta y estirada y de caracteres que responden a una raza hipermétrica, concavilínea y longilínea. Su capa es siempre oscura, negra peceña o mal teñida, en cuyo caso se la denomina en el país

«color de pasa». El pelo corto y brillante con degradaciones blanco-grisáceas poco puras, rodeando ollares, espacio intermaxilar, pecho, vientre, bragada, axilas y espacio orbicular. Su distribución geográfica comprende diferentes comarcas pre-pirenaicas y pirenaicas de Catalunya, en especial las comarcas del Berguedà, Osona, Ripollès, Garrotxa y Pla de L'Estany (Folch, 1998).

Raza MALLORQUINA: Presenta un buen tipo de alzada, que oscila entre 145 a 155 cm. en los machos y 125 a 135 cm. en las hembras. Buena conformación general, rusticidad, sobriedad y fertilidad. Se encuadra como una raza subhipermétrica, concavilínea y sublongilínea. La capa es negra/pasa, con degradaciones blanco-grisáceas poco puras, rodeando ollares, espacio intermaxilar, pecho, vientre, bragada, axilas y espacio orbicular. Su principal área de desarrollo ha sido precisamente la correspondiente a la isla de Mallorca, pero extendiéndose prácticamente a todas las demás islas del archipiélago balear en un menor o mayor grado (Payeras y Falconer, 1998).

Raza MAJORERA: Se trata de un asno de talla baja, alrededor de unos 110 cm. Se encuadra como una raza elipométrica, subcóncava y de proporciones corporales brevilineas. La capa es generalmente grisácea, variando la tonalidad de oscuro a claro. Es característica la presencia de la “raya de mulo” y las “bandas cruciales”. La “raya de mulo” es una aglomeración de pelos oscuros, muy visibles, situados en la línea dorso-lumbar y que se continúa hasta la crin; mientras que, la banda crucial es una banda de igual tonalidad a la anterior que lateralmente se extiende desde la región de la cruz hasta el tercio superior de la región escapular. La principal área de distribución de esta raza se encuentra en la isla de Fuenteventura y más especialmente en la península de Jandía, desde el barranco de los Canarios hasta la caleta de la Madera, aunque se la puede encontrar en todo el archipiélago Canario (Cabrera, datos sin publicar; Delgado y *col.*, 1998).

Raza de las ENCARTACIONES: Se trata de un asno de baja alzada, cuya media es de unos 120 cm. El color de su capa es negra y/o castaña oscura, pudiendo presentar listón oscuro en escápula y columna vertebral. Posee orejas menudas y cascos pequeños. Responde a una raza elipométrica, rectilínea y mediolínea. Se localiza en la comarca de las Encartaciones, en Vizcaya, y zonas próximas colindantes, cómo el Noroeste Alavés (Gómez, 1997).

Raza ZAMORANO-LEONESA: Se trata de un asno bien conformado, con manifiesta acromegalia, de gran corpulencia y pelo largo, basto, hirsuto y abundante, ostentando por regla general una alzada media de unos 147 cm. Responde a una raza eumétrica, concavilínea y sublongilínea. Su capa característica es la negra, y con más preferencia la negra mal teñida. En sus orígenes la raza tuvo un área de expansión que abarcaba toda la región Castellano-Leonesa, aunque su cuna fueron las provincias de Zamora y León. En la actualidad se encuentra principalmente localizada en la provincia de Zamora, habiendo casi desaparecido de la de León (Lorenzo, 1997; Yanes, 1999).

Más información sobre las principales características de estas razas se puede obtener en la dirección electrónica de la FAO (<http://www.fao.org/dad-is>) y en la web de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales (SERGA: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/genetica/serga>). La principal localización de estas razas se muestra en la Figura 2.

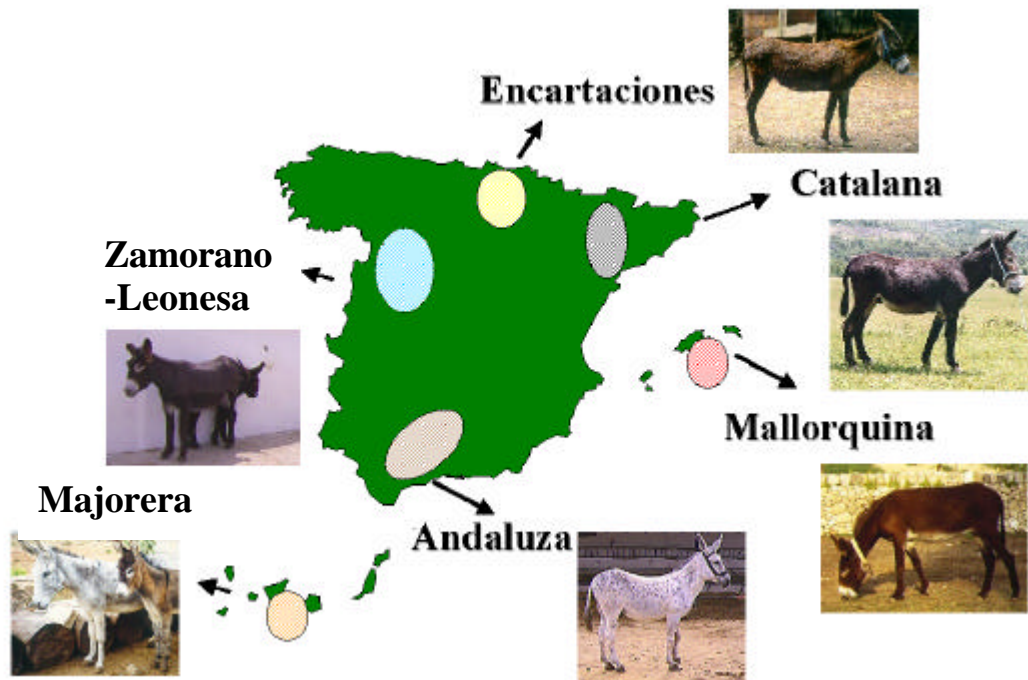


Figura 2. Principal distribución de las razas asnales españolas.

Uno de los principales problemas que afectan a estas poblaciones minoritarias son los inevitables apareamientos entre individuos emparentados, que se traduce genéticamente en un incremento de la consanguinidad (homocigosis) con la consiguiente depresión consanguínea; una reducción de los valores medios fenotípicos de los caracteres productivos y reproductivos, y por último, y como consecuencia de esos problemas reproductivos, la inevitable disminución y/o extinción de la población.

Consecuentemente, una de las primeras etapas para llevar a cabo un programa de conservación, consistiría en la evaluación de su variabilidad genética y la distribución de ésta entre sus poblaciones, así como la posible detección de alelos raros que nos indicaran la presencia de variantes genéticas únicas (González-Candelas y Montolío, 2000).

Con el objeto de establecer un programa de mantenimiento y conservación de los recursos genéticos animales, la FAO propuso un protocolo a seguir consistente en 5 fases o etapas bien diferenciadas y ordenadas según una realización cronológica de acciones, pero íntimamente relacionadas para el buen desarrollo y consecución de los objetivos globales propuestos:

1.4 PROTOCOLO DE LA FAO PARA LA CONSERVACIÓN DE POBLACIONES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

I.- Fase:

Descripción general de la población: esta fase comprende:

- 1.a. Recopilación de datos preliminares y de interés general.
 - i. Localización geográfica de las poblaciones
 - ii. Origen filogenético
 - iii. Evolución censal y situación actual
 - iv. Posibles causas de regresión racial y tendencia futura
 - v. Perspectivas futuras de la raza y razones válidas para la conservación (estudios socioeconómicos que resalten la importancia de esta (s) raza (s) en la zona
 - vi. Características raciales, productivas, reproductivas, ecológicas, etc., de interés
- 2.a. Inventario censal, registro e identificación individual electrónica

II. Fase:

Caracterización racial

1.b. Caracterización morfológica: cualitativa y biométrica. Con ello se pretende crear, reglamentar y gestionar el libro genealógico de la raza

2.b. Caracterización hematológica y bioquímica clínica

3.b. Caracterización genética (ya sea con polimorfismos bioquímicos o marcadores moleculares del tipo de los microsátélites). Esta caracterización permite además:

- ✓ analizar los niveles de variabilidad genética de las poblaciones,
- ✓ obtener valores medios de consanguinidad,
- ✓ identificar genéticamente a los individuos y realizar pruebas de control de paternidades,
- ✓ identificar los individuos más heterocigotos para la programación de apareamientos.

4.b. Caracterización de la estructura genealógica y demográfica (mediante los análisis de pedigrí cuando estén disponibles), y ello permitiría estudiar:

- ✓ parámetros tales como edad al primer parto, vida útil, varianza familiar o intervalos entre generaciones, entre otros,
- ✓ cálculo de los coeficientes de consanguinidad (F) y parentesco (r), para así poder programar los mejores apareamientos,

- ✓ evolución de la consanguinidad por generación y/o anual,
- ✓ probabilidad de origen de los genes, para calcular el Índice de Conservación Genética (GCI), siendo éste de gran utilidad para conocer el efecto de los ancestros fundadores para el mantenimiento de la variabilidad.

III. Fase:

Programa de conservación genética “*in situ*”

En esta fase lo prioritario es la conservación y el mantenimiento de animales vivos, con la máxima cantidad de diversidad genética y con el mínimo incremento de consanguinidad posible por generación. Para ello los criterios son tres: en primer lugar incrementar la población y en especial maximizar el número efectivo de reproductores (N_e); en segundo lugar maximizar la influencia de los animales fundadores, que el máximo número de fundadores (todos idealmente) contribuyan con descendientes a la siguiente generación; y por último, minimizar las pérdidas de heterocigosidad debida a distintos factores (consanguinidad, selección, deriva, etc.), llevando a cabo para ello un programa de consanguinidad mínima.

IV. Fase:

Programa de conservación genética “*ex situ*”

Esta fase se llevaría a cabo cuando los medios técnicos y los recursos económicos y de infraestructura lo permitieran; realizándose a partir de:

- ✓ almacenamiento criogénico de semen y embriones
- ✓ almacenamiento de ADN.

V. Fase

Programa de mejora genética

Esta se llevaría a cabo una vez que la población estuviera fuera de peligro y cuando el posible incremento de consanguinidad no representara un problema importante. El objetivo sería intentar mejorar genéticamente algún carácter de interés económico de la población. Los criterios de selección estarían sujetos a las decisiones de su debido momento y las evaluaciones se realizarían a partir de toda la información disponible (índice de selección, BLUP, selección asistida por marcadores (MAS), etc.).

En este sentido, actualmente se está llevando a cabo un proyecto (CICYT AGF98-0503), en el cuál se pretende sentar las bases, pautas y recomendaciones para establecer los correspondientes programas de conservación de animales vivos (*in situ*) en las diferentes razas asnales españolas, lo que vendría a corresponder a las fases I, II y III del protocolo de la FAO.

Ya específicamente, con esta tesis, se pretende dar respuesta al apartado número dos (II) del protocolo de la FAO, puesto que aquí se plasman los estudios de la caracterización genética a través del uso de marcadores moleculares del tipo microsatélite para estas cinco razas españolas; así mismo, se están llevando a cabo otros trabajos por otros doctorandos referidos a los estudios de caracterización morfológica, hematológica y bioquímica clínica; así como a la caracterización citogenética de dichas razas españolas.

El presente estudio pretende, a nivel general, caracterizar genéticamente dichas razas como ya se ha comentado anteriormente; pero además, el estudio permitirá realizar evaluaciones de la estructura

poblacional y de las relaciones filogenéticas entre las mismas. A nivel individual será de gran utilidad para la identificación animal y para realizar pruebas y control de paternidades. Además, en estas poblaciones, y debido a que no se dispone de información genealógica fiable, la información generada a partir de las combinaciones haplotípicas de los diferentes marcadores podrán ser de gran utilidad para identificar los individuos más heterocigotos de la población, y así poder programar los apareamientos para intentar mantener al máximo la variabilidad genética de la misma.

En la actualidad existe muy poca literatura que reporte la utilización de microsatélites en asnos domésticos. Únicamente se citan los trabajos realizados por Breen *y col.* (1994), estudiando la amplificación de un grupo de microsatélites en varias especies del género *Equus*, para la cuál sólo utilizó 8 asnos y probó la amplificación exitosa de microsatélites de caballos en esta especie; un resumen presentado por Bellone *y col.* (1998), estudiando la variabilidad genética en los asnos de la raza de Poitou (Francia) a partir del uso de 9 microsatélites y los trabajos de la Universidad Autónoma de Barcelona estudiando el asno Catalán (Jordana *y col.*, 1999; 2001).

1.5 VARIACIÓN GENÉTICA Y MÉTODOS DE DETECCIÓN

La variación genética (polimorfismo) derivada de cambios espontáneos (mutaciones) del ADN puede medirse hoy día a través de diferentes técnicas disponibles. Desde la sustitución de un simple nucleótido, que representa el tipo más común de mutación y que puede ser detectado a través del estudio y análisis de los SNP's (*single nucleotide polymorphisms*), hasta mutaciones que involucren mayor número de sitios nucleotídicos (VNTR, STR), pueden ser también analizados.

Para ello, fue de gran importancia el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis y col. (1986), la cuál no es más que una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa, que permite la amplificación o reproducción "*in vitro*" de grandes cantidades de una región particular del ADN, a partir de una pequeña cantidad original de ADN molde. La ADN polimerasa requiere, para la síntesis, de un par de oligos denominados cebadores o "*primers*", cuyas secuencias son complementarias a la de las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento o región particular del ADN que se aspira amplificar.

A partir de entonces se fueron desarrollando una serie de técnicas, descritas en la literatura y utilizadas para los estudios de variabilidad genética en las especies animales. Entre estas técnicas se cita el uso de los marcadores genéticos (Tabla 3), que mayoritariamente se basan en la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (*fingerprint markers*) (Dodgson y col., 1997).

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad (Cheng y Crittenden 1994). Entre ellas debe

tener una buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, y debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios. A continuación se detallan algunas características notables de los marcadores moleculares más utilizados:

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)

Es una de las primeras técnicas descritas (Botstein y *col.*, 1980) desde la aparición de la PCR, y consiste en visualizar las diferencias al nivel de la estructura del ADN, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios donde se encuentran una secuencia específica de nucleótidos. La identificación de los fragmentos (RFLPs) requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos que difieren en tamaño. La limitación de esta técnica es que únicamente identifica dos alelos por *locus*, por lo que la variabilidad obtenida es reducida. Otra limitación es que la aproximación con RFLPs, para la búsqueda de polimorfismo en productos de PCR no es metodológicamente efectiva al cien por cien, ya que muchos potenciales SNPs podrían no cambiar un sitio de restricción, y por tanto no serían detectados por ella (Vance y Othmane, 1998).

RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*)

Representan a marcadores que se basan en el uso de oligonucleótidos (*primers*) cortos, los cuáles a través de una reacción PCR (que se caracteriza por temperaturas de “annealing” bajas), generan una serie de fragmentos de amplio espectro a partir del ADN molde. La habilidad consiste entonces en encontrar aquellos fragmentos amplificados y que resulten ser polimórficos, los cuáles pueden posteriormente ser mapeados. Una de las principales limitaciones del uso de los RAPDs es la baja repetibilidad de los análisis, aunado a la

necesidad de usar un gran panel de RAPDs, lo que representa un elevado valor económico y un laborioso trabajo analítico. Asimismo, y dado que es un marcador genético de tipo dominante, con lo que no podemos discriminar la existencia de heterocigotos, subestimamos la cantidad de polimorfismo existente (Levin y *col.*, 1994)

Tabla 3. Principales tipos de marcadores de ADN

Tipo de Marcador	Acrónimo	Alias	Requiere:	Principal uso
Restriction fragment length polymorphism	RFLP		ADN clonado usualmente	Mapas de Ligamiento
Simple sequence repeats	SSR	Microsatélites	ADN clonado y secuencias	Mapas de Ligamiento
Sequence-tagged sites	STS		Secuencias de ADN	Mapas físicos
Expressed sequence tags	EST	Subset de STS	Secuencias de ADNc	Mapeos físicos y de ligamiento
Random amplified polymorphic DNA	RAPD	DAF, AP-PCR	Oligos aleatorios	Fingerprinting
Variable number of tandem repeats	VNTR	Minisatelites	Secuencias repetitivas y pruebas de hibridación	Fingerprinting
Amplified fragment length polymorphism	AFLP		Set de oligos diseñados y específicos	Mapas de ligamiento

Modificado de Dodgson y *col.*, 1997.

Minisatélites o VNTR (*Variable number of tandem repeats*)

Marcadores polimórficos descubiertos por Jeffrey y *col.* (1985), en el que ciertas pruebas de hibridación para secuencias repetitivas generaban un complejo patrón de bandas que contenían un polimorfismo heredable. Los VNTR son repeticiones al azar en tándem de 10 a 60 pb, altamente polimórficos y con elevadas tasas de heterocigosis en las poblaciones (Vance y Othmane, 1998).

Microsatélites o STRs (*short tandem repeats*)

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (Figura 3). Algunas de las características de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLPs, RAPDs, etc.) que los hacen ser considerados por la mayoría de autores como una poderosa herramienta para estudios genéticos son: presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar y son cien por cien fiables, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein y Schlötterer, 1999).



Figura 3. Microsatélites, ejemplo de un di-nucleótido A-C(n).

Dado que los microsátélites están más o menos distribuidos a lo largo de todo el genoma de los eucariotas, aunque con baja frecuencia en las regiones codificantes y, quizás también en los telómeros, su presencia en estas regiones se ha descrito asociada a enfermedades (Armour *y col.*, 1994; Tautz y Schötterer 1994; Hancock 1999). Sin embargo, aún se desconoce el significado funcional de estas secuencias, a pesar de que la hipótesis más aceptada apunta a que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas (Vanhala *y col.*, 1998).

Debido a sus particulares ventajas, su uso ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. Desde su descubrimiento en 1989, reportado por tres grupos de investigadores simultáneamente (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989 y Weber y May, 1989), muchísimos trabajos han sido publicados en la literatura internacional. El análisis con microsátélites involucra la detección de muchos fragmentos específicos de ADN y nos da la medida de los alelos (en pares de bases, pb) en cada una de las regiones.

1.6 MARCADORES MICROSATÉLITES

1.6.1 APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES

Identificación individual y pruebas de paternidad

El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos, consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores. De principio “mendeliano”, uno de los dos alelos que presente un individuo provendría del padre y el otro de la madre. Para dicho análisis, así como para la identificación individual, la identificación del (os) testigo (s), tanto a nivel fenotípico

como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo.

El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de poder detectar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos. Para seleccionar los marcadores a utilizar, estos deberían reunir las características descritas anteriormente y presentar además: alta variabilidad, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductividad y precisión, la no presencia de alelos “nulos”, contar con un procedimiento que resulte ser fácil, rápido y económico, y potencialmente automatizable, que la información del genotipo pueda ser transferida rápidamente, que la fuente de ADN no esté limitada únicamente a muestras sanguíneas frescas ni a grandes cantidades de ADN y que, por último, presente una segregación independiente con otros marcadores al ser combinados en la prueba.

Durante las últimas décadas las pruebas de paternidad en équidos (específicamente en caballos) se han venido realizando principalmente a través de la tipificación sanguínea, incluyendo tanto pruebas serológicas como grupos sanguíneos (hemotipados); así como, análisis electroforéticos del polimorfismo de las proteínas y enzimas sanguíneas (alozimas). Siete sistemas de grupos sanguíneos y 16 polimorfismos bioquímicos han sido reconocidos internacionalmente y utilizados rutinariamente a nivel mundial, como herramientas oficiales para el test de paternidad (ISAG, International Society Animal Genetics). La combinación de todos estos sistemas da un 97% de probabilidad de detectar o asignar un padre o una madre incorrecta y cerca del 100% de probabilidad de un cruzamiento con individuos de otras razas (Bowling y Clark, 1985; Bowling y col. 2001). Sin embargo, ahora, con el uso de

un conjunto aproximado de 10-12 marcadores microsatélites, se obtiene una efectividad teórica para detectar parentescos incorrectos (PE) del orden del 99.99% (Bowling y col., 1997).

Mapas genéticos y genómica comparativa

Otra aplicación, completamente diferente a la anterior, que tienen los microsatélites es la construcción de más completos y detallados mapas de ligamiento; así como la identificación de genes de interés.

Todos los marcadores pueden ser utilizados para mapas de ligamiento, sin embargo para ello se requiere, en primer lugar, que los alelos se segreguen independientemente y que además estos puedan ser monitoreados a través del pedigrí. La descendencia puede ser informativa si los progenitores son doble heterocigotos en los *loci* analizados. Los *loci* situados en cromosomas distintos podrían recombinarse libremente durante la gametogénesis parental hasta un 50% (segregación independiente); mientras que, si se encuentran en el mismo cromosoma recombinarían con una frecuencia que oscila entre 0 a 50% dependiendo de la distancia en centi-morgans (cM) presente entre ellos.

Así un mapa genético bien surtido de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones que presentan el carácter de interés, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (Cheng y col., 1995).

Actualmente existen muchos proyectos internacionales para elaborar estos mapas en las principales especies domésticas (Roslin Institute, <http://www.ri.bbsrc.ac.uk>), en los que encontramos descritos abundantes marcadores microsatélites.

Estudios de genética poblacional

Esta representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción.

Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un buen número de *loci* analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una muy buena aproximación de la filogenia (Loftus *y col.*, 1994; Ishida, *y col.*, 1995; Takezaki y Nei, 1996; Peelman *y col.*, 1998; Saitbekova, *y col.*, 1999; Kantanen, *y col.*, 2000; Farid, *y col.*, 2000.).

En los estudios de genética de poblaciones, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por *locus*, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. A partir de éstas podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Bowcock *y col.*, 1994; Ponsuksili *y col.*, 1999); así como realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población. La diversidad o variabilidad genética se puede definir como “la capacidad genética para variar”, y por ende, la capacidad a responder tanto a

variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau y *col.*, 2000).

A pesar de las grandes ventajas que poseen los microsatélites como marcadores, existen también otros factores a considerar que pueden disminuir el poder y/o la sensibilidad de éstos como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Estos factores son: el patrón de mutación, los alelos nulos y la homoplasia.

1.6.2 MUTACIÓN, ALELOS NULOS Y HOMOPLASIA

Mutación

Las mutaciones son alteraciones del material genético y en ellas se incluyen desde simples sustituciones de un solo nucleótido hasta las deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. La mayoría de las mutaciones en animales no conllevan a cambios en el fenotipo, ya que, ocurren en regiones no-codificantes (mutaciones silentes). De forma general, las regiones o secuencias codificantes muestran una baja tasa de mutación, que se ve reflejada en la escasa variabilidad existente dentro de especies y el alto grado de conservación que presentan estas regiones entre especies (Eisen, 1999).

El elevado grado de conservación de estas regiones se pueden explicar muchas veces por el hecho de que las mutaciones dentro de esta región son deletéreas, ya que causan la pérdida de una función importante, y por tanto son eliminadas por selección purificadora.

Entender el proceso mutacional de los microsatélites es esencial antes de inferir las relaciones existentes entre la variación observada y las distancias genéticas o la estructura de una población. Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, tales como proteínas o enzimas, presentan un patrón diferente de mutación, ya que en primer lugar, la mayoría de las mutaciones están involucradas por la ganancia o pérdida de una simple unidad de repetición (Weber y Wong, 1993), además de la propia presencia de homoplasia, la cuál a su vez causa una subestimación de la cantidad total de variación entre poblaciones y por ende de las distancias genéticas y por lo tanto una sobreestimación de las similitudes entre las poblaciones.

La tasa de mutación en los microsatélites ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por gameto (Bowcock y col., 1994; Forbes y col., 1995); sin embargo, el mecanismo de cómo los microsatélites mutan es aún desconocido. Dos mecanismos son los que principalmente han sido propuestos: en primer lugar se cita un desigual cruce en la meiosis y en segundo lugar un desliz de la hebra del ADN en la replicación, siendo al parecer esta última, la principal causa de mutación de los microsatélites (Goldstein y Schlötterer, 1999).

In vitro, algunos factores intrínsecos, tales como la longitud de la repetición y la composición (tipo de base nitrogenada) han demostrado que pueden afectar la tasa de mutación de los microsatélites. Es así que los dinucleótidos presentan tasas de mutación más elevadas que los trinucleótidos, y las secuencias con alto grado de AT (adenina-timina) en su composición mutan a mayores tasas que las que presentan altas combinaciones de GC (guanina-citosina) (Schlötterer y Tautz, 1992).

Los dos principales modelos que se han utilizado para modelar el proceso mutacional de los microsatélites son: el Infinite Allele Model (IAM) y el Stepwise Mutation Model (SMM). En el IAM se asume que la

mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original, por lo que en este caso la homoplasia no existe o es despreciable. En el SMM los alelos sólo pueden mutar por la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición; debido a esto, queda claro que puede existir una gran cantidad de homoplasia. Ambos modelos son por lo tanto extremos. Otro modelo intermedio que se cita en la literatura, aunque con menor frecuencia es el de dos fases (Two Phases Model TPM) y es igual al SMM, pero permite que se puedan dar mutaciones de mayor magnitud (Teoría de la Coalescencia) y predice la varianza esperada en número de repeticiones de un microsatélite, bajo distintos procesos mutacionales e historias demográficas. En este modelo se pueden dar “mutaciones viejas” (alelos ya existentes en la población), pero también “mutaciones nuevas” (alelos nuevos en la población), con lo cuál la cantidad de homoplasia existente siempre será menor que en el modelo SMM. Por tanto TPM en la práctica sería mas parecido al IAM (Di Rienzo *y col.*, 1994; Murray, 1996).

Al principio se esperó que los microsatélites siguieran el SMM, pero los análisis experimentales demostraron que no se trata de un modelo simple (Goldstein y Schlötterer, 1999). Parece ser que, dependiendo del tamaño de la unidad de repetición, un microsatélite se adapta más a un modelo o al otro. Los microsatélites de repeticiones de 3-5 pb parece que sí siguen el SMM (Tautz y Schlötterer 1994), mientras que los de 1-2 pb siguen el IAM o el TPM (Vanhala *y col.*, 1998), al igual que los minisatélites (repeticiones de 15-70 pb) (Estoup *y col.*, 1995).

Alelos nulos

Se habla de alelos nulos cuando no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente, a una mutación en el punto de hibridación del cebador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo (Dawson y *col.*, 1997). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable. Su determinación sería posible si se presentará en homocigosis, ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese *locus*.

En los casos de verificación de paternidades, podemos sospechar la presencia de alelos nulos en un marcador, cuando todos los demás marcadores apuntan a un progenitor y sin embargo, es homocigoto para ese marcador excluyente, siendo el descendiente homocigoto para ese marcador para uno de los alelos parentales. Un alelo nulo podría llevarnos a interpretaciones erróneas, y excluir a estos animales como posibles progenitores en un análisis de paternidad, además de sesgar las estimaciones de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Otra manera para intentar detectar la presencia de alelos nulos, sería a partir del cálculo del déficit de heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg.

Para solucionar el problema de los alelos nulos se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de mutación y volver a analizar los individuos clasificados como homocigotos. Asimismo, se puede evitar no utilizando marcadores que han sido reportados como portadores de alelos nulos en ciertas poblaciones o razas, ya que pueden darnos problemas de esta índole (Neumann y Wetton, 1996; Mundy y Woodruff, 1996; Dawson y *col.*, 1997).

Homoplasia

Originalmente, el término «homoplasia» fue utilizado por los evolucionistas para referirse al hecho de que un mismo carácter, presente en dos especies, no siempre ha derivado del mismo carácter ancestral. A nivel genético, se dice que dos alelos son homoplásicos cuando poseen un estado idéntico, aunque no sea por descendencia (Estoup y Cornuet, 1999).

Es así, que la homoplasia por lo tanto se refiere al hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño (pb) pero no debido a que sean idénticos, sino a que los tomamos como idénticos por tener el mismo tamaño, pero intrínsecamente existen claras diferencias en cuanto a su estructura, presencia de inserciones por una parte y/o deleciones por otra, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Primmer y Ellegren 1998).

Éste es un tipo de polimorfismo que puede detectarse únicamente por secuenciación, y nos puede pasar inadvertido en caso de analizar individuos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. La homoplasia en los tests de paternidad y parentesco nos puede hacer atribuir una relación cuando no la hay o viceversa. También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz y Schlötterer, 1994).

En modelos mutacionales del tipo IAM, se asume la no presencia de homoplasia, ya que una nueva mutación produce la creación de un nuevo alelo, en este caso totalmente distinto al que existía previamente en la población. Sin embargo, todos los otros modelos de mutación

(SMM, TMP, etc.) pueden llegar a generar homoplasia y la cantidad dependerá de la tasa de mutación presente en la población, tal como ya se ha comentado en un apartado anterior.

En los marcadores del tipo microsatélite, se espera, en teoría, una cierta cantidad de homoplasia ya que: a) existe evidencia que, directa o indirectamente, los microsatélites presentan un tipo de mutación del tipo SMM o TPM; b) los *loci* microsatélites se caracterizan por presentar una elevada tasa de mutación, que puede oscilar entre 10^{-2} y 10^{-5} mutaciones por *locus* y generación (Renwick y col., 2001); y c) el rango limitado de tamaños de alelos presentes en los microsatélites reduce los posibles estados alélicos, y por tanto se favorece la cantidad de homoplasia (Nauta y Weissing, 1996; Estoup y Cornuet, 1999).

1.7 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Existe una gran diversidad de estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Los estadísticos más empleados son: porcentaje de *loci* polimórficos, el número medio de alelos por *locus*, la heterocigosidad (esperada y observada), el índice de contenido de polimórfico (PIC), etc.

Porcentaje de *loci* polimórficos:

Un *locus* se considera polimórfico en una población, si podemos detectar más de un alelo. Generalmente el criterio más utilizado es el del 5%, es decir, un *locus* será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 95% en la población bajo estudio.

Número medio de alelos por locus:

Este estadístico indica el número medio de alelos que presenta un *locus* en una población. Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios. No obstante este estadístico es útil para estudiar la existencia de variabilidad críptica en los *loci*.

Heterocigosidad (H):

Representa una mejor medida de la variación genética, ya que no es arbitraria y es precisa. La heterocigosidad la podemos estudiar como heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E).

La H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci* y se calcula por cómputo directo.

Mientras que la H_E , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). En una población en equilibrio H-W, la frecuencia de los heterocigotos viene dada por la ecuación 2 pq.

El cálculo de la H_E en la población puede realizarse a través de:

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

siendo p_i^2 =(homocigosidad) o también su equivalente:

$$H_E = \sum p_i (1 - p_i)$$

También conocida como diversidad génica de Nei (Nei, 1977).

Según Zapata (1987) la heterocigosidad esperada (H_E) es un buen estimador de la variabilidad, dado que se aplica a cualquier especie, independientemente de su estructura reproductiva o genética, pudiéndose por tanto realizar comparaciones entre ellas.

Antes de realizar los análisis de estructura poblacional es esencial testar la variación genética encontrada mediante los microsatélites, con el objeto de que no se haya violado alguna de las asunciones básicas en un análisis de población. Las asunciones son tres y están referidas a: 1) selectiva neutralidad de cada *locus*, 2) la no-existencia de alelos nulos (alelos que no son detectados por PCR) y 3) independencia de los *loci* (Murray, 1996).

El efecto de la selección puede confundir los resultados, y cualquier *loci*, que esté presumiblemente ligado a un carácter de interés selectivo debe ser descartado del análisis. Aunque la mayoría de los *loci* microsatélites se comportan de forma neutral (Murray, 1996).

Índice de contenido de polimórfico (PIC):

El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se ha de multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sean informativos, es decir, que se pueda identificar de que progenitor procede el alelo (Botstein y *col.*, 1980).

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Donde $p_1 \dots p_n$ son las frecuencias de los n alelos.

Probabilidad de exclusión (PE):

Expresa la probabilidad de que la asignación errónea de un progenitor (padre o madre) sea detectada por el análisis (Jamieson, 1994).

$$PE = \sum_{i > j} \left[p_i - 2 p_i^2 + p_i^3 + 2 p_i^4 - 3 p_i^5 - 2 (p_i^2)^2 + 3 p_i^2 p_j^3 \right]$$

$$PE = \sum_{i > j} \left[p_i (1-p_i)^2 - (p_i p_j)^2 \times [4 - 3 (p_i + p_j)] \right];$$

donde $i > j$ y $p_1 \dots p_n$ son las frecuencias de los alelos.

$PE_{tot} = 1 - [(1-PE_1) (1-PE_2) \dots (1-PE_n)]$; a la probabilidad global de un conjunto de marcadores.

Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W):

La ley de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908) asume que en una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación o migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación y, además hay una relación simple entre ambas. Así una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio H-W.

Cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio H-W, y se puede medir mediante el índice de fijación F (Wright, 1965), el cuál se expresa para un *locus* cualquiera como:

$$F = (H_E - H_O) / (H_E);$$

Siendo H_E y H_O las heterocigosidades esperada y observada para ese *locus*, respectivamente. Cuando el índice de fijación F es igual a 0 (cero) se indica que la población está en equilibrio; mientras que si F es diferente de 0, ya sea en forma positiva o negativa, indicaría que existe un déficit o exceso de heterocigotos, respectivamente.

1.8 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

Para los estudios de la estructura de la población los análisis de los *F-estadísticos* han mostrado ser una herramienta útil para dilucidar los patrones y extraer la variación genética residente entre y dentro de las poblaciones. Según estos estadísticos, la variabilidad de una población global puede ser subdivida en muchas subpoblaciones.

Wright (1965) definió tres *F-estadísticos*: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , como correlaciones entre unidades gaméticas en la población a diferentes niveles. Los estadísticos F_{IS} y F_{IT} explican las correlaciones entre dos unidades gaméticas tomadas al azar de una subpoblación y del total de la población como un todo; y nos da el exceso o déficit de heterocigotos presentes; mientras que el F_{ST} es la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada una de las subpoblaciones y mide el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Estos parámetros se relacionan a través de la siguiente expresión:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IS}) \cdot (1-F_{ST}) \quad (1)$$

Pudiéndose inclusive extender el análisis a niveles jerárquicos adicionales dentro de la población. En nuestro caso se llevó a cabo un análisis de variabilidad genética intraracial, subdividiendo las razas en subpoblaciones, obteniendo hasta dos niveles jerárquicos, por lo que la ecuación (1) extendida sería:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IS}) \cdot (1-F_{SC}) \cdot (1-F_{CT})$$

donde F_{SC} y F_{CT} miden el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones dentro de razas y dentro de las subpoblaciones, respectivamente.

La desviación del equilibrio H-W puede ser debida a una variedad de causas. Si los resultados arrojan un exceso de heterocigotos, podría en este caso ser atribuida a la presencia de una selección sobredominante o la ocurrencia de migraciones en la población estudiada; si por el contrario los hallazgos son de déficit de heterocigotos, podría deberse a cuatro factores principalmente; en primer lugar que el *locus* esté bajo selección; en segundo lugar a la presencia de alelos nulos en esa población, dando una falsa lectura de un exceso de homocigotos; en tercer lugar a altos niveles de consanguinidad en la población, producto de apareamiento entre individuos emparentados y en cuarto lugar se podría deber a la presencia de una cierta subestructuración reproductiva de la población (efecto «Wahlund») (Nei, 1987).

Nei (1977), reformuló los índices F, basándose en los valores de heterocigosidad observada y esperada. En este modelo, el cuál es independiente del número de alelos presentes en cada *locus*, la diferenciación o estructura de la población se mide por un parámetro

denominado G_{ST} (Nei, 1973; 1977), análogo al F_{ST} y que cumple la siguiente relación:

$$(1-G_{IT}) = (1-G_{IS}) (1-G_{ST});$$

donde

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / (H_T)$$

donde H_S es equivalente a la anterior H_E , mientras que H_T se define como la heterocigosidad media esperada por *locus* en la población total:

$$H_T = (\sum_k h_T) / k;$$

siendo k el número de *loci* y h_T la heterocigosidad esperada en la población total para un determinado *locus*. Una vez introducida la definición de diversidad genética de Nei (G_{ST}), H_S viene a representar la diversidad genética dentro de la subpoblación y H_T la diversidad genética en la población total.

1.9 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Para estudiar las diferencias entre poblaciones se han de comparar las frecuencias alélicas observadas de cada *locus* mediante un test adecuado, y calcular las distancias genéticas entre ellas. En este sentido, la distancia genética mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies, pudiéndose cuantificar esa diferencia mediante diferentes índices de distancias.

Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y nos permite obtener información para caracterización de razas (Nagamine y Higuchi, 2001).

De las distancias genéticas es importante estudiar, el tipo de distancia (al menos las más utilizadas frecuentemente), el método de construcción del dendrograma o algoritmos, y el análisis de remuestreos.

Distancias genéticas:

Las distancias genéticas son estimadoras del tiempo de separación entre poblaciones, y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes tanto dentro como entre poblaciones. Algunas de las distancias genéticas están enfocadas en los cambios de las frecuencias génicas (p.e. F_{ST}); mientras que otras incorporan además el proceso mutacional, y en el caso específico de los microsatélites éstas se denominan distancias por paso o etapas (stepwise). Las matrices de las distancias genéticas entre poblaciones pueden ser convertidas en árboles evolutivos utilizando métodos de agrupamiento tales como el UPGMA o el Neighbour Joining (Goldstein y Schlötterer, 1999).

Asumiendo diferentes modelos mutacionales para los *loci* que codifican para proteínas (IAM) y para los *loci* microsatélites (SMM), Takezaki y Nei (1996), estudiaron la eficacia, mediante simulación por ordenador, de diferentes medidas de distancia en la correcta reconstrucción de una filogenia conocida. Dichas distancias correspondieron a:

1.- Distancia estándar de Nei (D_S ; Nei, 1972):

$$D_S = -\ln [J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}]$$

donde J_x y J_y son las homocigosis medias sobre *loci* en la población X e Y, respectivamente .

Bajo el proceso mutacional IAM se espera la D_s que incremente linealmente con el tiempo, si se mantiene un balance entre deriva y mutación a través de todo el proceso evolutivo.

2.- Distancia mínima de Nei (D_m ; Nei, 1973):

$$D_m = (J_x + J_y) / 2 - J_{xy}$$

En este caso la esperanza de D_m es conocida como

$E(D_m) = J(1 - e^{-2vt})$, donde J es la homocigosis de las dos poblaciones.

3.- Distancia de Reynolds (Reynolds y col., 1983):

$$DL = -\ln (1 - F_{ST})$$

$$F_{ST} \cong \theta_{ST} = \frac{(J_x + J_y) / (2 - J_{xy})}{1 - J_{xy}}$$

4.- Distancia de Rogers' (1972):

$$D_R = (1/r) \sum_j^r \sqrt{\left[\sum_i^{m_j} (x_{ij} - y_{ij})^2 / 2 \right]}$$

5.- Distancia de Prevosti (C_p; Prevosti y col., 1975):

Esta distancia posee las mismas propiedades estadísticas que la D_R y se define como:

$$C_p = \sum_j^r \sum_i^{m_j} |x_{ij} - y_{ij}| / (2r)$$

6.- Distancia de cuerda (D_C; Cavalli-Sforza y Edwards, 1967):

$$D_C = (2 \pi r) \sum_j^r \sqrt{2 \left(1 - \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}}\right)}$$

La D_C representa las poblaciones como puntos en la superficie de una hiperesfera multidimensional, usando las frecuencias alélicas. La distancia entre ellas sería dada a partir de la longitud cordal entre los puntos.

7.- Distancia "A" de Nei (D_A; Nei y col., 1983):

$$D_A = (1/r) \sum_j^r \left[1 - \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}} \right]$$

Nei simuló esta distancia (D_A) con el proceso mutacional IAM y demostró que era más eficiente que la D_S, D_m, D_R y D_C en la asignación de correctas topologías.

Otra distancia es la $\delta\mu^2$ de Goldstein y col. (1995), la cuál es la más reciente y como producto de la aparición de los primeros estudios con ADN microsatélite. Dado que estos marcadores poseen un elevado grado de polimorfismo con respecto al número de repeticiones, su número puede aumentar o disminuir por un proceso mutacional del tipo SMM (stepwise mutation model). Bajo este modelo de mutación, un alelo i (alelos con i repeticiones) se asume que puede mutar a otro alelo en un estado $i + 1$ ó $i - 1$ con igual probabilidad, aludiendo un mejor análisis para este tipo de marcador y denotándose de la siguiente manera:

$$(\delta\mu)^2 = \sum_j^r (\mu_{xj} - \mu_{yj})^2 / r;$$

donde μ_{xj} ($=\sum_i i x_{ij}$) y μ_{yj} ($=\sum_i i y_{ij}$) representan los estados alélicos medios del j th locus y x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias de los alelos en el estado i en el j th locus en la población X e Y, respectivamente.

En estos estudios Takezaki y Nei (1996) concluyen, que con respecto a las distancias genéticas generadas a partir de datos de estudios tanto con marcadores clásicos, los cuáles presentan un modelo de mutación IAM, como con microsatélites, con mutación del tipo SMM, las distancias más eficientes, tanto para modelos de mutación IAM y SMM, resultaron ser la D_C (Cavalli-Sforza y Edwards) y la D_A (Nei) para la correcta asignación de topologías y la distancia estándar de Nei (D_S) y la de Goldstein y col. (1995) ($\delta\mu^2$) resultaron ser las más apropiadas para estimar los tiempos evolutivos, coincidiendo en estas conclusiones también Ruane (1999) y Nagamine y Higuchi (2001).

Matemáticamente hablando, cualquiera de estas funciones debe poseer ciertas propiedades para poder ser consideradas como una

distancia. Primero, la distancia entre una población A y sí misma debe ser cero (0), de aquí que $d(A,A)=0$. Segundo, la distancia entre la población A y la población B debe ser simétrica, o lo que es lo mismo $d(A,B) = d(B,A)$; si una distancia satisface estas propiedades se denomina distancia semi-métrica y si además logra satisfacer la desigualdad triangular $d(A,B) \leq [d(A,C) + d(B,C)]$ se denomina distancia métrica (Eding y Laval, 1999). (Nota: La distancia D_s de Nei, no cumple estas propiedades, ya que no es una distancia métrica).

Métodos de agrupamiento o algoritmos:

En la construcción de los árboles filogenéticos existen diferentes métodos para dibujar la matriz de distancias. Sin embargo, los más empleados son el Neighbour-Joining (NJ) y el Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA), los cuáles generalmente dan muy buenos resultados. A pesar de ello el primero parece ser superior cuando se asume en el modelo diferentes tasas de evolución (Takezaki y Nei, 1996; Eding y Laval, 1999).

El método NJ fue descrito por Saitou y Nei (1987). Se caracteriza por que construye árboles mediante sucesivos agrupamientos de alineaciones, tomando en cuenta las longitudes de rama para dichos agrupamientos. Una vez realizado el agrupamiento deriva la mejor aproximación para la máxima parsimonia, construyendo los grupos apareados sobre la base de la mínima longitud de rama. Las dos principales características de este método es que, en primer lugar los resultados nos dan un árbol no rotado, y en segundo lugar, no asume un reloj evolutivo.

Por otra parte, el método UPGMA construye los árboles o dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos, bajo el criterio del

promedio de la distancia de cada par. Se caracteriza porque asume una tasa constante de cambios evolutivos, es decir asume la existencia de un reloj evolutivo, y los árboles son rotados. Weir (1996) lo definió como una distancia entre grupos, producto del promedio de todas las distancias entre pares de cada una de las combinaciones.

Es así que los dendrogramas no son más que la representación gráfica de una matriz de distancias, y que bajo ciertas condiciones, esta representación, puede ser tomada como una estimación de la filogenia

Análisis de remuestreos:

Dado que la estimación de las distancias genéticas entre poblaciones es un método estadístico, el proceso de muestreo es sumamente importante. Existen varias técnicas estadísticas para remuestreos de los datos de *loci* genéticos. Entre ellas se encuentran el Bootstrapping y el Jackknife; estas técnicas permiten la posibilidad de dibujar múltiples árboles y estimar la fiabilidad para los diferentes nodos en el árbol, así como el nivel de confianza del árbol (Weir, 1990).

El bootstrapping es una técnica que genera información adicional acerca de la distribución de los parámetros. Dado que los datos consisten en n observaciones, un bootstrap genera una muestra de n dibujos al azar, realizado por medio del reemplazamiento de los datos originales. Es así que, todas las observaciones originales tienen la misma oportunidad o “chance” de ir siendo reemplazados, y al final el valor de los nuevos bootstrap será el promedio para el parámetro muestreado (Weir, 1990; Tivang y col., 1994). Generalmente este proceso se repite un gran número de veces (≥ 1000), y así se crean un gran número de “nuevos” conjuntos de datos, pudiéndose usar además

para estimar medias y desviaciones estándar de un estimador calculado con los datos en cuestión.

La técnica del Jackknife por otro lado, es un simple re-muestreo numérico, que consiste en generar un “nuevo” valor, estimado a partir de la técnica iterativa, basada en la estimación de máxima verosimilitud después de excluir la i -ésima observación. Así, cada nuevo valor estimado estaría basado en $n-1$ observaciones; la principal limitación de esta técnica *versus* la bootstrap es que nos da muy poca información acerca de la distribución de los estimadores (Weir, 1996).

Diversidad de Weitzman

El análisis de Weitzman es otro método para la construcción de árboles filogenéticos, basado en este caso en la función de diversidad (Weitzman, 1992; 1993).

Dado que en los programas de conservación genética el principal objetivo es preservar la variabilidad dentro de la población, bajo la hipótesis de existencia de correlación entre la variación genética y la viabilidad de la población, se hace necesario por tanto, cuantificar la biodiversidad para así racionalizar mejor la política de conservación (Weitzman, 1992).

La diversidad de Weitzman se puede definir como la diversidad esperada después de un cierto periodo de tiempo, y se basa en la probabilidad de extinción de cada elemento (población o raza) en un conjunto o grupo considerado. Si n elementos están en peligro de extinción, ambos patrones (supervivencia y/o extinción) pueden ocurrir con una cierta probabilidad. Para cada uno ellos, pueden calcularse los correspondientes valores de diversidad (Thaon d' Arnoldi, y *col.*, 1998).

Una vez conocida la consanguinidad de una población o raza, ésta puede utilizarse como su propia probabilidad de extinción y nos puede dar entonces un orden para priorizar sobre la o las razas a conservar.

1.10 ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A RAZA

Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, están rápidamente reemplazando o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas en las aplicaciones evolutivas y la conservación genética. Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones, siendo especialmente estos estudios los referidos a: análisis de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza, planificación de apareamientos y otros sucesos de índole reproductiva (Jones y *col.*, 1998).

En lo referente a la correcta asignación de individuos a raza, diferentes procedimientos han sido reportados en la literatura actual, mostrando estos, tanto una gran variedad de aplicaciones como de metodologías para la correcta identificación de la fuente poblacional (Paetkau y *col.*, 1995; Rannala y Mountain, 1997; Cournet y *col.*, 1999).

Los dos métodos más utilizados para asignar individuos a poblaciones o razas son: los métodos basados en probabilidades y los métodos basados en distancias genéticas. En los primeros, los individuos son asignados a aquella población en la que su genotipo presenta una mayor probabilidad de pertenecer; mientras que, en los segundos, los individuos son asignados a la población que genéticamente sea más próxima o cercana.

Métodos basados en probabilidades:

a.- Método de frecuencias:

Este método fue descrito en primer lugar por Paetkau *y col.* (1995), y consiste en asignar un individuo a una población basándose en el valor de probabilidad de su genotipo individual de pertenecer a ella.

La asignación por este método se realiza en tres etapas:

1. Calcula las frecuencias alélicas de todas las potenciales poblaciones.
2. Calcula la probabilidad de ocurrencia de cada genotipo multilocus para cada una de las poblaciones.
3. Asigna el individuo a aquella población en la cuál el genotipo multilocus obtuvo la mayor probabilidad.

b.- Método Bayesiano:

Este método es bastante similar al anterior y está muy relacionado con lo reportado por Rannala y Mountain (1997), quienes utilizaron la metodología Bayesiana para detectar migrantes mediante el uso del genotipado multilocus. Asumiendo una igual densidad de probabilidad *a priori* de las frecuencias alélicas de cada *locus* en cada población, Rannala y Mountain mostraron que la probabilidad marginal de observar un individuo con un genotipo $A_k A_{k'}$ en el *locus* j y en la población i es igual a:

$$\frac{(n_{ijk} + 1 / K_j + 1) (n_{ijk} + 1 / K_j)}{(n_{ij} + 2) (n_j + 1)} \quad \text{si } k = k'$$

ó

$$\frac{2 (n_{ijk} + 1 / K_j) (n_{ijk'} + 1 / K_j)}{(n_{ij} + 2) (n_{ij} + 1)} \quad \text{si } k \neq k'$$

donde n_{ijk} es el número de alelos k muestreados en el *locus* j y en la población i (que no contiene al individuo a ser asignado), n_{ij} es el número de copias de genes muestreados en el *locus* j y en la población i y K_j es el número total de alelos observados del *locus* j en las poblaciones estudiadas.

Métodos basados en distancias:

Los métodos basados en distancias asignan al individuo a la población genéticamente más cercana o próxima. Para ello se requiere definir una distancia entre el individuo y la población. Se han definido numerosas distancias genéticas; sin embargo las podemos agrupar en dos grandes bloques: las distancias entre poblaciones (p.e. distancias de Nei; distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards, etc.) y las distancias entre individuos (eje. distancia de alelos compartidos (D_{AS}) Chakraborty y Jin, 1993).

En el primer caso se adaptan estas distancias a la relación entre individuo-población, considerando a los individuos cómo una muestra de dos genes (los posibles valores de frecuencias alélicas son 0, 0,5 y 1). Mientras que, en el caso de los alelos compartidos (D_{AS}), la distancia entre un individuo y la población se toma como el promedio de distancia entre el individuo y los miembros de esa población

1.11 ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL

El ADN en el organismo se divide en ADN nuclear y ADN mitocondrial. Este último se localiza en las mitocondrias, que son unas organelas citoplasmáticas cuya función principal es suplir la energía necesaria a la célula por medio de la cadena de transporte de electrones, el ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos. Aunque la mitocondria posee su propio genoma con replicación, transcripción y traslación independiente, posee algunas características similares a los pro y eucariotas. El ADN mitocondrial (mtDNA) es haploide y se hereda casi exclusivamente por vía materna, habiéndose podido demostrar claramente en los híbridos del asno-caballo, las mulas (Hutchison y *col.*, 1974); por lo que ofrece grandes posibilidades para tests maternos, así como para la verificaciones de líneas maternas después de muchas generaciones (Bowling y *col.*, 1998).

Los ovocitos contienen aproximadamente de 10^5 a 10^8 moléculas de mtDNA; mientras que el espermatozoide sólo 10 a 100 moléculas; es así que por razones de probabilidad sea casi imposible o tan ínfima la cantidad de mtDNA por vía del padre, por lo que se atribuye que todo se hereda vía materna (Grossman y Shoubridge, 1996).

Dentro del ADN mitocondrial se encuentran genes que codifican para 13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia. Además existen 37 genes, que se encuentran presentes en todos los animales, y una región muy variable conocida como D-loop o región control, de un tamaño aproximado de 0.8 Kb (Awise y *col.*, 1987).

El mtDNA asnal es circular y posee unos 16670 pb (Xu y *col.*, 1996; Figura 4). Presenta dos características interesantes que lo hacen particularmente especial para estudios filogenéticos. En primer lugar, los cambios (llámese evolución o mutación) que ocurren en el mtDNA en

la mayoría de los casos, se dan como una simple sustitución de un solo par de bases (pb), siendo infrecuente mayores reordenamientos; y en segundo lugar, la tasa de evolución o mutación es hasta 10 veces mayor que la del ADN nuclear. Dentro del mtDNA, la región control (D-loop) posee una tasa de mutación cinco veces superior que el resto del genoma mitocondrial (Kim *y col.*, 1999).

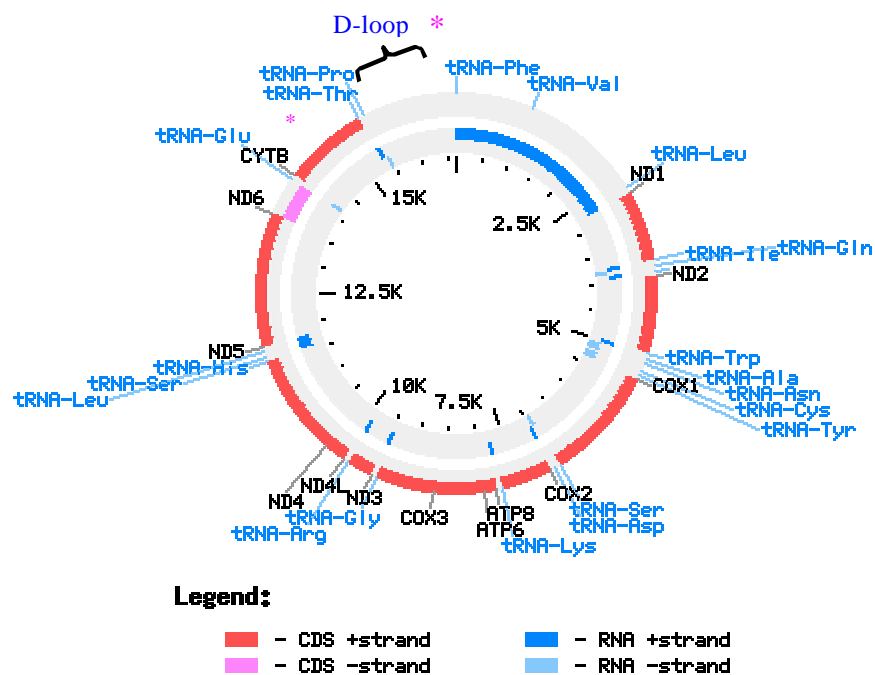


Figura 4. ADN mitocondrial del asno doméstico.

Fuente: Genebank

* Regiones estudiadas

Para estudiar la variabilidad del mtDNA se utilizan principalmente dos técnicas: la *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs) y la secuenciación directa de fragmentos específicos. Debido a que con la primera técnica sólo se detectan las mutaciones que afectan a las dianas de restricción específicas de cada enzima, y que la secuenciación de ADN se ha automatizado y ha reducido costes, la utilización de esta última está desplazando a los

RFLPs. En la secuenciación se amplifican fragmentos específicos mediante PCR y se secuencian obteniendo una mayor información, ya que se detectan todas las mutaciones y no sólo aquellas que afectan a las dianas de restricción.

Estas características facilitan el uso del mtDNA como una herramienta para determinar relaciones entre individuos dentro de especies y entre especies próximas con recientes tiempos de divergencia (Awise y *col.*, 1979; Brown y *col.*, 1979). La tasa de mutación evolutiva de la región mitocondrial en los équidos se ha estimado que oscila entre $2-4 \times 10^{-8}$ por nucleótido y sitio (Ishida y *col.*, 1995).

Por lo anteriormente descrito y como búsqueda de herramientas para la conservación de estas razas asnales minoritarias se llevó a cabo este estudio.