

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINARIA
DEPARTAMENT DE PATHOLOGIA I DE
PRODUCCIO ANIMALS

RELACIONES GENETICAS EN CANIDOS ESPANOLES



Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Veterinaria por la Universidad Autònoma de Barcelona por.
Jordi Jordana i Vidal

Bellaterra, Julio de 1.989



UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINARIA
DEPARTAMENT DE PATHOLOGIA I DE
PRODUCCIO ANIMALS

RELACIONES GENETICAS EN CANIDOS ESPAÑOLES

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Veterinaria por la Univer-
sidad Autònoma de Barcelona por.
Jordi Jordana i Vidal

Bellaterra, Julio de 1.989



D. Jesús PIEDRAFITA Arilla, Profesor Titular del Departament de Patologia i de Producció Animals de la Facultat de Veterinària de Barcelona, informa como Director de la Tesis que:

D. Jordi JORDANA i Vidal, Licenciado en Veterinaria, lleva trabajando desde el año 1.985 en el tema: Relaciones genéticas en cánidos españoles.

Lo que suscribe como Director del trabajo, en Bellaterra a treinta y uno de julio de mil novecientos ochenta y nueve.

Jesús Piedrafita

Jesús Piedrafita Arilla

Txiki i Idoia

AGRADECIMIENTOS.

Mi agradecimiento ante todo al Dr. Jesús Piedrafita Arilla, profesor titular del Departament de Patología i de Producció Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, por la dirección, ayuda y consejos que han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Armand Sánchez i Bonastre, profesor titular del mismo Departamento, por las charlas tan productivas que hemos mantenido, de todo un poco, pero sobre todo de taxonomía numérica y metodología filogenética.

A mis compañeros veterinarios, que de una u otra forma me han ayudado en la laboriosa tarea de la toma de muestras, mi más profundo agradecimiento a; Andreu, Antoni, Jesús, Ramon, Sebastià y Toni de Lleida; Félix e Ivonne de Barcelona; Gabriel de Mallorca; José Luis de Madrid; Javier de Tenerife y Juan José de Pamplona.

A todos aquellos propietarios que no han tenido inconveniente en que su perro diera un poco de sangre, y de forma muy especial a las siguientes personas, que utilizando su nombre he podido romper suspicacias y abrir otras puertas; Fernando Martí de Montagut (Barcelona), Florentina Ramon (Sta. Coloma de Queralt), Josep Casals (Centelles), María Luisa Sánchez-Arjona (Premià de Dalt), Paco Ruiz (Palma de Mallorca), Rafael Malo (Zaragoza) y Salvador Gómez-Toldrà (La Garriga).

Al Dr. Joan del Castillo, profesor titular del Departament de Matemàtiques de la U.A.B, por sus explicaciones sobre el análisis factorial de componentes principales.

A Gallina Blanca Purina, por la concesión de una ayuda, obtenida en el I Gran Premio Purina 1985, con la cual se financió parcialmente la puesta en marcha del presente trabajo.

Finalmente, y de una manera muy especial, a mi mujer Txiki y a mi hija Idoia, por haber sabido aguantar y comprender el histerismo de su padre.

INDICE

I.	INTRODUCCION Y JUSTIFICACION	2
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA	10
II.1.	EL ORIGEN DEL PERRO	10
II.2.	LA CLASIFICACION DE LAS RAZAS CANINAS	18
II.3.	LAS RAZAS CANINAS ESPAÑOLAS. ORIGEN Y CLASIFICACION	24
II.4.	VARIABILIDAD GENETICA DE LAS POBLACIONES	40
II.4.1.	TEORIAS SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LA VARIACION	42
II.5.	LA MEDIDA DE LA VARIACION GENETICA	44
II.5.1.	METODOS PARA LA MEDIDA DE LA VARIACION GENETICA	46
II.5.1.1.	METODOLOGIA MENDELIANA Y CUANTITATIVA	46
II.5.1.2.	METODOLOGIA MOLECULAR	46
II.5.1.2.1.	Divergencia proteica	47
II.5.1.2.1.1.	Electroforesis	47
II.5.1.2.1.2.	Técnicas Inmunológicas	47
II.5.1.2.1.3.	Secuenciación de proteínas	48
II.5.1.2.2.	Divergencia de Ácidos Nucléicos	48
II.5.1.2.2.1.	Hibridación del ADN	48
II.5.1.2.2.2.	Técnica de los enzimas de restricción	48
II.5.1.2.3.	Divergencia del ADN mitocondrial	49
II.5.2.	LA CUANTIFICACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA	49
II.5.2.1.	ESTADISTICOS EMPLEADOS	50
II.5.2.1.1.	Tasa de Polimorfismo (P)	50
II.5.2.1.2.	Heterocigosidad (H)	51
II.5.2.1.3.	Tasa de alelismo (n)	54
II.5.3.	LA ELECTROFORESIS COMO ESTIMADOR DE LA VARIABILIDAD	54
II.5.3.1.	CONCEPTO Y BASES DE LA ELECTROFORESIS	54
II.5.3.1.1.	Electroforesis en gel de almidón	56
II.5.3.1.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	57
II.5.3.1.3.	Electroforesis en gel de agarosa	58
II.5.3.2.	REPRESENTATIVIDAD DEL POLIMORFISMO ENZIMATICO	58
II.6.	ESTIMACION DE LA DIVERGENCIA ENTRE POBLACIONES	61
II.6.1.	INDICES DE FIJACION O F-ESTADISTICOS	62
II.6.2.	INDICES DE DISTANCIA GENETICA	64
II.6.2.1.	DISTANCIA DE CAVALLI-SFORZA Y EDWARDS	66
II.6.2.2.	DISTANCIA DE EDWARDS	68
II.6.2.3.	DISTANCIA DE NEI	68
II.6.2.4.	DISTANCIA DE ROGERS	70
II.6.2.5.	DISTANCIA DE HEDRICK	71
II.6.2.6.	DISTANCIA DE PREVOSTI	72
II.7.	TAXONOMIA Y FILOGENIA	74
II.7.1.	FENETICOS, CLADISTAS Y EVOLUCIONISTAS	75
II.7.2.	ARBOLES FILOGENETICOS	77
II.7.2.1.	ANALISIS QUALITATIVO	77
II.7.2.2.	ANALISIS CUANTITATIVO	80

II.7.2.3.	<u>COMPARACION DE LOS METODOS</u>	82
II.7.3.	<u>EL RELOJ MOLECULAR DE LA EVOLUCION</u>	85
II.8.	APORTACIONES BIOQUIMICAS SOBRE EL ORIGEN Y LAS RELACIONES FILOGENETICAS DE LOS CANIDOS	90
II.8.1.	<u>GENERO CANIS</u>	90
II.8.2.	<u>ESPECIE CANIS FAMILIARIS</u>	93
III.	MATERIAL Y METODOS	99
III.1.	ANALISIS MORFOLOGICO	99
III.1.1.	<u>CARACTERES MORFOLOGICOS. MATRIZ DE SEMEJANZAS MORFOLOGICAS</u>	99
III.2.	ANALISIS BIOQUIMICO	102
III.2.1.	<u>POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS</u>	102
III.2.2.	<u>DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y SUBDIVISION DE LAS POBLACIONES</u>	104
III.2.2.1.	<u>DISTRIBUCION GEOGRAFICA</u>	104
III.2.2.2.	<u>SUBDIVISION DE LAS POBLACIONES</u>	105
III.2.3.	<u>OBTENCION, PROCESADO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.</u>	107
III.2.4.	<u>TECNICAS ELECTROFORETICAS</u>	110
III.2.4.1.	<u>TECNICAS GENERALES</u>	110
III.2.4.1.1.	<u>Electroforesis horizontal en gel de almidón</u>	110
III.2.4.1.2.	<u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	113
III.2.4.1.2.1.	<u>Preparación de los moldes</u>	113
III.2.4.1.2.2.	<u>Confección de las soluciones base</u>	113
III.2.4.1.2.3.	<u>Confección de los geles</u>	114
III.2.4.1.2.4.	<u>Aplicación de las muestras</u>	115
III.2.4.1.2.5.	<u>Electroforesis</u>	115
III.2.4.1.3.	<u>Electroforesis en gel de agarosa</u>	117
III.2.4.1.3.1.	<u>Preparación de los moldes</u>	117
III.2.4.1.3.2.	<u>Confección del gel</u>	117
III.2.4.1.2.3.	<u>Aplicación de las muestras. Electroforesis</u>	118
III.2.4.1.2.4.	<u>Trasvase de las muestras al gel de poliacrilamida.</u>	
III.2.4.2.	<u>Electroforesis bidimensional</u>	119
III.2.4.2.1.	TECNICAS ESPECIFICAS	120
III.2.4.2.1.1.	<u>Técnicas realizadas sobre gel de almidón</u>	120
III.2.4.2.1.2.	<u>Superóxido dismutasa</u>	121
III.2.4.2.1.3.	<u>Glucosa fosfato isomerasa</u>	122
III.2.4.2.1.4.	<u>Leucin aminopeptidasa</u>	124
III.2.4.2.1.5.	<u>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</u>	125
III.2.4.2.1.6.	<u>Manosa fosfato isomerasa</u>	126
III.2.4.2.1.7.	<u>Fosfoglucomutasa-1</u>	127
III.2.4.2.1.8.	<u>Malato deshidrogenasa</u>	129
III.2.4.2.1.9.	<u>Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa</u>	131
III.2.4.2.1.10.	<u>Albúmina</u>	132
III.2.4.2.1.11.	<u>Peptidasa D</u>	134
III.2.4.2.2.	<u>Fosfatasa ácida</u>	135
III.2.4.2.2.1.	<u>Técnicas realizadas sobre gel de poliacrilamida</u>	137
III.2.4.2.2.2.	<u>Transferrina</u>	138
III.2.4.2.2.3.	<u>Prealbúmina</u>	139
III.2.4.2.2.4.	<u>Proteína Gc</u>	140
	<u>α_1-B-Glicoproteína</u>	141

III.2.4.2.2.5.	α_1 -Proteasa inhibidor	142
III.2.4.2.2.6.	Proteasa inhibidor-3	143
III.2.4.2.3.	<u>Técnicas realizadas sobre gel de agarosa-poliacrilamida (bidimensional)</u>	144
III.2.4.2.3.1.	Postalbúmina-1	146
III.2.4.2.3.2.	Pretransferrina-1 y Pretransferrina-2	146
III.3.	ANALISIS DE LOS DATOS	147
III.3.1.	<u>EL POLIMORFISMO ENZIMATICO</u>	147
III.3.2.	<u>LA DIFERENCIACION INTERPOBLACIONAL</u>	150
III.3.2.1.	<u>DISTANCIAS GENETICAS</u>	151
III.3.2.1.1.	<u>Caracteres Morfológicos</u>	151
III.3.2.1.2.	<u>Polimorfismos Bioquímicos</u>	151
III.3.2.2.	<u>LOS F-ESTADISTICOS DE NEI Y WRIGHT</u>	153
III.3.2.3.	<u>ANALISIS FACTORIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES</u>	156
III.4.	CONSTRUCCION DE LOS DENDROGRAMAS	157
III.4.1.	<u>ALGORITMOS PARA CARACTERES MORFOLOGICOS</u>	157
III.4.1.1.	<u>ANALISIS CUALITATIVO</u>	158
III.4.1.2.	<u>ANALISIS CUANTITATIVO</u>	159
III.4.2.	<u>ALGORITMOS PARA POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS</u>	161
III.4.2.1.	<u>ANALISIS DE CLUSTER</u>	161
III.4.2.2.	<u>METODO DE WAGNER</u>	164
III.4.2.3.	<u>ESTADISTICOS DE BONDAD DE AJUSTE</u>	167
IV.	RESULTADOS	171
IV.1.	NIVELES DE VARIABILIDAD GENETICA	171
IV.2.	ESTRUCTURA GENETICA DE LAS POBLACIONES	177
IV.3.	LOS F-ESTADISTICOS EN LA DIFERENCIACION INTERPOBLACIONAL	183
IV.3.1.	<u>SUBPOBLACIONES RESPECTO AL TOTAL</u>	185
IV.3.2.	<u>RAZAS RESPECTO AL TOTAL</u>	185
IV.3.3.	<u>TRONCOS ANCESTRALES RESPECTO AL TOTAL</u>	187
IV.3.4.	<u>SUBPOBLACIONES DENTRO DE CADA RAZA</u>	190
IV.3.5.	<u>ANALISIS JERARQUICO DE WRIGHT</u>	190
IV.3.6.	<u>COMPARACION DIRECTA ENTRE RAZAS</u>	194
IV.4.	RELACION EXISTENTE ENTRE POBLACIONES MEDIANTE ANALISIS FACTORIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES	197
IV.5.	DISTANCIAS GENETICAS INTRA E INTERRACIALES	212
IV.5.1.	<u>CARACTERES MORFOLOGICOS</u>	212
IV.5.2.	<u>POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS</u>	214
IV.5.2.1.	<u>VALORES DE DIVERGENCIA GENETICA A DISTINTOS NIVELES DE DIFERENCIACION TAXONOMICA</u>	224
IV.6.	RELACIONES FILOGENETICAS	225
IV.6.1.	<u>CARACTERES MORFOLOGICOS</u>	225
IV.6.1.1.	<u>ANALISIS CUALITATIVO</u>	225
IV.6.1.2.	<u>ANALISIS CUANTITATIVO</u>	228
IV.6.2.	<u>POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS</u>	234

IV.6.2.1.	METODO DE FITCH Y MARGOLIASH PARA VALORES F(ST) ..	235
IV.6.2.2.	ANALISIS DE CLUSTER	237
IV.6.2.2.1.	<u>Valores de Error Estándar en los puntos de bifurcación</u>	245
IV.6.2.3.	METODO DE WAGNER	249
V.	<u>DISCUSION</u>	255
V.1.	EL POLIMORFISMO ENZIMATICO	255
V.1.1.	<u>NIVELES DE VARIABILIDAD GENETICA</u>	255
V.1.2.	<u>LA CONSTITUCION ALELICA DE LAS POBLACIONES</u>	264
V.2.	LA DIFERENCIACION GENETICA ENTRE POBLACIONES	269
V.2.1.	<u>LOS INDICES DE DISTANCIA GENETICA</u>	269
V.2.2.	<u>LOS INDICES DE FIJACION O F-ESTADISTICOS</u>	275
V.2.3.	<u>RAZA GENETICA "VERSUS" RAZA ZOOTECNICA</u>	280
V.3.	RELACIONES FILOGENETICAS	281
V.3.1.	<u>FIABILIDAD DE LOS PUNTOS DE DIVERGENCIA A LA HORA DE INFERIR RELACIONES EVOLUTIVAS</u>	281
V.3.2.	<u>CONGRUENCIA ENTRE FILOGENIAS ENZIMATICAS Y MORFOLOGICAS</u>	284
V.3.3.	<u>TIEMPOS ESTIMADOS DE DIVERGENCIA EVOLUTIVA</u>	291
V.4.	DIRECCIONES FUTURAS	294
VI.	<u>CONCLUSIONES</u>	297
VII.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	305
VIII.	<u>APENDICE</u>	318

I.- INTRODUCCION Y JUSTIFICACION

I.- INTRODUCCION Y JUSTIFICACION

La historia evolutiva del perro se ha desarrollado, desde siempre, paralela a la del hombre. Asumiendo, como hipótesis más probable, que el perro (Canis familiaris) descendiente del lobo (Canis lupus), se ha sugerido que la asociación entre el hombre cazador y los lobos podría haber tenido lugar hace unos 40.000 años, con la aparición del Homo sapiens (Clutton-Brock, 1984).

Pero es de Ein Mallaha, en la llanura de Natufian, al norte de Israel, de donde provienen las evidencias más sólidas que indican una primera y estrecha relación entre hombre y perro; se trata del hallazgo de un esqueleto completo de un perro joven junto a un esqueleto humano, cuyas edades arqueológicas aproximadas se calcularon entre 10.000 y 12.000 años (Davis y Valla, 1978).

Numerosas son las evidencias que ligan la historia del perro a la del hombre, habiéndose hallado restos arqueológicos -con antigüedades comprendidas entre 5.000 y 12.000 años- en asentamientos humanos, en lugares tan distantes como Irak, Inglaterra, Estados Unidos, Australia y China, por poner sólo algunos ejemplos.

Hace 5.000 años, las principales líneas de perros que conocemos hoy día, comenzaban a ser representadas en trabajos de arte. En Asia se pueden observar perros tipo mastín, según ha quedado constancia en los frisos Asirios y Babilónicos. Perros del tipo lebrel ya existían en Egipto durante las dinastías del Imperio Antiguo (Perro de los Faraones), como se puede observar en la tumba de Ptah que gobernó durante la V dinastía, cuyos antepasados llegaron probablemente de Mesopotamia (Villemont y col., 1970).

Los molosos, -que deben su nombre a una comarca del Epiro, la Molosia-, llegaron a Grecia tras la derrota de Jerjes I, rey persa aqueménida, en el año 480 a.C., y fueron también traídos de la India, su país de origen, por Alejandro Magno. Jenofonte (430-355 a.C) consagra al perro en un tratado de caza, Kunēgetikos, y Aristóteles, en su Historia de los Animales, habla de numerosas razas caninas, de la reproducción y de sus enfermedades.

El hombre fue adaptando -a través de la selección, interactuando con el medio ambiente- las diferentes líneas de perros a distintas funciones. Se desarrollaron varios tipos de perros ovejeros, guardianes, cazadores y rastreadores y hasta diversos tipos, cuya única función era la de ser animales de compañía o, en algunos casos, exclusivamente decorativos.

El periodo de diferenciación racial ha sido largo. Además, la selección racial llevada a cabo en esta especie hasta nuestros días, ha sido muy importante, como lo demuestra la presencia de las más de 400 razas caninas actualmente reconocidas, sin tener en cuenta la multitud de razas autóctonas; no reconocidas oficialmente, que existen diseminadas por el mundo.

Los intentos de clasificación sistemática de este gran contingente de razas, dentro de grupos lo más afines posible y la investigación de las relaciones filogenéticas existentes entre ellas, ha sido una labor continuada desde finales del s. XIX, a partir de la creación de los "Kennels Clubs" de Inglaterra y Norteamérica.

Sin embargo, debido a la gran proliferación de razas caninas, podríamos plantearnos la duda de si en realidad todas las poblaciones catalogadas como razas, se ajustan a la interpretación genética de la misma, o si por el

contrario, tan sólo difieren en uno o pocos genes que las hacen distinguibles morfológicamente.

En este contexto, debemos señalar que en la gran mayoría de especies de animales domésticos, y de manera muy notable en la especie canina, las características que habitualmente definen una raza son primordialmente morfológicas, por lo que podríamos denominarlas como razas "zootécnicas". Estos caracteres morfológicos han estado sometidos a una gran presión de selección, tanto natural como artificial, siendo por tanto esta fuerza evolutiva la que habría tenido un mayor peso en el proceso de diferenciación racial.

No obstante, estos caracteres fenotípicos presentan una correlación baja con el genotipo porque se hallan alejados de su expresión primaria y por consiguiente son, en general, unos indicadores poco potentes de las semejanzas y diferencias genéticas. La posibilidad de comparar productos directos de la acción génica (proteínas) o el propio material genético (ácidos nucléicos) permite acercarse al genotipo y medir directamente la divergencia genética (Guerin, 1980; Fontdevila, 1987), ya que como señala Strickberger (1985) las proteínas presentan la importante ventaja evolutiva de que son en cierto sentido "huellas químicas" de la historia evolutiva, debido a que sus secuencias de aminoácidos sólo han cambiado como resultado de los cambios genéticos.

Los valores de las frecuencias génicas, en distintas poblaciones, de genes neutros estructurales que codifican para proteínas y enzimas solubles de la sangre -detectados mediante técnicas electroforéticas-, sin ninguna relación observable y estudiada hasta el momento- sobre la aptitud o eficacia biológica de los individuos, podrían ser un buen indicador de la similitud o divergencia genética entre estas poblaciones, a las que a estos efectos podríamos denominar como razas "genéticas".

Además, el estudio de la estructura genética de cada una de las poblaciones, nos puede permitir conocer el grado de variabilidad génica presente en las razas actuales, lo cual sería de vital importancia para cualquier programa de conservación de razas y el aprovechamiento de esas "fuentes de reserva genética" para generaciones futuras (Aupetit, 1985).

Según Guerin (1980), en nuestros días la variabilidad génica en la mayoría de las razas domésticas tiende a disminuir rápidamente, debido principalmente a la gran presión de selección que se lleva a cabo sobre ellas. La pérdida creciente de esa variabilidad conllevaría diferentes tipos de problemas, que podrían ir desde una disminución de la aptitud o eficacia biológica, hasta la ausencia de progreso genético en determinados caracteres, aunque a este respecto, Hill (1982) argumenta que la mutación puede incrementar apreciablemente la respuesta a la selección y prolongarla indefinidamente, mientras no se alcance el límite de selección.

Por otra parte, conocer la cantidad de variabilidad genética y el grado de diferenciación existente entre razas podría ser de gran interés, en el caso concreto de la especie canina, de cara a la formación y creación de nuevas razas "zootécnicas" que se deban amoldar a los imprevisibles gustos y apetencias del mercado, como ha sido el caso del Pastor Alemán y el Doberman "fabricados" a principios de siglo, por poner sólo un par de ejemplos, siempre y cuando los resultados de variabilidad genética, detectada electroforéticamente, complementaran la información obtenida de variabilidad zootécnica, ya que si dos poblaciones se diferencian morfológica y genéticamente, las posibilidades de formación y mantenimiento de esa nueva raza podrían ser mayores.

Los diferentes aspectos comentados nos han llevado a proponer como objetivos del presente trabajo los siguientes:

A) Realizar un estudio de la estructura genética de las diferentes razas caninas españolas, analizada a través de marcadores enzimáticos y proteicos.

B) Cuantificar la diferenciación existente entre las razas, tanto a nivel morfológico como a nivel genético -enzimático y proteico-, con vistas a realizar una clasificación de las mismas.

C) Con los resultados cuantificados de variabilidad morfológica y variabilidad genética, comprobar si el concepto de raza "zootécnica" se corresponde con el concepto de raza "genética", estudiando la cantidad de diferenciación que existe entre dos poblaciones que son catalogadas como razas.

D) Inferir sus posibles relaciones filogenéticas a partir de los datos morfológicos y electroforéticos.

E) Comprobar si existe un paralelismo evolutivo entre las posibles filogenias morfológicas y enzimáticas resultantes.

A grandes rasgos, el plan de trabajo de nuestro estudio es el siguiente:

Se realiza en primer lugar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el origen del perro, comentando los criterios usados y las clasificaciones de las diferentes razas existentes en la actualidad, entre ellas las españolas -objetivo de nuestro estudio-, así como una recopilación de las hipótesis existentes sobre el origen de dichas razas caninas.

Dado que el estudio de la variabilidad genética en las razas caninas españolas es el objetivo fundamental del trabajo, se hace necesario conocer como se mantiene esa variabilidad, que métodos existen para medirla, como se puede cuantificar y finalmente como podemos estimar la divergencia existente entre poblaciones, infiriendo a partir de ella sus posibles relaciones filogenéticas. Para ello, se realiza además una revisión y comparación de los métodos propuestos por las diferentes escuelas taxonómicas.

Y ya por último, se revisan las aportaciones de las metodologías moleculares sobre el origen y las relaciones filogenéticas en la especie Canis familiaris.

En el plano experimental, se analizan las relaciones existentes entre las razas caninas españolas, bajo dos puntos de vista: el morfológico y el genético (enzimático y proteico).

Para el análisis morfológico, se construyen las matrices de semejanzas morfológicas, a partir de un total de treinta y dos caracteres, obtenidos del estudio de los diferentes estándares raciales de las razas.

En cuanto al análisis bioquímico, se procede a la recogida de muestras sanguíneas, mientras que de forma paralela se van poniendo a punto las distintas técnicas electroforéticas utilizadas. Con ello se obtienen los valores de las frecuencias génicas para un total de veintiún loci génicos analizados.

Los datos morfológicos y bioquímicos obtenidos, se procesan y analizan, obteniéndose los resultados que nos permitirán estudiar la estructura poblacional de las razas, el nivel de variabilidad genética existente, cuantificar el grado de diferenciación morfológico y enzimático entre las

poblaciones e inferir las posibles relaciones filogenéticas entre las razas, así como realizar estimaciones sobre los tiempos de divergencia evolutiva.

Finalmente, debemos recordar que este estudio es una continuación de la línea de trabajo, sobre marcadores genéticos en las razas españolas de las diferentes especies de animales domésticos, iniciada en distintas universidades españolas. Citando sólo algunos ejemplos, destacar los trabajos en la especie ovina de Altarriba y Lamuela (1977), Vallejo y col. (1979), Rodero y col. (1982) y Ordás y San Primitivo (1986); en la especie caprina los de Tuñón y col. (1987, 1989); en la especie bovina los de Altarriba y col. (1977), Zarazaga y col. (1984) y los de González y col. (1987) y en los lepóridos los de Zaragoza (1984) y Arana (1985).

Los objetivos comentados se engloban bajo el título "Relaciones genéticas en cánidos españoles", trabajo que presentamos como Tesis para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1.- EL ORIGEN DEL PERRO

El orden "Carnívora" se subdividió al final del Eoceno y principios del Oligoceno, hace aproximadamente 35 millones de años, en dos superfamilias, la Canoidea y la Feloidea (Stains, 1975; Gittleman, 1986). La superfamilia Canoidea comprende las familias Canidae, Procyonidae, Ursidae y Mustelidae; por su parte, la Feloidea está integrada por las familias Viverridae, Hyaenidae y Felidae.

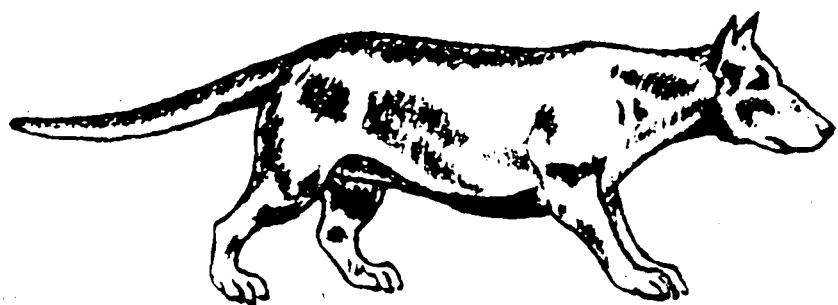
Los cánidos aparecieron en el hemisferio Norte durante el Eoceno superior y principios del Oligoceno. A ambos lados del océano Atlántico vivían dos animales muy próximos: *Cynodictis* en Europa y *Pseudocynodictis* en América del Norte. Según Boivin y col. (1983), la forma europea desaparece en el curso del Oligoceno ante la competencia de Ursidos más evolucionados, pero la especie americana sobrevive. Despues del *Pseudocynodictis* aparece el *Mesocyon*, cuyo esqueleto se parece ya más al del lobo. Según Olsen y Olsen (1977) y Boivin y col., (1983) le sucedió el *Cynodesmus* (Mioceno inferior), a su vez antepasado del *Tomarctus* (Figura II.1), conocido en el Mioceno medio y superior, y de acuerdo con Matthew, (1930) los miembros de la subfamilia Caninae se desarrollaron a partir de esas formas.

A principios del Plioceno aparece el género *Canis*, que inicia su migración a Eurasia a través del estrecho de Bering, todavía no invadido por las aguas. De su más antiguo representante en el Viejo Continente, el *Canis cipio*, se han encontrado restos en el yacimiento de Concud (Teruel), con una antigüedad estimada de seis millones de años (Boivin y col., 1983).

Figura II.1.- *Cynodictis* y *Tomarctus*, antecesores de los cánidos.



CYNODICTIS



TOMARCTUS

Actualmente se acepta que el perro (Canis familiaris) desciende de un único antecesor, el lobo, y algunos autores lo designan con el nombre de Canis lupus forma familiaris. La justificación de esta asunción está basada en estudios comparativos sobre morfología dental (Olsen y Olsen, 1977) y, de manera más importante, en estudios comparativos de conducta (Banks, 1967; Scott, 1968; Fox, 1971; Hall y Sharp, 1978). A esta misma conclusión se ha llegado mediante estudios comparativos de morfología craneal entre cánidos domésticos y salvajes (Clutton-Brock, 1976; Wayne, 1986).

En el Pleistoceno Inferior, hace unos 2 millones de años, se desarrolló un lobo primitivo (Canis etruscus) que podría ser el antecesor de varias de las especies todavía existentes, entre ellas el lobo actual (Canis lupus) (Robinson, 1984).

Se cree que el chacal se emancipó del lobo ya en el Plioceno, por lo que la divergencia de estos animales es muy antigua y de suficiente duración para que aparezcan como especies bien definidas. En África se encuentran todas las especies de chacales, a excepción del chacal común o dorado (Canis aureus) que además se halla en Arabia y la India. Se puede sugerir la posibilidad de que el chacal de África se separara de la rama principal evolutiva del lobo por la cuenca mediterránea y se adaptara al clima cálido (Robinson, 1984).

En lo que respecta al coyote, para Hall (1978) podría ser el resultado de una evolución a partir del lobo ocurrida hace aproximadamente 500.000 años. Este autor considera que el coyote proviene de los lobos que tuvieron que adaptarse a climas más cálidos después de la época glacial y se transformaron en una población independiente de la integrada por los individuos primitivos.

Según Clutton-Brock (1984), la asociación entre el hombre cazador y los lobos podría haber tenido lugar hace unos 40.000 años con la aparición del Homo sapiens. Es improbable que el hombre y el lobo cooperaran en la caza durante el bajo Pleistoceno, pero se puede suponer que ocasionalmente algunos cachorros de lobos fueran tomados por mujeres y niños que los alimentaban y jugaban con ellos. La domesticación comportó una serie de cambios morfológicos -observables en los fragmentos de huesos y dientes encontrados en excavaciones arqueológicas-, así como la disminución del tamaño de los individuos.

Fue al final del Pleistoceno, con la mejora de las condiciones climáticas, hace ahora unos 14.000 años, cuando se produjo la disminución del tamaño de algunos grupos de mamíferos, importante en el caso de los carnívoros del oeste de Asia, según demuestran los hallazgos de restos fósiles.

Según Scott (1968), Olsen y Olsen (1977) y Robinson (1984), las pruebas más sólidas de la primitiva domesticación del perro datan del Pleistoceno Inferior, a partir de los hallazgos arqueológicos de criaturas similares al perro encontradas en zonas tan alejadas como la Cueva de Palegawra en Irak (12.000 años), en la Cueva del Jaguar de Idaho (10.400 años), en Star Carr, Inglaterra (9.500 años), en Ley del Diablo, Australia (8.000 años), en Monteburro, Australia (8.000 años), en Sian, China (6.800 años) y en Benton, Missouri (5.500 años). No obstante, el hallazgo más importante fue el de un esqueleto completo de un perro joven junto a un esqueleto humano en Ein Mallaha, en la llanura de Natufian, al norte de Israel. La edad aproximada de estos restos se calculó entre 10.000 y 12.000 años. Dichos hallazgos indican una estrecha relación entre hombre y animal (Davis y Valla, 1978).

Olsen y Olsen (1977), basándose en estudios comparativos de morfología dental, a partir de hallazgos arqueológicos, sugieren, tal como muestra la Figura II.2, que el pequeño lobo del oeste asiático Canis lupus arabs fue probablemente el antecesor de la mayoría de los perros Europeos y del sur de Asia, incluyendo el Dingo. El pequeño lobo chino Canis lupus chanco, sería el antecesor de los primitivos perros de China y Mongolia, mientras que los grandes lobos del norte, Canis lupus lycaon, serían los antecesores del llamado Perro de las Turberas o Canis familiaris palustris, antecesor de las razas esquimales de tipo Spitz: Samoyedo, Chow-Chow, Keeshond, Alaskan Malamute y Siberian Husky (Boivin y col., 1983).

Otros autores (Clark y col., 1975; Clutton-Brock, 1984) sugieren que el Dingo es el único descendiente directo del lobo de la India (Canis lupus pallipes) y la única "raza pura" de perro doméstico que existe en el mundo. El Dingo habita en Australia y durante cientos de años no sufrió introgresión de genes de ninguna otra raza del mundo, hasta la llegada de los primeros europeos con sus perros.

A partir de Canis lupus arabs aparecen cuatro nuevos tipos primitivos de perros (Figuras II.2 y II.3): Canis familiaris metris-optimae, antepasado de los perros de pastor; Canis familiaris inostranzewi, que se convertiría en el predecesor de los Molosos, procedentes del norte de la India; Canis familiaris intermedius, del que procederían los Bracos, y por último el tronco medio-oriental, el Canis familiaris leineri, que daría origen a los lebreles.

Finalmente, desde un punto de vista zoológico, podemos encuadrar la familia Canidae en una clasificación esquemática que se muestra en la Tabla II.1, haciendo una especial referencia al género Canis de la subfamilia Caninae (Stains, 1975; Clutton-Brock y col., 1976).

Figura II.2.- Esquema de la hipotética evolución de las razas caninas (*Canis familiaris*) a partir del lobo (*Canis lupus*)

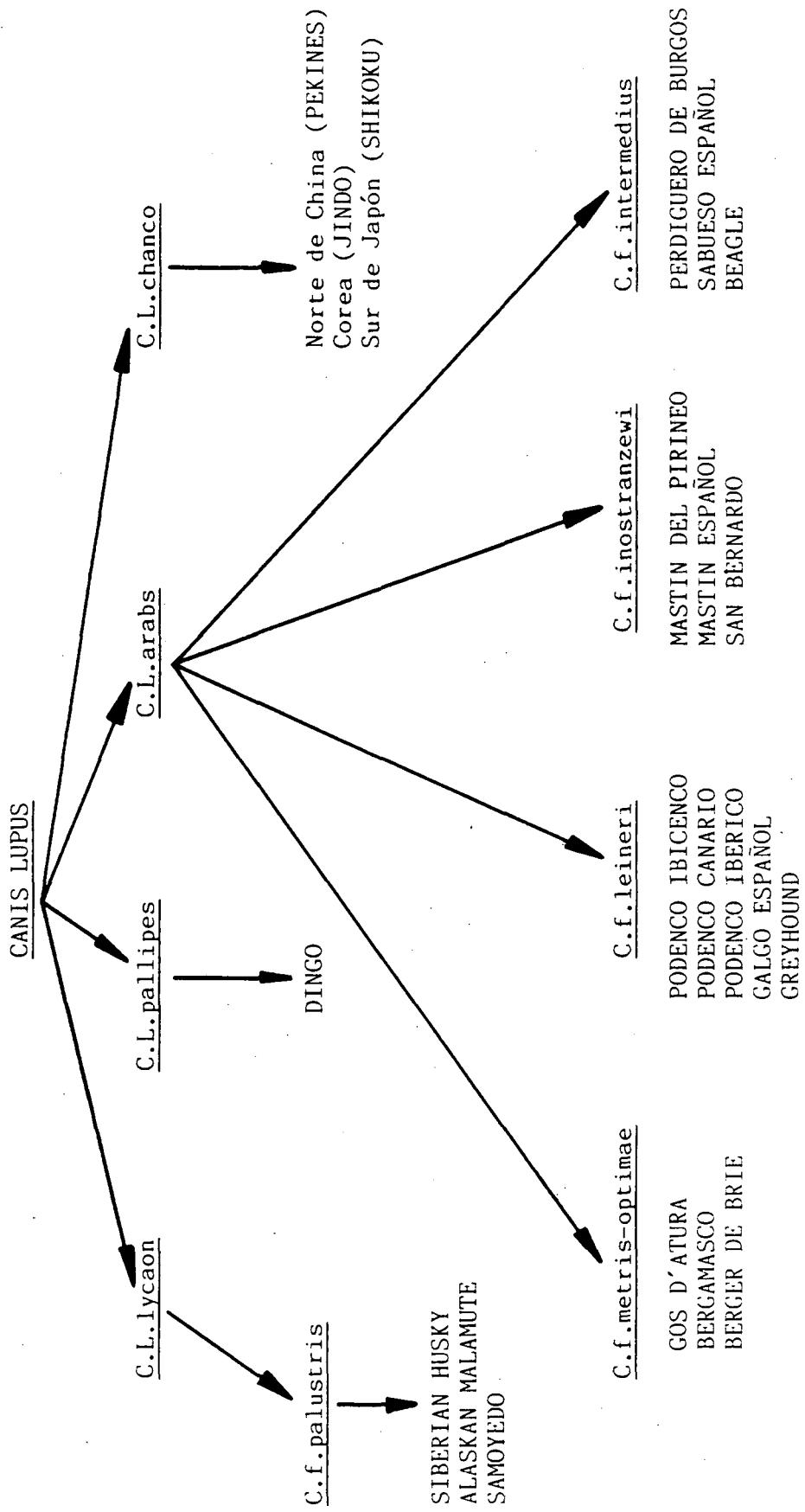
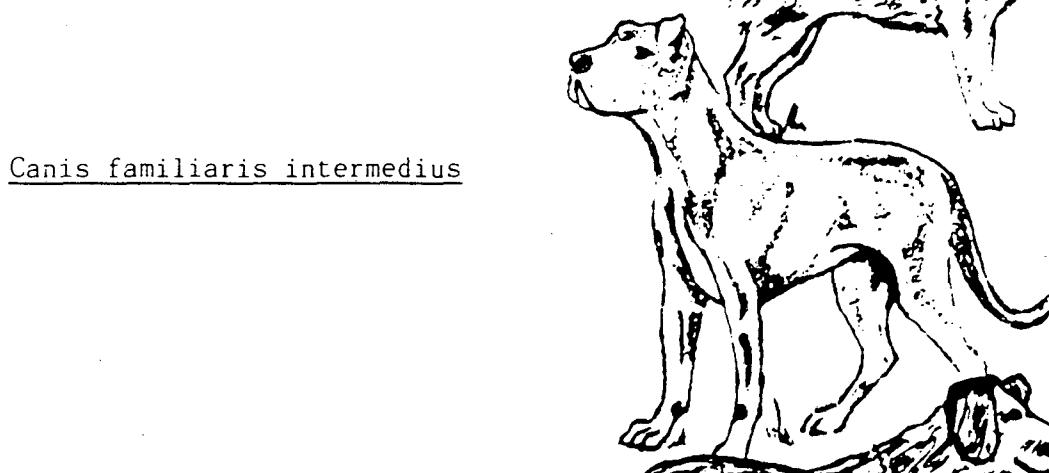


Figura II.3.- Principales troncos ancestrales del *Canis familiaris*.



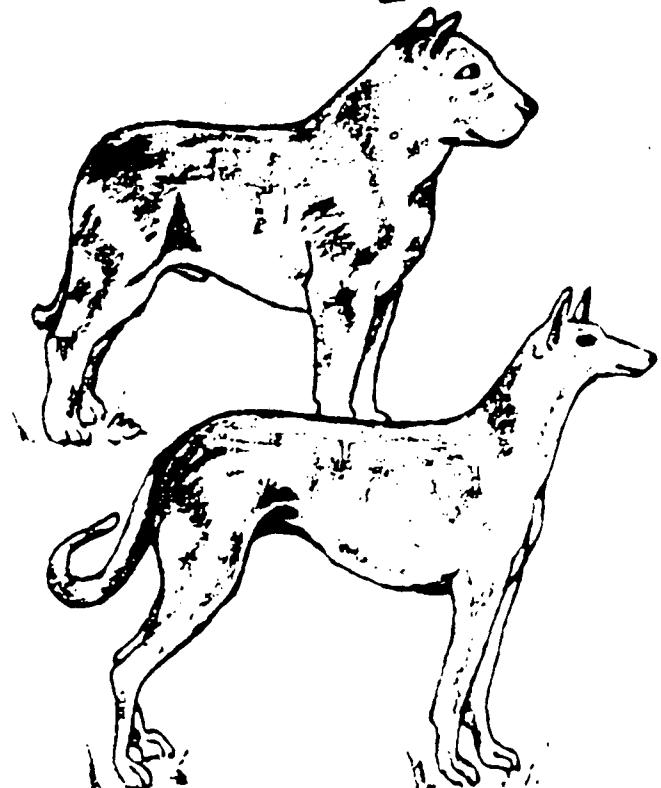
Canis familiaris palustris



Canis familiaris intermedius



Canis familiaris metris-optimae



Canis familiaris inostranzewi

Canis familiaris leineri

**Tabla II.1.- Clasificación esquemática de la familia
Canidae, con especial referencia al género
Canis de la subfamilia Caninae (Clutton-Brock
y col., 1976).**

ORDEN: Carnivora

SUBORDEN: Arctoidea

SUPERFAMILIA: Canoidea

FAMILIA: Canidae

A). SUBFAMILIA: Caninae

GENERO:

1. *Canis* 1. *C.lupus* (Lobo)
2. *C.rufus* = *C.niger* (Lobo rojo)
3. *C.familiaris* (Perro doméstico)
4. *C.latrans* (Coyote)
5. *C.aureus* (Chacal áureo)
6. *C.mesomelas* (Chacal de espalda negra)
7. *C.adustus* (Chacal de flanco rayado)
8. *C.simensis* (Chacal de Etiopía)
2. *Alopex lagopus*
3. *Vulpes*
4. *Fennecus zerda*
5. *Urocyon*
6. *Nyctereutes procyonoides*
7. *Dusicyon*
8. *Cerdacyon thous*
9. *Atelocynus microtis*
10. *Chrysocyon brachyurus*
11. *Dasycyon hagenbecki*

B). SUBFAMILIA: Simocyoninae

GENERO:

1. *Speothos venaticus*
2. *Cuon alpinus*
3. *Lycaon pictus*

C). SUBFAMILIA: Otocyoninae

GENERO:

1. *Otocyon megalotis*

II.2.- LA CLASIFICACION DE LAS RAZAS CANINAS

Las evidencias arqueológicas indican que las poblaciones locales de perros prehistóricos diferían unas de otras y que existían clases separadas hace ya unos 5.000 años (Villemont y col., 1970).

En los libros de canicultura, se encuentran frecuentemente árboles genealógicos en los que figuran la mayoría de las razas y que pretenden justificar su filiación. Estos árboles difieren considerablemente porque no se dispone de documentos arqueológicos o históricos suficientes que permitan reconstruir la diversificación del perro desde sus orígenes (Scott, 1968; Villemont y col., 1970; Guerin, 1980).

Como hemos comentado, los arqueólogos han encontrado en diferentes partes del mundo cráneos de los perros primitivos, que han descrito dándoles una denominación latina, y se ha admitido que estos cráneos eran representativos de un solo tipo de perro existente en una zona y época determinadas. Comparando estos cráneos con los de los perros actuales, se han concebido las grandes líneas de la filiación de estas razas.

Algunos investigadores (Zeuner, 1963; Fiennes y Fiennes, 1968) han otorgado una gran importancia a las variaciones de tamaño y conformación de las diferentes razas, pero es mejor ser prudente al hacer inferencias acerca de las ascendencias de estos animales. Las diferencias simplemente sugieren que el lobo debía tener una considerable variabilidad genética que el hombre supo explotar (Robinson, 1984). Y como señala Peters (1969) "los documentos recopilados con anterioridad a la mitad del siglo XIX son tan incompletos e inexactos que cualquiera puede demostrar lo que quiera respecto a la ascendencia de una determinada raza".

También son muy ilustrativas las palabras de Orozco (1985) en cuanto al concepto de raza en los animales domésticos, que literalmente escribe:

"Nadie puede impedirle a un ganadero, a un técnico, a cualquier persona que tenga acceso a un conjunto de animales, a definir una población concreta como raza. Si para ello se basa en unas características determinadas, objetivas, uniformes y distintas a las de otras poblaciones, puede hablar, si quiere, de una nueva raza. La raza es simplemente estar de acuerdo con unas características concretas y muy exigentes: perfección en color, tipo, porte, medidas de diferentes partes del cuerpo bien determinadas, etc. Y si la raza está definida así, no hay ninguna objeción que hacer".

Esta afirmación adquiere una gran importancia en el caso de las razas caninas. Aquí, los patrones o prototipos para incluir un animal en determinada raza son muy estrictos, basándose en múltiples valoraciones morfológicas, cuantitativas y cualitativas, que deberán estar comprendidas entre ciertos límites. Si los calificadores consideran que un animal no cumple los requisitos debidos, nadie duda de que ese animal no pertenece a la raza. Según Orozco (1985), las características que habitualmente definen una raza son primordialmente morfológicas. La raza, consciente o inconscientemente, ha sido hecha por el hombre, aunque con la intervención del medio actuando a través de la selección natural.

Este concepto de raza "zootécnica", tendríamos que comprobar si se corresponde con el concepto de raza "genética", que Rieger y col. (1982) definen como:

"Una categoría intraespecífica, primariamente, una población o agregado de poblaciones, con frecuencias génicas o estructura cromosómica características, que distinguen a un grupo de individuos particular de

otros grupos de la misma clase, dentro de una subespecie formalmente reconocible, o dentro de una especie".

La proliferación de razas caninas es una tendencia moderna motivada, entre otras cosas, por el deseo de poseer un perro único. No obstante, la razón principal es la considerable duración del periodo de selección racial y del abundante número de generaciones transcurridas. Durante este periodo el perro se diseminó por todo el mundo y se supeditó a dos influencias ineludibles: el medio ambiente y el hombre, que inició su domesticación con el fin de adaptarlo a distintas funciones.

Se desarrollaron varios tipos de perros ovejeros, ya que la cría de ovejas era una ocupación básica en Eurasia, y los pastores necesitaban animales inteligentes que mantuvieran unido el rebaño, que fueran dóciles y respondieran a sus órdenes. En cambio, las características de los perros guardianes debían ser robustez, aspecto feroz y actitud recelosa hacia los extraños. Pero también se necesitaba un tipo apto para la caza, con caracteres específicos. Estos debían ser ligeros de patas para poder correr más que sus presas, mientras que otros tenían por misión rastrear y levantar las presas o cobrar las piezas abatidas. Por último, hay que señalar una categoría general de perros caseros, algunos de los cuales alternan su carácter de guardianes con el de animales de compañía, mientras que otros son casi exclusivamente decorativos.

A pesar de la enorme dificultad que entraña reconstruir la filogenia de las más de 400 razas caninas actualmente reconocidas en el mundo, ha sido una labor continuada su clasificación sistemática dentro de grupos lo más afines posible y la investigación de las relaciones filogenéticas existentes entre ellas, aunque, como señala Scott (1968), la información aportada mediante indicaciones históricas o

inferida a partir de hallazgos arqueológicos, ha sido mínima para aclarar estas relaciones. Guerin (1980) comparte esta opinión cuando afirma que no se sabe casi nada sobre la estructura genética de las poblaciones y sus relaciones hasta finales del siglo pasado, y después, incluso si los documentos son abundantes, no nos permiten en general, apreciar ni jerarquizar los factores que han contribuido a la formación de las razas actuales.

La primera clasificación de perros de la que se posee información data de 1486 y se halla en "El Libro de St. Albans", atribuido a Juliana Barnes, priora del convento de Sopwell, Inglaterra (Peters, 1969). Pero es al final del siglo XIX, con la creación de los "Kennels Clubs" de Inglaterra y Norte América, cuando la clasificación sistemática de las diferentes razas caninas empieza a cobrar una mayor importancia. Estas organizaciones desarrollaron mejores clasificaciones, impusieron unos tipos, mantuvieron el registro y los libros genealógicos y dieron un reconocimiento "oficial" a las distintas razas.

Como señala Scott (1968), la clasificación de las razas refleja las culturas de los pueblos. En la Gran Bretaña, donde se enfatiza el deporte o la caza, el Kennel Club de Inglaterra -fundado en 1873-, reconoce dos grandes grupos de razas: los perros deportivos, que incluyen razas como los Greyhounds, Beagles, Terriers, Pointers, Setters, Retrievers y Spaniels, y los perros no deportivos, con razas como el Mastiff, San Bernardo, Dálmatas, Bulldog, Collie y Pug. En Francia se agrupaban también en perros cazadores, guardianes, de carreras, pastores y en perros de compañía. Las clasificaciones en Alemania se basaban en grupos de trabajo y en perros guardianes.

El "American Kennel Club" -fundado en 1884-, clasifica las razas caninas en seis grandes grupos, basados

principalmente en la función que realizan, más que en sus probables relaciones ancestrales, aunque en algunos casos los grupos incluyen razas que históricamente se sabe que están relacionadas.

Aunque muchos países siguen utilizando su propio sistema de clasificación, que se ha ido formando históricamente, se advierte más unidad en el continente europeo, ya que los organismos nacionales se han unido en un cuerpo coordinador, la "Fédération Cynologique Internationale" (FCI), a la cual se han asociado la mayor parte de los países europeos (excepto los anglosajones) y que tiene su sede en Thuin (Bélgica). La clasificación realizada por la FCI tiene en cuenta nociones de uso y morfología, y permite definir diez grupos bien establecidos:

1. Grupo Primero (Perros de pastor). En este grupo se incluye al Gos d'Atura, junto con el Pastor de Brie, Pastor Alemán, Bobtail, Komondor, Bergamasco y Cão da Serra d'Aires.

2. Grupo Segundo (Perros de guarda, defensa y utilidad). El Mastín Español, Mastín de los Pirineos y el Ca de Bestiar pertenecen a este grupo junto al Boxer, Rottweiler, Terranova, Fila Brasileño, San Bernardo y Mastiff, entre otros.

3. Grupo Tercero (Terriers). La mayoría de las razas (85%) son Británicas, como por ejemplo Airedale Terrier, Fox Terrier y Border Terrier. Otros representantes del mismo son el Terrier de Bohemia, Terrier Alemán y Australian Terrier.

4. Grupo Cuarto (Teckels). Razas de origen germano. Comprende por ejemplo, los Teckels de pelo liso, Teckels de pelo duro y Teckels Enanos de pelo duro.



5. Grupo Quinto (Perros de rastreo para caza mayor). Representantes del grupo son: Sabueso de Hannover, Bloodhound, Gran Azul de Gascuña y Poitevin.

6. Grupo Sexto (Perros de rastreo para caza menor). El Sabueso Español, Podenco Ibicenco y Podenco Canario pertenecen a este grupo. El Podenco Ibérico aunque no está reconocido por la FCI, se incluiría en el mismo. Otras razas que pertenecen al mismo son: Basset Hound, Grifón Azul de Gascuña, Beagle, Sabueso Suizo y Cirneco del Etna.

7. Grupo Séptimo (Perros de muestra, excepto razas británicas). En este grupo se incluye al Perdiguero de Burgos junto al Braco Alemán, Braco Italiano, Perdigueiro Portugués y Epagneul Bretón, entre otros.

8. Grupo Octavo (Perros de muestra británicos). Comprende el Pointer, Setter Inglés, Setter Irlandés, Golden Retriever, Cocker Spaniel, Cocker Americano.

9. Grupo Noveno (Perros de compañía). Existe una gran variedad de razas dentro de este grupo, como por ejemplo Chow-Chow, Pekinés, Dálmata, Yorkshire Terrier y Caniche.

10. Grupo Décimo (Galgos). Además del Galgo Español este grupo lo integran el Greyhound, Saluki, Afghanhound, Borzoi, Sloughi.

II.3.- LAS RAZAS CANINAS ESPAÑOLAS. ORIGEN Y CLASIFICACION

Hemos centrado nuestro estudio en nueve razas reconocidas por la Federación Cinológica Internacional (FCI) a saber: Gos d'Atura, Mastín del Pirineo, Mastín Español, Perdiguero de Burgos, Galgo Español, Sabueso Español, Ca de Bestiar, Podenco Ibicenco y Podenco Canario y otra, no reconocida aún, como es el Podenco Ibérico (Figura II.4). La localización geográfica, por antonomasia, de dichas razas se muestra en la Figura II.5.

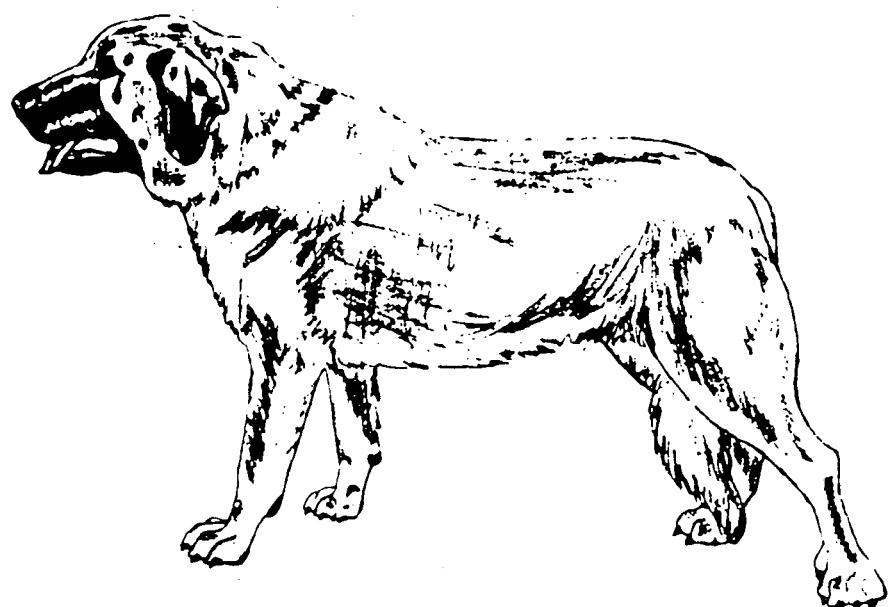
A continuación, vamos a pasar a comentar cada una de las razas, para lo cual hemos realizado una recopilación bibliográfica de todas las posibles hipótesis sobre el origen de las mismas. Para incluirlas en sus grupos correspondientes, nos hemos basado en las normas dadas por la FCI y en las clasificaciones hechas por Villemont y col. (1970), Tanabe y col. (1974) y Boivin y col. (1983).

A) .GRUPO PRIMERO (Perros de Pastor). GOS D'ATURA (Perro de Pastor Catalán) Descendiente del tronco del Canis familiaris metris-optimae.

A.1. Gos d'Atura: Diversos autores coinciden en que fueron las invasiones asiáticas las que introdujeron, partiendo del Mastín del Tibet, los perros que dieron origen a las diversas razas de pastor, tanto los tipos de conducción como los de defensa (mastines). Así, Schneider-Leyer (1965) considera que el Gos d'Atura desciende de los antiguos perros españoles de tipo molosoide. Mansencal (1985) no es de la misma opinión, y considera que todos los perros pastores de pequeña talla de Europa -y entre ellos el Gos d'Atura- , descienden del Terrier Tibetano, que a través de las invasiones asiáticas llegó a Europa.

Figura II.4.- Las razas caninas españolas

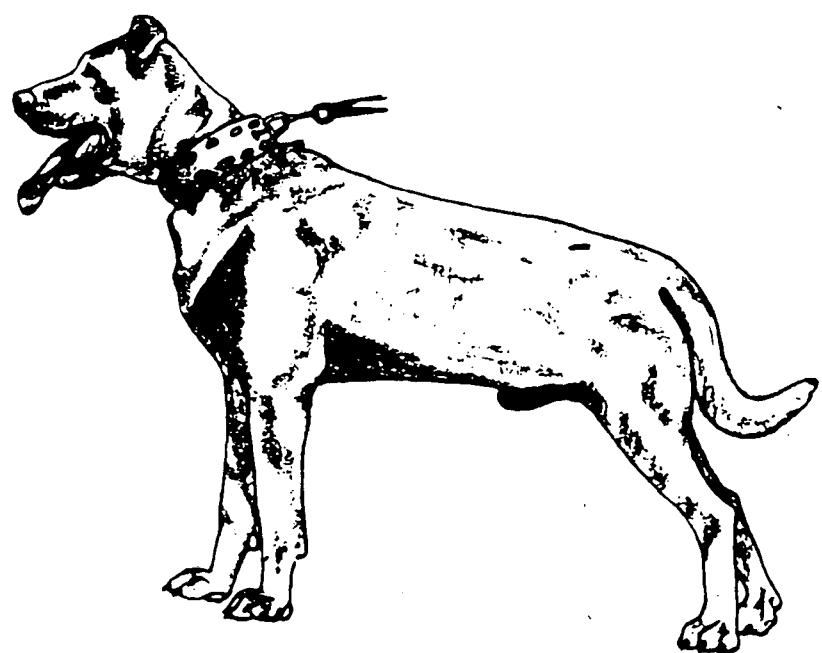
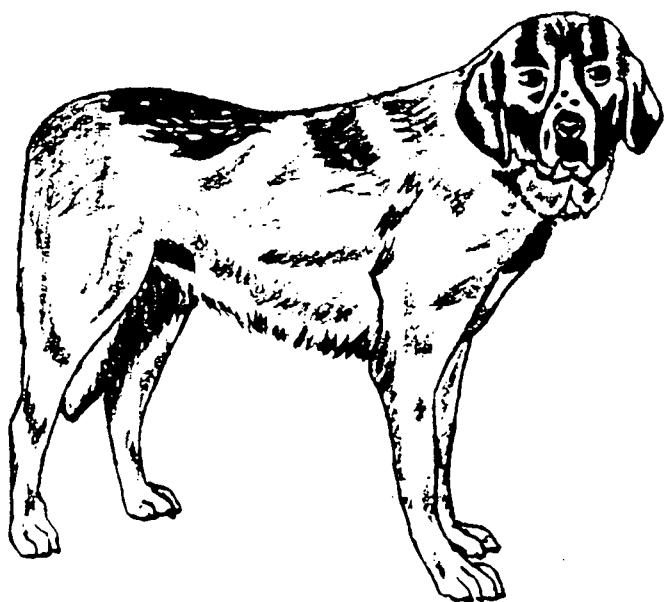
GOS D'ATURA



MASTIN ESPAÑOL

Figura II.4.- Continuación

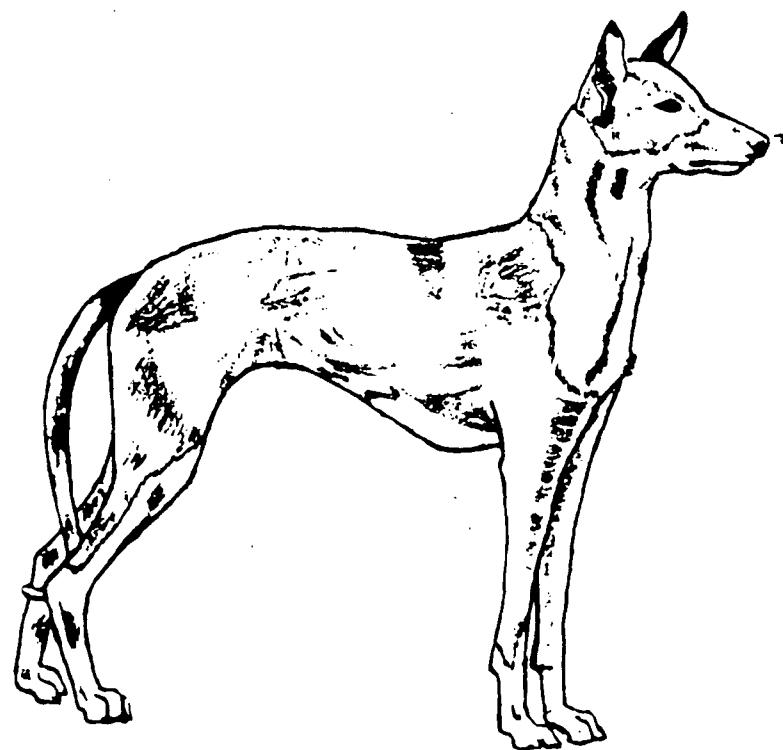
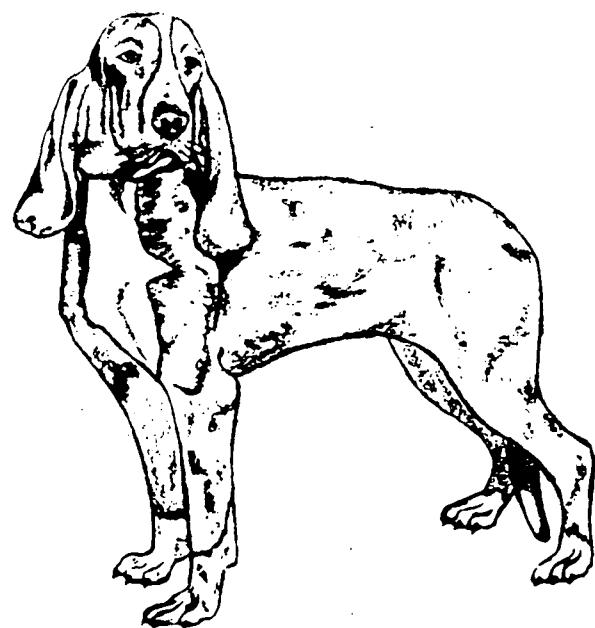
MASTIN DE LOS PIRINEOS



CA DE BESTIAR

Figura II.4.- Continuación

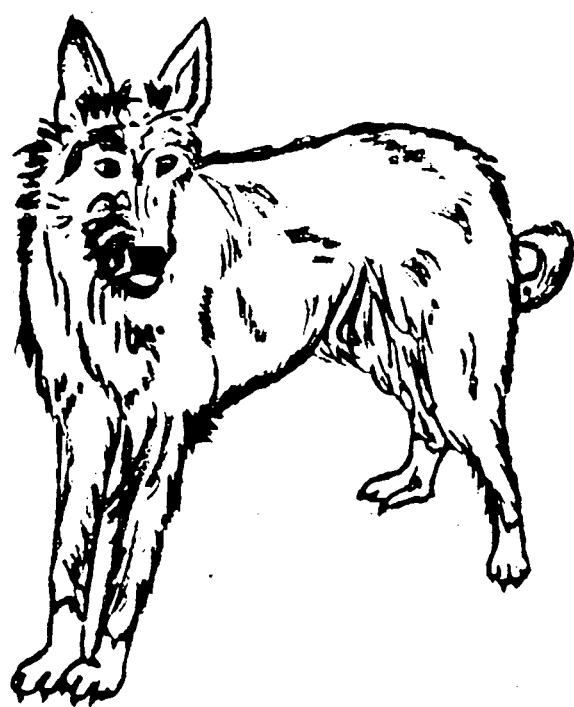
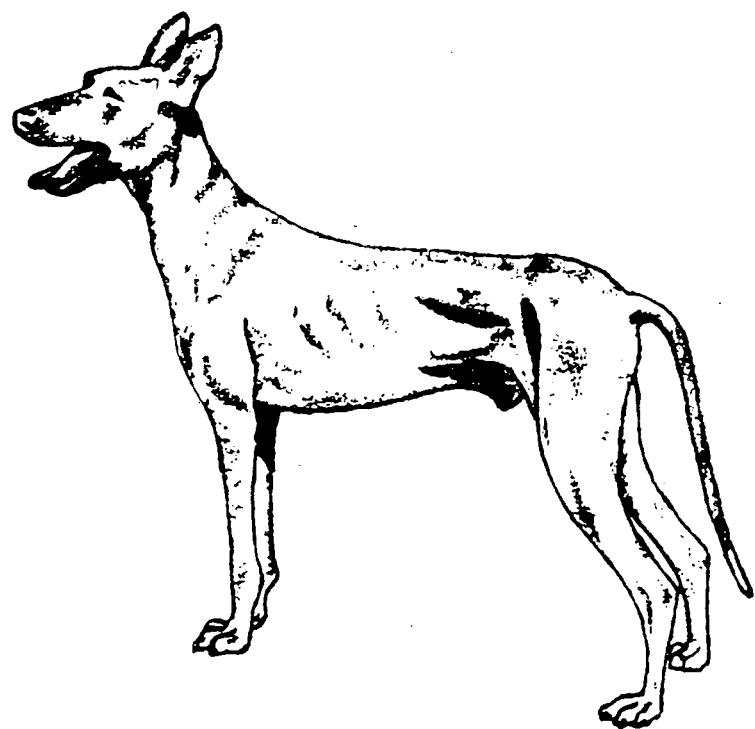
SABUESO ESPAÑOL



PODENCO IBICENCO

Figura II.4.- Continuación

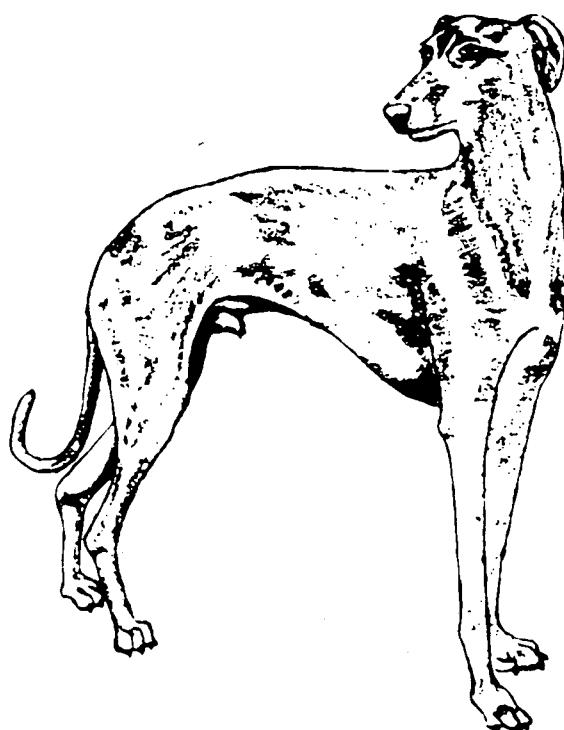
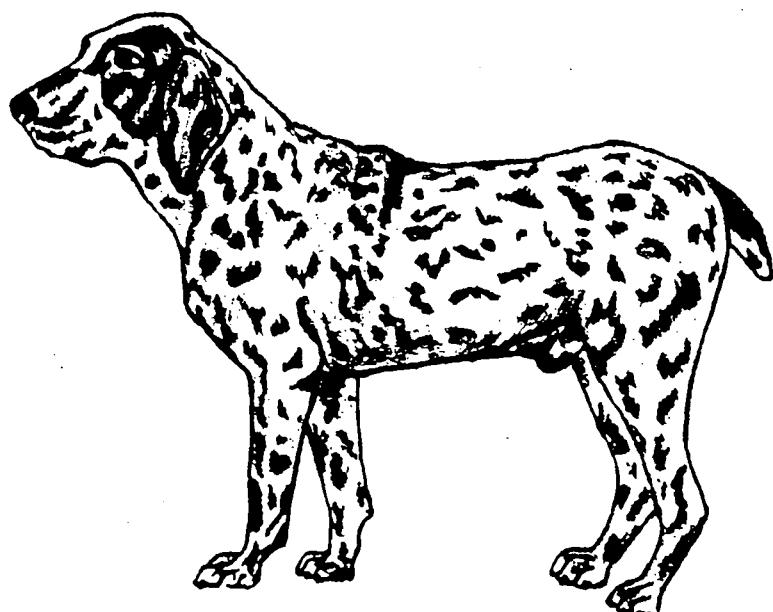
PODENCO CANARIO



PODENCO IBERICO

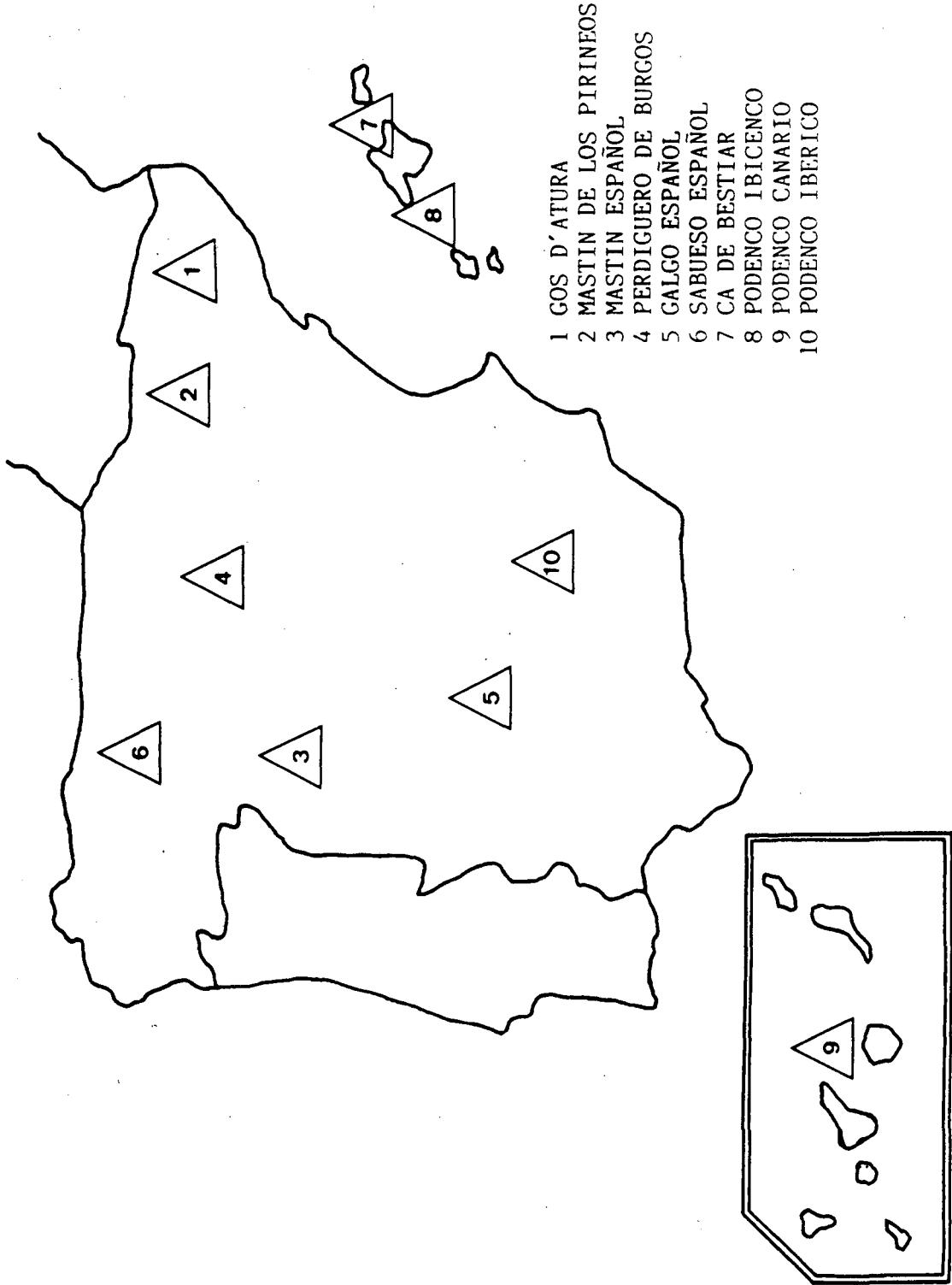
Figura II.4.- Continuación

PERDIGUERO DE BURGOS



GALGO ESPAÑOL

Figura II.5.- Localización geográfica de las razas caninas españolas



Otra hipótesis (Andreu, 1984) señala que fueron los romanos, quienes en sus campañas trajeron un antiguo perro de pastor, que podría ser el Bergamasco, el cual fue adaptándose a las diversas condiciones climáticas y de tipo de pastoreo, dando lugar a la diversidad de razas que hoy existen en Europa Central. Gómez-Toldrà (1985) y Delalix (1986) son de la misma opinión en cuanto al origen romano del Gos d'Atura, y sitúan el origen del Bergamasco en los perros pastores polacos, los cuales descenderían a su vez de los antiguos pastores orientales.

Villemont y col. (1970) afirman que los perros pastores de la vertiente francesa de los Pirineos, han contribuido a la formación del Gos d'Atura, en concreto el Pequeño Pastor de los Pirineos y el Labrit de las Landas, conocido éste en Euskadi como Euskal Artzai (Delalix, 1986).

El origen de la mayoría de perros dedicados al pastoreo, podríamos situarlo en los "Perros de pastor de pelo largo centroeuropeos" de los que derivaron razas como el "Berger des Pyrénées" francés, el "Cão da Serra d'Aires" portugués o el "Bergamasco" italiano.

El Gos d'Atura se reconoció como una de las razas españolas en 1911, cuando se fundó la Real Sociedad Central de Fomento de las Razas Caninas en España (RSCFRCE). El primer estándar oficial de la raza se redactó en 1929, siendo posteriormente homologada por la FCI. Posteriormente en el año 1982 se legalizó el "Club del Gos d'Atura Català en España". Actualmente el mayor censo de la raza se halla en Catalunya.

B). GRUPO SEGUNDO (Perros de Guardia, Defensa y Utilidad). Comprende las razas MASTIN ESPAÑOL, MASTIN DE LOS PIRINEOS y CA DE BESTIAR. Descendientes del tronco del Canis familiaris inostranzewi, aunque la raza Ca de Bestiar por razones clasificadorias se la incluye dentro de este grupo.

ya que parece ser el resultado de cruces entre razas pertenecientes a diferentes troncos. Son razas integradas en los "molosos ortognatos" que al igual que el Mastiff Inglés, San Bernardo y Mastín Napolitano, entre otros, parecen descender del legendario Mastín del Tíbet, originario del Asia Central, a través de los Mastines asirios, según ciertos autores, y del Moloso griego según otros (Boivin y col., 1983).

B.1. Mastín Español: Llamado también Mastín de León, Mastín Extremeño o Mastín Manchego. Del año 400 a.C. data la estatua realizada por un autor desconocido, de un perro llamado "Molossus" que pertenecía a Olympias, hija de Pirro, rey de los Epirotas. Al parecer, el tipo de perro representado era común en Grecia, Asiria, Persia e incluso Egipto, dándosele actualmente el nombre de Moloso. A estos molosos se les supone, ser los antepasados directos de los mastines.

Se cree que el origen de los molosos y perros de montaña se centraría en las altiplanicies asiáticas, Mongolia y el Tíbet. Estos perros llegarían a España por dos vías: la centroeuropea (invasiones asiáticas) y la mediterránea (Esquiró, 1982). Sin embargo, el mismo autor propone la hipótesis de que los perros pastores de tipo molosoide pudieron aparecer simultáneamente en diversos puntos del globo terráqueo, y sugiere que uno de estos focos de aparición pudiera ser la Península Ibérica, que reúne unas condiciones idóneas de demanda y utilización para tales tipos de perros. En apoyo a su hipótesis, cita que antes de las invasiones asiáticas, que se suponen aportaron los molosos a Europa, existía ya un moloso centroeuropeo en el Neolítico, cuyos restos se encontraron en Suiza, y que era muy parecido al Mastín Español e incluso presentaba los dígitos dobles en las patas traseras.

Delalix (1986) apoya la hipótesis de que fueron los fenicios quienes introdujeron los mastines por el

Mediterráneo en España, posiblemente procedentes de Siria, de la India o del Asia Menor. Casi paralelamente habría otro desplazamiento de molosos por el interior de Europa, de los cuales provendrían, el Kuvasz, el Montaña de los Pirineos, y posteriormente, el Terranova. Esta corriente tendría posteriormente una leve influencia en la formación del Mastín de los Pirineos, influencia que según Esquiró (1982) y Delalix (1986) no ha sufrido el Mastín Español, al que consideran uno de los descendientes más puros del Mastín Tibetano, debido a encontrarse sometido a un estricto sistema rural y estar naturalmente aislado por su entorno.

Actualmente, el censo más elevado de dicha raza se centra en las zonas de León, Extremadura y La Mancha. En 1946 se redactó el primer estándar y en 1981 se fundó la Asociación Española del Perro Mastín Español.

B.2. Mastín del Pirineo: A veces llamado Mastín Navarro o Mostin d'Aragón, tiene los mismos orígenes que el Mastín Español, aunque ya desde tiempos se centró exclusivamente en la franja pirenaica que va desde el Valle del Roncal (Navarra) hasta el Valle de Arán (Catalunya), si bien su hábitat por antonomasia fue el Alto Aragón. La transhumancia de esta zona era de cortos recorridos e independiente del área de trabajo de los mastines españoles, con los que comparte, probablemente, un origen común, así como con otras razas continentales, especialmente con el "Montaña de los Pirineos", raza francesa de características y estándar diferentes y con el que a menudo se le ha venido confundiendo. Según Malo (1982), el aporte de sangre procedente de los molosos centroeuropeos ha tenido influencia en el devenir del Mastín de los Pirineos, no alcanzando en cambio a los mastines de la meseta.

El primer estándar oficial de la raza se aprobó en 1946, fundándose el Club del Mastín de los Pirineos en 1977.

B.3. Ca de Bestiar: Llamado también Perro de Pastor Mallorquín y Ca Garriguer. La Federación Cinológica Internacional los incluye en el Grupo Segundo, dentro de las razas molosoides, junto con el Boxer y Dogo entre otros.

Según Guasp (1982), los perros pastores nativos de las islas se mezclaron fortuitamente con los ibicencos, con perros de muestra y con mastines, dando como resultado la raza que hoy en día llamamos Ca de Bestiar. De la misma opinión son Sotillo y Serrano (1985), pues afirman que su origen parece estar en el cruce de perros mastines con Podenco Ibicenco. Según Delalix (1986) el Ca de Bestiar sería fruto del cruce entre el Podenco Ibicenco, el Ca Mé (perdiguero mallorquín) y perros mastines. Esta misma autora cita a Julián V. Lacoma, ex-secretario de la Sociedad Canina de Mallorca e Ibiza, el cual opina que el Ca de Bestiar provendría de perros de caza castellanos que, llegados a las islas, se habrían cruzado con canes autóctonos.

Ruiz Rodríguez, citado por Gómez-Toldrà (1985), considera al Ca de Bestiar descendiente directo de los perros de guerra de los egipcios. Niega que sea una mezcla de varias razas, pues ya se utilizaba como tal en el siglo XVI, y añade que en el salón de actos del Ayuntamiento de Lluchmayor se puede observar un cuadro de la entrega de las llaves de la ciudad a Jaime I, donde aparece el Ca de Bestiar.

En 1980 se aprobó su estándar racial por la RSCFRCE y se legalizó el Club Español del Ca de Bestiar, el cual ya venía funcionando en el seno de la Sociedad Canina de Mallorca e Ibiza, como "Comisión Club del Ca de Bestiar" fundada en 1972. La distribución de esta raza está muy restringida al archipiélago balear.

C). GRUPO SEXTO (Perros de rastreo para caza menor). Dentro de este grupo tenemos las siguientes razas: SABUESO ESPAÑOL, descendiente del tronco del Canis familiaris intermedius, PODENCO IBICENCO, PODENCO CANARIO y PODENCO IBERICO, los cuales pertenecen a la rama del Canis familiaris leineri.

C.1. Sabueso Español: El libro "La Caza", del filósofo y militar griego Jenofonte, es quizás el más antiguo tratado sobre sabuesos que conocemos. Los historiadores romanos Plinio y Salustio también citan los Canis sebugii y son numerosas las porcelanas y pinturas romanas donde se plasman cazador y perro sabueso. El rey Alfonso XI (s. XIV) hizo una descripción morfológica del Sabueso Español en el "Libro de Montería".

Según Pugnetti (1981), la raza fue introducida en España por los fenicios, donde se desarrolló y modificó lentamente. Miján (1982) hace referencia a la antigüedad de la raza, opinando que existe desde hace siglos y llegando a pensar incluso que quizá sea el progenitor de todas las razas de Sabuesos conocidas.

Más probable parece la hipótesis que asigna a los sabuesos un origen céltico (Villemont y col., 1970; Gondrexon y Browne, 1982; Boivin y col., 1983; Gómez-Toldrà, 1985). La mayor parte de razas sabueseras europeas parecen descender del Saint Hubert, actual raza belga, descendiente directo, según Villemont y col., (1970) y Boivin y col., (1983), del Segusius de los celtas y los galos de que habla el historiador griego Arriano de Nicomedia en sus "Cinegéticas".

En nuestros días escasean los buenos ejemplares, ya que las líneas se han reducido y las razas extranjeras -Basset, Saint Hubert, Sabuesos de pelo duro franceses y Azules de

Gascuña- han mestizado en gran parte la población autóctona (Sanz Timón, 1982a; Delalix, 1986).

Después de la deforestación de nuestros montes durante los siglos XVII al XIX, su utilización ha quedado relegada, principalmente, a la España húmeda (Asturias y Cantabria).

C.2. Podenco Ibicenco: Conocido también como Ca Eivissenc, Xarnelo, Lebrel de Mallorca, Mallorquí o Charneque.

Generalmente se acepta que el Podenco Ibicenco descendiente del Perro de los Faraones (Villemont y col., 1970; Mora, 1982; Gondrexon y Browne, 1982; Boivin y col., 1983; Gómez-Toldrà, 1985) y que fue llevado por los fenicios a Ibiza (Pugnetti, 1981; Maza, 1982; Delalix, 1986), aunque otras hipótesis señalan que su llegada se produjo mucho más tarde, con los musulmanes, al mismo tiempo que el Galgo (Villemont y col., 1970; Boivin y col., 1983).

Los perros dibujados en los papiros egipcios del British Museum de Londres, son idénticos en tamaño, cabeza, cuerpo y cola al Ibicenco. Sin embargo algunos perros de los jeroglíficos no presentan el típico color blanco y rojo del Podenco Ibicenco, sino negro: se trataría, según el parecer de expertos egiptólogos, del realce superior divino que querían darle a un ejemplar concreto, pintándolo de este color (Mora, 1982).

Existen tres variedades de Podenco Ibicenco: pelo liso, pelo duro y pelo largo. Abunda en las Islas Baleares, Catalunya, Levante, Rosellón y Provenza. El estandar se aprobó en 1981 y el club de la raza se constituyó el mismo año.

C.3. Podenco Canario: Ciertas hipótesis suponen que este perro de caza sería originario de Egipto, o bien, es posible, que fueran introducidos por frailes mallorquines que, obligados por el Vaticano, emigraron a estas islas (Anónimo, 1982).

Según Delalix (1986), el Podenco Canario es un perro de origen faraónico y fue llevado a las Islas Canarias, probablemente, por los fenicios, griegos, cartagineses o incluso por los mismos egipcios. Carlos Salas, citado por Delalix (1986), aventura la hipótesis de que los podencos no fueron importados por los fenicios, sino exportados por ellos hacia el Mediterráneo Oriental.

C.4. Podenco Ibérico: Se le conoce también con los nombres de Podenco Español, Podenco Andaluz, Podenco ibérico andaluz malagueño y Campanero.

Según Gómez-Toldrà (1985), el Podenco Ibérico llegó a Málaga por el Mediterráneo y a partir de aquí se extendió por toda la península. Posteriormente se debió cruzar con perros de gran envergadura -probablemente mastines ligeros- para llegar a adquirir un esqueleto algo más pesado.

Schneider-Leyer (1965) describe al Podenco Ibérico como un perro de 62 cm a la cruz, procedente de cruces del Podenco de la Campana con cruces de Podenco (Ibicenco ?) y Mastín. Giber-Buch (1970), citado por García y col. (1982), entiende por Podenco Ibérico un perro de 50 cm de altura, que procede de cruces entre perros baleares, perros pastores peninsulares y una gran variedad de cruces, por lo que presenta amplio número de capas, si bien predominan los colores blanco, rojo y leonado. Según Muñoz Seca (1970), el Podenco Ibérico es un producto reciente, conseguido mediante cruzamientos del Podenco Rondeño, autóctono andaluz, con Podenco Ibicenco. La misma opinión manifiesta García y col., (1982).

D). GRUPO SEPTIMO (Perros de muestra). PERDIGUERO DE BURGOS. Descendiente del tronco del Canis familiaris intermedius.

D.1. Perdiguero de Burgos: Esta raza se formó probablemente por apareamientos entre el Sabueso Español y los perros Pachones Navarros de pelo corto (Sanz Timón, 1982b; Boivin y col., 1983; Gómez-Toldrà, 1985; Delalix, 1986). Formado en los puntos de intersección de pachones y sabuesos, se conservó en un mayor grado de pureza en la zona burgalesa. Estos Pachones Navarros o también llamados Perros de Punta Ibéricos, son según Boivin y col. (1983) y Sotillo y Serrano (1985) los antecesores del actual Pointer inglés. Villemont y col. (1970) hacen descender al Pointer inglés del antiguo Braco español, que bien podrían ser los perros pachones a que hacemos referencia.

Es significativo que ningún autor haya descrito la raza del Perdiguero burgalés antes del siglo XVIII, lo que indicaría que aún no estaba bien consolidada, al menos con anterioridad a dicho siglo.

La primera descripción de la raza se la debemos a un oficial de la "Legión Güelfa", el Mayor Ludlow Beamish's, que combatió contra Napoleón en la Guerra de la Independencia Española, en su libro "The History of the King's German Legion". Las citas de este libro nos hacen pensar en la formación de la raza entre el año 1713 -Paz de Utrecht- y 1808 -Guerra de la Independencia Española- (Sanz Timón, 1982b).

Según Boivin y col. (1983) los soldados de la Legión Güelfa, compuesta por alemanes, austriacos y suizos, llevaron de regreso a sus tierras numerosos ejemplares de perros autóctonos que describían como "perros que se crían en España con el nombre de Perdigueros de Burgos". Los criadores alemanes seleccionaron el perro burgalés y crearon una raza

que acabaría imponiéndose en breve plazo: el Braco Alemán, con gran probabilidad, descendiente directo del Perdiguero de Burgos, con un aporte considerable de sangre de Pointer y, según Villemont y col. (1970), también de Bloodhound.

De amplia distribución por todo el Norte de España, desde Catalunya a Galicia, se consideró como raza autóctona pura en 1911, coincidiendo con la fundación de la RSCFRCE. En 1980 se funda la Asociación Española del Perro Perdiguero de Burgos.

E). GRUPO DECIMO (Galgos). GALGO ESPAÑOL. Perteneciente al tronco del Canis familiaris leineri.

E.1. Galgo Español: El origen de los Lebreles no está concretamente definido y su historia se remonta a miles de años atrás. La mayoría de investigadores y cinófilos le asignan su cuna de origen en el Medio Oriente; sin embargo, otros sitúan su nacimiento en los desiertos africanos (Delalix, 1986). Según Boivin y col. (1983), los primeros perros de Mesopotamia históricamente reconocidos fueron Lebreles, como prueban fragmentos de cerámica encontrados en una aldea del Kurdistán iraní que datan de seis mil años a.C. La abundancia de vestigios descubiertos de esta época (Neolítico) restan credibilidad a la hipótesis mantenida por algunos autores (Villemont y col., 1970) sobre el origen egipcio de los Lebreles. De Grecia tenemos los primeros documentos (Jenofonte) que lo citan en la caza de liebres.

Para algunos autores (Villemont y col., 1970; Sotillo y Serrano, 1985) el Greyhound y el Galgo son representantes del Sloughi árabe, llevado a Europa a través de España durante la invasión musulmana. Otra hipótesis (Boivin y col., 1983) sostiene que el Galgo fue traído a Europa Occidental por los antiguos celtas en la época en que éstos se instalaron en las Galias. Apoya esta hipótesis el nombre de la

raza, derivado al parecer de Canis gallicus (perro galo) o Gallicus Veltragus (lebrel galo), transformado en Gallico y más tarde por contracción en Galgo. La aparición del Galgo en España correspondería, pues, a las migraciones célticas hacia la Península Ibérica. Aunque el mismo autor señala un segundo aporte de sangre, que se debería al Sloughi, lebrel árabe introducido en España en el siglo IX por los musulmanes.

A pesar de su amplia distribución geográfica (Andalucía, Extremadura y Castilla, principalmente), la gran mayoría de estudiosos del Galgo señala el peligro de un posible declinar de la raza en provecho del cruce "Galgo-Greyhound", ya que la introducción de sangre de esta raza inglesa ha sido más o menos constante desde la década de 1930. El Club del Galgo se constituyó en 1980.

II.4.- VARIABILIDAD GENETICA DE LAS POBLACIONES

El gran número de razas caninas existentes en la actualidad es una consecuencia de la acción en el cambio evolutivo de las fuerzas de la Evolución: migración, mutación, selección y deriva genética. Pero para que la Evolución tenga lugar, es condición necesaria que exista variación genética. Si en una población todos los individuos son homocigotos para el mismo alelo de un determinado locus, la evolución no puede tener lugar en ese locus, ya que las frecuencias alélicas no pueden cambiar de generación en generación. Si en otra población existen dos alelos en ese locus, entonces pueden tener lugar cambios evolutivos: un alelo puede aumentar su frecuencia a expensas del otro.

La existencia de variación hereditaria en las poblaciones naturales fue el punto de partida de los argumentos de

Charles Darwin (1809 - 1882) sobre la evolución por un proceso de selección natural. Darwin consideraba que la variabilidad era la clave de la selección natural. No estaba convencido del concepto prevaleciente de la mezcla en la herencia, porque reduciría la variabilidad a la mitad en cada generación (Plomin y col., 1980). Argumentó que algunas variaciones hereditarias naturales, pueden ser más ventajosas que otras para la supervivencia y la reproducción de sus portadores.

El problema se plantea para explicar como se mantiene esta variabilidad en las poblaciones. El equilibrio entre mutación y selección explica satisfactoriamente la presencia de genes deletéreos a bajas frecuencias, con la consiguiente aparición de individuos raros o mutantes. No obstante, los genes de esta clase constituyen una parte pequeña de la variación encontrada en las poblaciones.

Hay muchos genes que causan variantes que no son raros ni de ninguna manera anormales y su presencia no puede explicarse fácilmente por el equilibrio entre mutación y selección. La existencia de estas diferencias causadas por genes en frecuencias intermedias se denomina polimorfismo.

El descubrimiento de la gran cantidad de polimorfismo existente en la naturaleza, -debido al espectacular desarrollo de la biología molecular y la aplicación de las técnicas electroforéticas en poblaciones genéticas- no resolvió el problema; al contrario, lo único que hizo fue trasladarlo del plano fenotípico al plano molecular, donde la evolución fue explicada contrastadamente en términos Darwinianos y no-Darwinianos (Nevo, 1983).

II.4.1.- TEORIAS SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LA VARIACION

Aunque los genéticos de poblaciones están de acuerdo en que la variabilidad genética dentro de una especie es omnipresente, discrepan sobre su causa evolutiva.

Los Neutralistas (Kimura, 1983) son herederos de la llamada Hipótesis Clásica (Muller, 1950). Esta hipótesis presupone que hay muy poca variación genética; es decir, que la gran mayoría de los loci poseen un alelo de tipo salvaje con una frecuencia muy cercana a 1, más unos pocos alelos deletéreos que aparecen por mutación y que son mantenidos a una frecuencia muy baja por la selección natural. La evolución tendría lugar debido a que ocasionalmente aparece por mutación un alelo beneficioso, el cual aumentaría gradualmente su frecuencia por selección natural, llegando a ser el nuevo alelo de tipo salvaje.

El descubrimiento de la existencia de apreciables niveles de variabilidad genética detectada por las técnicas electroforéticas durante los años sesenta (Lewontin y Hubby, 1966), planteó el problema del significado y mantenimiento de esa variabilidad.

En este contexto, los neutralistas afirman que la mayor parte de la variabilidad es selectivamente neutra y que se mantiene en una población mediante el aporte mutacional -que según Kimura (1983) es del orden de la sustitución de por lo menos una base nucleotídica por genoma, cada dos años en una línea evolutiva de mamíferos- y la eliminación al azar. En cada generación aparece cierto número de mutantes neutros que, con el tiempo, o se fijan en la población, o se pierden, contribuyendo a la variabilidad genética durante ese proceso, a través del polimorfismo. Es decir, el polimorfismo sólo es una fase de la evolución molecular.

Los Seleccionistas, son herederos de la llamada Hipótesis Equilibradora (Dobzhansky, 1955), la cual, en directa oposición a la hipótesis clásica, propugna que hay una gran cantidad de variación genética. Los individuos son heterocigóticos en una gran proporción de los loci y están satisfactoriamente adaptados a la mayoría de los ambientes encontrados por la población. La evolución se ve como un proceso de cambio gradual en las frecuencias y clases de alelos en muchos loci. Los mutantes deletéreos son eliminados o conservados a bajas frecuencias por la selección natural.

Como ya hemos comentado, se sabe ahora que las poblaciones naturales poseen mucha variación genética. Lo que no está del todo claro es que proporción de la variación morfológica se debe a variaciones genéticas y que proporción a efectos ambientales. El hecho de que la selección artificial tenga éxito, virtualmente siempre que se intenta, se tomó por los que propusieron el modelo equilibrado como demostración de que existe variación genética en las poblaciones, prácticamente en todos los caracteres del organismo.

La hipótesis equilibradora tiene que justificar el alto nivel de variación que da por supuesto en las poblaciones, por lo que los Seleccionistas proponen una variedad de mecanismos selectivos para explicar el mantenimiento del polimorfismo genético, que probablemente es la superioridad selectiva de los heterocigotos, pero sin excluir otros tipos de fuerzas estabilizadoras, tales como: la heterogeneidad ambiental o el polimorfismo transitorio (Lewontin, 1979; Falconer, 1981). En definitiva, los seleccionistas atribuyen un sentido adaptativo al polimorfismo molecular y consideran al azar como una fuerza secundaria en los procesos evolutivos.

¿Qué explicación existe para el hecho de que algunas proteínas sean más polimórficas que otras?. Se ha demostrado (Kimura, 1983; Nei, 1987) que existe una correlación significativa entre la variabilidad genética de las proteínas y el peso de sus subunidades moleculares. Según la teoría neutralista, ésto tiene fácil justificación: cuanto mayor sea el tamaño de una subunidad, más alta será su tasa de mutación. Esto puede interpretarse por el hecho de que una molécula grande tiene más lugares que ofrecer a una posible mutación, sin que por ello se vea afectada su función (Futuyma, 1986).

Por otra parte, los enzimas monoméricos son más polimórficos y presentan niveles de heterocigosidad más altos que los multiméricos, lo cual parece ser debido a que la precisa interacción entre subunidades requerida para formar tales enzimas incrementaría el grado de limitación funcional y reduciría, por tanto, la posibilidad de que una mutación fuera inocua, o neutra (Kimura, 1983; Nei, 1987).

En definitiva, los neutralistas consideran que las principales causas determinantes del polimorfismo protéico son la estructura y la función molecular, en contraposición con los seleccionistas, para los cuales las causas determinantes son las condiciones ambientales.

II.5.- LA MEDIDA DE LA VARIACION GENETICA

La variación genética es omnipresente en las poblaciones naturales y de animales domésticos, por lo que hay una amplia oportunidad para los cambios evolutivos. La medida e interpretación de esta variabilidad en razón de su origen, mantenimiento y significado evolutivo es esencial para

explicar y predecir los cambios en la composición genética de las poblaciones.

Semejanzas o diferencias en el tipo, cantidad y patrones de variación genética entre poblaciones, pueden ser el resultado de distintos factores. Por ejemplo, la similitud genética de dos poblaciones podría deberse a que la separación de las mismas ha sido reciente, a que existe migración entre ellas, a que son poblaciones muy grandes -con poca deriva genética- o que similares presiones de selección afectan a loci similares en ambas poblaciones.

Las poblaciones naturales y de animales domésticos exhiben una gran cantidad de variación, prácticamente respecto a cualquier carácter del fenotipo de los individuos. A esta variabilidad contribuyen en mayor o menor grado factores genéticos, ambientales o una combinación de ambos. Medir la variabilidad genética subyacente a la variabilidad fenotípica no es tarea fácil. Además, no podemos estudiar cada locus genético de un organismo porque ni siquiera conocemos cuantos hay, y porque sería una tarea enorme. La solución, entonces, es estudiar una muestra de individuos y genes a partir de la cual inferir la variabilidad genética de la población. Idealmente, esta muestra debe cumplir dos requisitos: a) ser representativa; los individuos y genes elegidos deben ser como media tan variables como los existentes en la población y todo el genoma, respectivamente; b) ser precisa; es decir, la metodología usada debe ser suficientemente sensible para detectar los distintos estados o alelos presentes en un locus determinado (Lewontin, 1979; Séger y Lucotte, 1981; Ayala y Kiger, 1984; Zapata, 1987). Con ello sabremos qué proporción de todos los loci génicos son polimórficos en una población dada y qué proporción de todos los loci génicos son heterocigotos en un individuo típico de la población.

Vamos en primer lugar a comentar escuetamente los métodos y técnicas más comunes usados para medir la divergencia genética.

II.5.1.- METODOS PARA LA MEDIDA DE LA VARIACION GENETICA

II.5.1.1.- METODOLOGIA MENDELIANA Y CUANTITATIVA

Son los métodos tradicionales con que cuenta la Genética para evaluar la variabilidad de las poblaciones. La existencia de un gen se averigua examinando la descendencia de cruzamientos entre individuos que muestran formas diferentes de un carácter dado. A partir de la proporción de individuos de las diversas clases, deducimos si están involucrados uno o más genes. Si el carácter es poligénico no podemos saber cuantos de ellos son variables así como tampoco conocer el número de alelos y la frecuencia que éstos alcanzan en cada locus. Además, como ya resulta obvio, sólo podemos detectar aquellos genes que son variables, dado que un carácter pone de manifiesto su base genética siempre que exista variabilidad segregando en el locus o loci implicados. No hay forma de obtener una muestra sin sesgo del genoma, porque los genes que no varían no pueden incluirse en la muestra.

II.5.1.2.- METODOLOGIA MOLECULAR

Un camino para salir de este dilema se hace posible con los descubrimientos de la Genética Molecular y las técnicas procedentes de la Bioquímica y la Biología Molecular, las cuales nos permiten comparar productos directos de la acción génica (proteínas) o el propio material genético (ácidos nucléicos) y además nos permiten cuantificar la divergencia en términos de sustitución de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

II.5.1.2.1.- Divergencia proteica

Los métodos más comunes para medir la divergencia proteica son la electroforesis, las reacciones inmunológicas y la secuenciación de proteínas.

II.5.1.2.1.1.- Electroforesis

La electroforesis permite el estudio de las variantes proteicas que difieren en su movilidad electroforética (electromorfos) para un sistema proteico determinado. Se sabe que la información genética codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN de un gen estructural se traduce en una secuencia de aminoácidos que forma un polipéptido. Cualquier alteración que se produzca en esa secuencia y que comporte cambios de aminoácidos se reflejará en variaciones en la estructura primaria del polipéptido codificado por el gen. El análisis de esas variantes será una medida indirecta de las variantes genéticas o alelos existentes en dicho locus. De la variabilidad protéica se infiere la variabilidad genética.

II.5.1.2.1.2.- Técnicas Inmunológicas

La Inmunología estudia los anticuerpos que aparecen en el suero sanguíneo cuando se introduce una sustancia extraña llamada antígeno, en nuestro caso proteínas. Cuando se forman anticuerpos contra una proteína en particular, éstos se unen a dicha proteína formando un agregado o precipitado. Para cuantificar la intensidad de respuesta inmunológica se suele utilizar el método de la Fijación de Complemento. Goodman y col. (1971) demostraron que este método está de acuerdo con los resultados de secuenciación de aminoácidos y ha sido ampliamente utilizado en los estudios sobre primates. Una gran ventaja del método es que utiliza cantidades mínimas de proteína.

II.5.1.2.1.3.- Secuenciación de proteínas

Los aminoácidos son los elementos constituyentes de las proteínas, y la secuencia en la que éstos se unen para formar una proteína está codificada en los genes. Podemos, por lo tanto, comparar la secuencia de aminoácidos de proteínas similares de dos especies distintas para determinar su similitud genética.

II.5.1.2.2.- Divergencia de Ácidos Nucléicos

La posibilidad de poder analizar la variabilidad genética directamente a nivel de los nucleótidos, permite detectar todas las sustituciones de nucleótidos que supongan un reemplazamiento de los aminoácidos de la proteína. Se han desarrollado diversos métodos.

II.5.1.2.2.1.- Hibridación del ADN

Este método combina ADN de diferentes especies. Compara la temperatura a la que se desnaturaliza un ADN combinado de dos especies, con la temperatura a la que lo hace un ADN combinado de la misma especie. El método no puede usarse cuando se comparan especies estrechamente relacionadas porque no se produce una reducción apreciable de la estabilidad térmica o bien los errores asociados son grandes.

II.5.1.2.2.2.- Técnica de los enzimas de restricción

Utiliza enzimas bacterianos que reconocen y cortan determinadas secuencias características de ADN extraño (no bacteriano). Las endonucleasas del tipo II son las que presentan un mayor interés, ya que sólo originan los cortes dentro de la zona de reconocimiento. La familia de fragmentos que se obtiene al tratar un segmento de ADN o nucleón recibe el nombre de nucleomorfo (Nei y Tajima, 1981). Nucleón y nucleomorfo, serían los términos equivalentes a gen y alelo en la genética clásica. El conjunto de

fragmentos obtenido por un único enzima se detecta por electroforesis en gel, y cada fragmento migra a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Secuencias de ADN polimórficas darán lugar a distintas familias de bandas o distinto patrón electroforético cuando se someten a los mismos enzimas de restricción.

II.5.1.2.3.- Divergencia del ADN mitocondrial (ADNm_t)

El análisis de la divergencia del ADNm_t constituye una herramienta de gran valor en los estudios filogenéticos, porque se admite que se transmite intacto vía materna de una generación a otra, con lo cual proporciona una información evolutiva y poblacional muy superior a la del ADN nuclear (Fontdevila, 1987).

II.5.2.- LA CUANTIFICACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA

Existe una gran diversidad de estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Cada uno de ellos aprecia diferentes aspectos de la variabilidad y su utilidad estará en función del propósito del estudio.

Si lo que pretendemos es analizar las diferencias existentes entre poblaciones, la variabilidad detectada electroforéticamente, se convierte en un instrumento eficaz de comparación. Esto puede hacerse de diversas formas, pero se utilizan generalmente dos medidas de variación genética: la tasa de polimorfismo y la heterocigosidad.

Si el objetivo al comparar la diferenciación entre poblaciones es estimar los niveles de divergencia evolutiva entre ellas sobre la base de sus frecuencias génicas, resulta más indicado el uso de los índices de distancia genética, que permiten manejar razonablemente un elevado número de

poblaciones, establecer comparaciones y determinar sus relaciones filogenéticas.

II.5.2.1.- ESTADISTICOS EMPLEADOS

II.5.2.1.1.- Tasa de Polimorfismo (P)

La tasa de polimorfismo (P) es simplemente la proporción de loci polimórficos en el conjunto de loci estudiados. Para varias poblaciones la tasa media de polimorfismo (P) es simplemente la proporción media de P según estos diferentes grupos.

La cantidad de polimorfismo es una medida útil de variación para ciertos propósitos, pero tiene dos defectos: arbitrariedad e imprecisión.

Esta medida es relativamente arbitraria ya que un locus se considera polimórfico según el criterio que se adopte. Los dos criterios más frecuentemente usados son los de que un locus debe ser considerado polimórfico únicamente cuando el alelo más común tiene una frecuencia no superior a 0,95 -criterio del 95%- , o cuando posee una frecuencia no superior a 0,99 -criterio del 99%- . Si no se satisfacen las condiciones de polimorfismo, el locus se cataloga como monomórfico. El objetivo de limitar la definición de locus polimórfico al 95% o al 99% es caracterizar a aquellos loci que tienen una variabilidad que no se puede explicar meramente por mutación recurrente. Se obtienen diferentes valores cuando se usan diferentes criterios, con lo que los estudios realizados por los distintos autores no serán totalmente comparables.

El polimorfismo de una población es, además, una medida imprecisa de la variación genética. Esto se debe a que un locus ligeramente polimórfico cuenta tanto como uno muy

polimórfico. No tiene en cuenta la importancia de cada polimorfismo por separado. Otro problema asociado es que cuando el número de loci examinados es pequeño, la proporción de loci polimórficos está sujeta a un gran error de muestreo (Nei, 1987).

Debido a estos inconvenientes, el valor (P) no es una buena medida de la variación genética. Sin embargo, si se estudian un gran número de loci y un gran número de individuos por locus, da una medida importante de la variación génica existente en las poblaciones.

II.5.2.1.2.- Heterocigosidad (H)

Una mejor medida de variación genética (porque no es arbitraria y es precisa) es la "frecuencia promedio de individuos heterocigotos" por locus, o simplemente la heterocigosidad (H) de la población. Esta es una buena medida de la variación porque estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes.

Sin embargo la heterocigosidad observada (H_o) no refleja bien la cantidad de variación genética en poblaciones donde los apareamientos entre parientes son comunes. En estas poblaciones habrá más homocigotos que en otra población donde no ocurran, aún cuando las frecuencias alélicas sean idénticas en ambas poblaciones. Esta dificultad puede ser superada calculando la heterocigosidad esperada (H_e) a partir de las frecuencias alélicas, como si los individuos de la población se cruzaran entre sí al azar.

Si en un locus determinado hay " n " alelos con frecuencias p, q, r, \dots, n la frecuencia teórica de los heterocigotos será:

$$H = 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + \dots + n^2),$$

o lo que es igual

$$H = 1 - (\text{homocigosidad})$$

De forma general,

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

o también su equivalente,

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

Esta última forma se conoce también como "medida de diversidad génica" (Nei, 1977).

La heterocigosidad esperada (H_e) es un buen estimador de la variabilidad, dado que se aplica a cualquier especie independientemente de su sistema reproductivo o estructura genética. Ello permite comparar los niveles de variabilidad genética en todo el rango de los seres vivos (Zapata, 1987). En la mayoría de poblaciones no consanguíneas, la heterocigosidad observada se ajusta bastante a la heterocigosidad teórica (Hedrick, 1985).

Asimismo, podemos conocer la estructura genética para un locus determinado de una población, mediante el "Indice de fijación de Wright", F. (Wright, 1965), el cual nos dará una medida de la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg; se define como:

$$F = (H_e - H_o) / H_e$$

Un valor de (F) positivo o negativo indica un déficit o un exceso, respectivamente, de heterocigotos en la población con respecto a las proporciones Hardy-Weinberg.

El índice de fijación (F) puede ser positivo o negativo, dependiendo de los casos. Según Nei (1987) algunos factores importantes que causan valores de (F) distintos de cero son los siguientes:

Consanguinidad. La consanguinidad incrementa la frecuencia de homocigotos, y si no existen otros factores, el coeficiente de consanguinidad es igual a la F de Wright. En este caso (F) es siempre positiva.

Apareamientos clasificados. Los apareamientos se dan selectivamente entre individuos que tienen similares caracteres fenotípicos. Tiene un efecto similar al de la consanguinidad e incrementa la frecuencia de homocigotos. Pero a diferencia de aquélla, el efecto se limita sólo a los loci relacionados con el carácter.

Subdivisión de poblaciones. A veces es difícil conocer la estructura reproductiva de una población, y la población bajo estudio puede incluir diversas subpoblaciones. En este caso, incluso si cada subpoblación se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, las frecuencias genotípicas en la población global pueden desviarse de las proporciones esperadas, ya que la frecuencia de homocigotos en la población conjunta tiende a ser mayor que la esperada por las proporciones Hardy-Weinberg. A esta propiedad se la designa como Efecto Wahlund.

Selección. La selección, dependiendo del tipo, puede aumentar o disminuir el valor de (F). Si los heterocigotos tienen una menor aptitud o eficacia biológica que la de ambos homocigotos, el valor de (F) será positivo. Si por el contrario, los heterocigotos tienen una mayor aptitud que los homocigotos, el valor de (F) será negativo. Sin embargo, valores negativos de (F) no implican necesariamente una superioridad del heterocigoto.

Según Foltz y Hoogland (1983), también puede darse un exceso de heterocigotos en los siguientes casos:

- Cuando las frecuencias génicas de machos y hembras son distintas. Esto adquiere importancia en poblaciones de animales domésticos, donde el número de machos utilizados suele ser pequeño.
- Cuando existe migración entre las poblaciones.
- Cuando la selección actúa antes de que la descendencia sea censada o también debido a diferencias de fertilidad entre los padres.

II.5.2.1.3.- Tasa de alelismo (n.)

Este estadístico indica el número promedio de alelos existentes por locus en una población y se utiliza a menudo como una medida de la variabilidad genética (Nei, 1987).

Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos estudiados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de descubrir alelos suplementarios. El número de alelos por locus, es útil para estudiar la existencia de variabilidad críptica en los loci (Ayala, 1982a).

II.5.3.- LA ELECTROFORESIS COMO ESTIMADOR DE LA VARIABILIDAD

II.5.3.1.- CONCEPTO Y BASES DE LA ELECTROFORESIS

El término **electroforesis** fue sugerido por vez primera en el año 1909 por Michaelis para describir el movimiento de partículas coloidales en el seno de un campo eléctrico. El método se basa en el hecho de que moléculas tales como el ADN, ARN y las proteínas poseen una carga y por lo tanto son capaces de moverse cuando se colocan en un campo eléctrico.

Este método, permite la separación de proteínas en función de sus diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico a un pH determinado.

La tasa de migración de un ión sometido a la acción de un campo eléctrico es un vector suma de una fuerza motriz y un cierto número de fuerzas de resistencia.

Entre las primeras cabe citar a la carga de la molécula, que puede deberse a la ionización de sus grupos intrínsecos o bien puede inducirse mediante un pH adecuado de la solución tampón.

Las proteínas están compuestas por aminoácidos que poseen grupos ácidos (COO^-) y grupos básicos (NH_3^+), lo cual permite que se encuentren cargadas positivamente (predominan los grupos NH_3^+), negativamente (con predominio de los grupos COO^-) o bien que permanezcan neutras. Pero la carga neta de una proteína también depende de la solución tampón en la que se halle disuelta. Cuando elevamos el pH de la disolución (predominio de iones OH^-), los grupos NH_3^+ se van neutralizando progresivamente, por lo que se presenta un predominio de los grupos COO^- que se traduce en que la proteína se comporta como un anión. Si el pH es ácido sucede lo contrario.

Por otra parte, la fuerza que se ejerce sobre un ión es función lineal del potencial y asimismo del tiempo de aplicación cuando aquél se mantiene constante.

De entre las fuerzas que en algún grado obstaculizan el movimiento electroforético, cabe citar el tamaño y la forma de las moléculas y la viscosidad de la solución. Por una parte, concentraciones altas de electrolitos ayudan a mejorar la definición de las zonas, si bien disminuyen la migración de las mismas, migración que puede verse aumentada

también por el incremento de la temperatura del medio que se produce como consecuencia del paso de la corriente a su través.

Como ya hemos dicho, la electroforesis permite el estudio de las variantes proteicas que difieren en su movilidad electroforética (electromorfos) para un sistema proteico determinado. Comúnmente pueden tratarse de isoenzimas (Markert y Moller, 1959) o de aloenzimas (Prakash y col., 1969).

Los isoenzimas corresponden a las diversas formas moleculares que pueden existir de una proteína, con la misma especificidad enzimática aunque puedan pertenecer a distintos loci. El término aloenzima, hace referencia a las variantes proteicas producidas por alelos de un mismo locus. Proteínas codificadas por alelos distintos pueden producir electromorfos no diferenciados, pero en una primera aproximación se asume que cada electromorfo corresponde sólo a un alelo.

II.5.3.1.1.- Electroforesis en gel de almidón

En este método, a diferencia de los conocidos y utilizados hasta la fecha de su descubrimiento (Smithies, 1955), la velocidad de desplazamiento de las distintas fracciones proteicas no depende únicamente de las diferencias en su carga eléctrica, sino también de su tamaño y estructura molecular, ya que el propio gel interviene como un filtro que disminuye la velocidad de migración de las moléculas más voluminosas, permitiendo de esta forma la separación de proteínas con igual punto isoeléctrico pero de diferente tamaño molecular. Asimismo, la retención varía también con la concentración de almidón.

El gel de almidón ha sido el soporte más utilizado para el estudio de los enzimas. Se presta bien a todos los tipos de coloración y aunque su poder de resolución no es tan bueno como con la agarosa o la poliacrilamida, tiene la ventaja de ser fácilmente manejable, es un método relativamente barato y en contraposición a la poliacrilamida, no es tóxico.

II.5.3.1.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

El gel de poliacrilamida resulta de la polimerización en medio líquido de un monómero, la acrilamida, y de un comonómero la N,N' metilén - bis-acrilamida (bis-acrilamida), que sirve de agente reticulante. La polimerización debe realizarse en ausencia de oxígeno, siendo necesarios un agente oxidante, el persulfato amónico (APS), y un catalizador, la N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). Efectuando la polimerización de esta forma se obtiene una malla de cadenas de acrilamida.

El tamaño de los orificios o poros en la red se determina por dos parámetros: (1) la cantidad de acrilamida utilizada por unidad de volumen del medio de reacción y (2) el grado de reticulación. Prescindiendo de la cantidad total de acrilamida por unidad de volumen, el tamaño medio de poro alcanza un mínimo cuando el 5% de la acrilamida total que se emplea es bis-acrilamida. Por lo tanto, en muchas fórmulas el contenido de bis-acrilamida se fija en el 5% de la acrilamida total y no se altera para controlar el tamaño del poro. Por otra parte, el tamaño del poro se manipula variando el contenido total de acrilamida, el tamaño medio del poro de un gel disminuye a medida que la concentración del gel aumenta.

Los geles de poliacrilamida presentan numerosas ventajas, entre ellas la de ser estables en una amplia gama de pH (1-11), lo que permite una elección casi ilimitada de los

tampones; son elásticos, transparentes, no se ven alterados por variaciones ambientales de la temperatura, admiten la aplicación de voltajes más elevados -lo que acorta la duración de la electroforesis- y por último señalar que su poder de resolución es excelente. En cambio, presentan la gran desventaja de su neurotoxicidad y la mayor cantidad de trabajo relativo que conllevan respecto a los geles de almidón.

II.5.3.1.3.- Electroforesis en gel de agarosa

Este tipo de soporte ha sido eclipsado por el uso de la poliacrilamida en el análisis de la mayoría de proteínas y glicoproteínas pero continúa siendo de gran valor en análisis donde se requiera un gran tamaño de poro.

Los resultados o resoluciones obtenidas pueden ser diferentes según la procedencia comercial de la agarosa, por lo que es necesario siempre que se pueda utilizar el mismo tipo de agarosa, y si las experiencias deben de ser comparadas, utilizar de preferencia el mismo lote.

La ventaja que tiene sobre los geles de poliacrilamida es que no es tóxica y es más fácil de preparar.

II.5.3.2.- REPRESENTATIVIDAD DEL POLIMORFISMO ENZIMATICO

A partir de los fenotipos se pueden calcular las frecuencias alélicas, así como las tres medidas principales de la variabilidad: la tasa de polimorfismo, la tasa de heterocigosidad y la tasa de alelismo; los índices de fijación y las distancias genéticas basadas en el polimorfismo son igualmente calculados entre las poblaciones.

Sin embargo, cuando cuantificamos la variabilidad existente en una población, asumimos que los loci estudiados electroforéticamente constituyen una muestra representativa

del genoma del individuo. Por lo que las únicas restricciones impuestas son el número de loci estudiados y su elección al azar. No obstante, los genes estudiados constituyen una parte específica del genoma -loci estructurales que codifican para proteínas y enzimas solubles de la sangre-, y puede plantearse su representatividad sobre el genoma completo del individuo.

Cuando se quiere medir la variabilidad electroforética de una población, es conveniente tener en cuenta las siguientes recomendaciones (Séger y Lucotte, 1981):

a) Las proteínas estudiadas deben ser lo más diversas posibles, para no obtener una estimación distorsionada de la heterocigosidad. En efecto, las proteínas séricas son generalmente más variables que los enzimas eritrocitarios, y dentro de los enzimas la variabilidad es más importante en los de substratos múltiples que en los de substratos únicos. Por ello en la práctica sería necesario realizar un buen muestreo dentro de los diversos tipos. Sin embargo, como ya hemos comentado, los genes estudiados constituyen una parte específica del genoma, pues son loci estructurales que codifican proteínas solubles lo que podría plantear el que sean representativos del genoma completo del individuo. No obstante, se han estudiado algunos enzimas ligados a partículas, y no parecen diferir en grado de polimorfismo de los enzimas solubles, lo cual permite deducir que los enzimas solubles son representativos de los enzimas en general (Lewontin, 1979).

b) El número de individuos analizados debe ser suficientemente importante, de manera que las desviaciones debidas al muestreo sean mínimas. En la práctica 40 - 50 individuos son un mínimo suficiente. Según Nei (1978) las estimaciones de (H) varían muy poco cuando el número de individuos analizados es superior a 50.

c) Analizar un gran conjunto de loci, lo que resulta más importante incluso que analizar un gran número de individuos (Lewontin, 1979), ya que, en caso contrario, la muestra podría haber incluido un número desproporcionado de loci altamente variables, con lo cual habríamos obtenido una estimación distorsionada de la heterocigosidad. La experiencia con los estudios electroforéticos indica que una muestra de unos 20 loci génicos es usualmente suficiente (Séger y Lucotte, 1981; Ayala y Kiger, 1984), y las estimaciones de la heterocigosidad suelen cambiar poco cuando el número de loci excede de 20. También Nei (1987) recomienda, que si el número de loci examinados es cercano a 25, se deben analizar de 20 a 30 individuos por locus.

Sin embargo, la técnica de electroforesis tampoco está exenta de limitaciones y no es totalmente precisa. Un problema planteado en los estudios electroforéticos es la proporción de variabilidad realmente detectada por esta técnica. La electroforesis separa proteínas según su migración diferencial en un campo eléctrico. Esta migración diferencial se debe a variaciones existentes en la configuración molecular y, primariamente, a diferencias en la carga eléctrica neta. Pero pueden ocurrir sustituciones de aminoácidos que no cambien la carga neta de una proteína o que modifiquen sustancialmente su configuración. La electroforesis detecta, por lo tanto, sólo una fracción de todas las diferencias en la secuencia de aminoácidos. Se ha propuesto (Shaw, 1970) que sólo un tercio (28% a 30%) de las sustituciones de aminoácidos pueden detectarse con la técnica usual (Ayala, 1982b; Zapata, 1987; Fontdevila, 1987). Sin embargo, pueden detectarse cambios electroforéticamente neutros, al menos en ciertos casos, combinando concentraciones del gel y condiciones de pH (Ramshaw y col., 1979).

Combinando métodos electroforéticos (electroenfoque, electroforesis bidimensional, electroforesis secuencial) y

otras técnicas como la desnaturализación por calor o urea, el mapeo de péptidos y los anticuerpos monoclonales, es posible determinar parte de la variabilidad oculta a la electroforesis convencional.

Ayala (1984), al comparar la eficacia de estas técnicas en la detección de la variabilidad con su coste metodológico, llega a la conclusión de que la electroforesis convencional sigue siendo el método más eficaz, ya que si analizamos un número grande de loci los valores medios de divergencia no varian mucho.

En definitiva, si lo que pretendemos es analizar las diferencias intra o interespecíficas entre poblaciones (presumiblemente afectadas por igual con estas limitaciones), la variabilidad detectada electroforéticamente es un instrumento eficaz de comparación. Bush y Kitto (1978) evaluaron distintos métodos moleculares para estimar el nivel de divergencia genética entre taxones, basándose en el nivel de sensibilidad de la técnica y su facilidad metodológica, llegando a la conclusión de que la electroforesis es el mejor método para comparar razas, especies y géneros relacionados.

II.6.- ESTIMACION DE LA DIVERGENCIA ENTRE POBLACIONES

La divergencia genética entre poblaciones (razas) puede cuantificarse de diferentes maneras, utilizando los estadísticos de distancia genética o utilizando los índices de fijación o F-estadísticos de Wright (1965) y modificados por Nei (1977) y por el propio Wright (1978). Estos últimos parecen estar más indicados cuando estudiamos la diferenciación existente entre subpoblaciones (subpoblaciones de la misma o de diferentes razas, en nuestro caso), debido al

problema que comporta, a este nivel, el uso de las distancias genéticas.

La estructuración en subpoblaciones más o menos aisladas, genera alteraciones en las relaciones de distribución aleatoria de genes y genotipos, introduce fluctuaciones al azar en las frecuencias génicas y la población (raza) puede dividirse en diversos subrangos ecológicos, parcial o totalmente aislados, con factores selectivos propios. El tipo de diferenciación que ello genera viene determinado por el tamaño de las subdivisiones, el tamaño efectivo de la subpoblación (N_e), las diferencias en los tipos de selección y la tasa de migración existente entre ellas. Estos factores combinados pueden producir desviaciones de las frecuencias esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg y por tanto la estructura genética intersubpoblacional e interpoblacional puede describirse usando los estadísticos que miden este parámetro.

Si el objetivo al comparar la diferenciación interpoblacional es estimar los niveles de divergencia evolutiva entre poblaciones a partir de sus frecuencias génicas, está más indicado el uso de los índices de distancia genética que permiten manejar un elevado número de poblaciones, establecer comparaciones y determinar relaciones filogenéticas entre ellas.

II.6.1.- INDICES DE FIJACION O F-ESTADISTICOS

Los índices de fijación en la terminología de Wright son, F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . F_{IS} y F_{IT} son las correlaciones existentes entre dos gametos sacados al azar de una subpoblación y del total de la población respectivamente, mientras que F_{ST} es la correlación existente entre dos gametos sacados al azar de diferentes subpoblaciones

(Wright, 1965). Dichos parámetros se relacionan mediante la siguiente fórmula:

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

Esta ecuación original de Wright, asume loci neutros dialélicos y que no exista efecto de la selección sobre el locus analizado.

Nei (1977) y Wright (1978) redefinen los índices de fijación abandonando el concepto de correlación y haciéndolo extensivo para el caso de alelos múltiples. Particularmente Nei (1977) demostró que todos los índices de fijación pueden ser definidos usando las heterocigosidades observadas y esperadas de las poblaciones en estudio. Este autor define la diversidad genética interpoblacional (G_{ST}) usando las frecuencias génicas en la generación actual, de modo que no se requieren asunciones acerca del pedigree de los individuos, selección y migración. Su valor viene dado por la ecuación $G_{ST} = D_{ST}/H_T$, siendo D_{ST} la diversidad genética entre subpoblaciones y H_T la diversidad genética promedio en la población total -conjunto de subpoblaciones-. G_{ST} puede variar de 0 a 1 y es similar a la "F" de Wright en los loci dialélicos. Si hay más de dos alelos su valor es equivalente a la media ponderada de $F(ST)$ (Nei, 1977; Wright, 1978; Swofford y Selander, 1981) para todos los alelos.

Por tanto, los estadísticos $F(IS)$ y $F(IT)$ nos miden el exceso o déficit de heterocigotos promedio en cada subpoblación y en la población conjunta, respectivamente, pudiendo tomar en cada caso valores negativos o positivos. Por su parte, el estadístico $F(ST)$ nos mide el grado de diferenciación genética existente entre las subpoblaciones. Si por ejemplo $F_{ST} = 0$ todas las subpoblaciones serían idénticas, no existirían diferencias entre ellas. El valor de dicho estadístico es siempre positivo, y está comprendido en

un rango de valores que oscilan de 0 a 1 -cuanto mayor sea, mayor es el grado de diferenciación-, por lo que pueden tomarse como una medida de la distancia genética entre las poblaciones (Gregorius y Roberds, 1986).

A diferencia de los F-estadísticos originales de Wright que se habían definido con respecto a una hipotética población compuesta por un infinito número de subpoblaciones, los F-estadísticos definidos ahora, están sujetos a error debido a la deriva genética (error de muestreo), ya que ahora la población es finita por definición. Si el tamaño de la población es relativamente pequeño, la varianza debida a la deriva es considerablemente grande y los F-estadísticos pueden fluctuar de generación en generación.

Hasta ahora sólo hemos considerado un grado de subdivisión jerárquica en la población. Sin embargo, cuando queremos realizar este tipo de análisis entre poblaciones estructuradas jerárquicamente a varios niveles: demes, regiones, subdivisiones (siguiendo el ejemplo de Wright, 1978) o subpoblaciones, razas, troncos ancestrales (en nuestro caso particular), es posible realizar el cálculo de esta "F" para cada nivel de jerarquía con respecto a las demás. Existe gran analogía entre este análisis jerárquico de Wright y el análisis de diversidad genética propuesto por Nei (1977).

II.6.2.- INDICES DE DISTANCIA GENETICA

Cuando se tienen descritas unas poblaciones en términos de las frecuencias alélicas de diferentes loci, se plantea la cuestión de obtener una medida que cuantifique globalmente la distancia genética entre dichas poblaciones. Como expresión de esta distancia se han propuesto numerosos métodos, pero todos presentan algunos inconvenientes importantes.

El concepto de distancia genética fue usado primeramente -siguiendo las citas de Nei (1987)- en el año 1953 por Sanghvi para un estudio evolutivo, pero un concepto similar para medir las diferencias entre poblaciones ya había sido utilizado en 1909 por Czekanowski y en 1926 por Pearson. Los métodos inventados por estos autores se usaron primariamente para clasificar poblaciones en términos de caracteres cuantitativos. Más tarde, Fisher (1936) y Mahalanobis (1936) los mejoraron desde el punto de vista estadístico. El estadístico (D^2) de Mahalanobis todavía se usa extensamente para caracteres cuantitativos. Posteriormente se extendió para el caso de caracteres discretos por varios autores. El árbol evolutivo de las razas humanas, a partir de datos de frecuencias génicas, fue construido por primera vez por Cavalli-Sforza y Edwards (1964), usando una distancia genética basada en una transformación angular de las frecuencias génicas.

Desde que Cavalli-Sforza y Edwards (1964) publicaron su trabajo, algunos genéticos se interesaron en el problema y se propusieron diversas medidas de distancia genética.

Aunque las más utilizadas con los datos electroforéticos son las de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), Nei (1972) y Rogers (1972), vamos a hacer un pequeño comentario de algunas de las existentes, comentando las ventajas y desventajas de las mismas.

Para ello vamos a reseñar en primer lugar las condiciones que debería cumplir, según Prevosti (1974), cualquier medida de distancia genética:

1. Ser independiente de las causas que han producido la divergencia.
2. La distancia entre dos poblaciones dadas ha de ser

independiente de las demás poblaciones estudiadas.

3. Debe depender solamente de las diferencias entre las frecuencias génicas de cada locus.
4. Las medidas de distancia han de poder ser valoradas estadísticamente.
5. Parece más conveniente calcular la distancia genética a partir de las frecuencias génicas, que de las genotípicas, ya que precisamente, se concibe la evolución de las poblaciones en términos de cambios en las frecuencias génicas.

Como métodos propuestos para calcular las distancias genéticas tenemos los que se describen en el siguiente apartado.

II.6.2.1.- DISTANCIA DE CAVALLI-SFORZA Y EDWARDS

Estos autores proponen una medida de la distancia genética que es pitagórica en un hiperespacio euclídeo. Cada población se representa en la superficie de una hiperesfera de radio 1, de tantas dimensiones como alelos existen en el locus. Las coordenadas de estas poblaciones vienen dadas por las raíces cuadradas de los valores de las frecuencias alélicas. La distancia entre dos poblaciones viene dada por el ángulo -expresado en radianes- que forman los vectores de las dos poblaciones. El ángulo $\theta = \pi/2$ corresponde a una sustitución génica total, por lo que es conveniente tomar $\pi/2$ como unidad de distancia. Si se desea que esta distancia varie entre 0 -frecuencias génicas iguales- y 1 -ningún alelo en común-, se multiplicará dicha distancia por $2/\pi$ para obtener la "distancia de arco". Si consideramos dos poblaciones X e Y, que tienen respectivamente las fre-

cuencias alélicas x_1, \dots, x_n y y_1, \dots, y_n ($\sum x_i = \sum y_i = 1$) donde n es el número de alelos en el locus considerado, tenemos:

$$\theta = \text{arc cos } \sum \sqrt{x_i y_i}$$
$$d_{arc} = 2/\pi \text{ arc cos } \sum \sqrt{x_i y_i}$$

Los mismos autores han definido y utilizado igualmente la "distancia de cuerda", que mide la longitud de la cuerda entre las poblaciones X e Y:

$$d_c = \sqrt{2} \sqrt{1 - \cos \theta}$$

si se desea trabajar en el intervalo (0,1) la fórmula queda:

$$d_c = \sqrt{1 - \cos \theta}$$

Un inconveniente de este método es el hecho de tomar los vectores de las raíces cuadradas de las frecuencias génicas y no ellas mismas directamente. Aunque ésto tenga la ventaja de hacer las varianzas de las frecuencias prácticamente independientes del valor de dichas frecuencias, tiene la desventaja de que diferencias iguales en las frecuencias génicas pueden dar distancias distintas (Prevosti, 1974).

Otro inconveniente, o, según como se mire, ventaja, es que el método se basa en admitir que las poblaciones se han diferenciado por deriva genética. Si la diferenciación entre poblaciones refleja directamente el efecto de la deriva y la influencia de la mutación es tan pequeña que se puede despreciar, esta medida sería adecuada para calcular las distancias entre poblaciones de reciente separación, asumiendo asimismo que no existe efecto de la selección.

II.6.2.2.- DISTANCIA DE EDWARDS

Debido a los problemas que supone trabajar sobre un espacio curvo, Edwards (1971) propuso una distancia "estereográfica", sustituyendo la longitud de la cuerda entre X e Y por la obtenida de su proyección sobre una recta:

$$d_E = \sqrt{\frac{8 (1 - \sum \sqrt{x_i y_i})}{(1 + \sum \sqrt{x_i/n}) (1 + \sum \sqrt{y_i/n})}}$$

II.6.2.3.- DISTANCIA DE NEI

Si asumimos que la tasa de mutación es un elemento a tener en cuenta para medir la diferenciación entre poblaciones, el índice de Nei (1972, 1978)) parece la medida más apropiada. De todas las distancias calculadas a partir de frecuencias alélicas, sólo ésta tiene un "significado evolutivo" (Vienne y Damerval, 1985). El índice de Nei es el más utilizado en estudios de evolución con datos electroforéticos porque éstos cumplen bastante bien con la premisa del índice de que las sustituciones alélicas están producidas por el efecto combinado de la mutación y la deriva, es decir, mide la divergencia molecular según el modelo de evolución neutralista (Fontdevila, 1987).

El principio básico de este método es que las diferencias alélicas en movilidades electroforéticas o reacciones inmunológicas son causadas por, al menos, una diferencia codónica al nivel génico y así el número promedio de diferencias codónicas por locus puede ser estimado estadísticamente a partir de datos de frecuencias alélicas. Ya que este número es una medida directa de las diferencias génicas, su medida estadística es una buena estimación de la distancia genética entre poblaciones (Nei, 1987).

Los dos parámetros usados son: Identidad Genética (I), que estima la proporción de genes que tienen una estructura similar en las dos poblaciones y Distancia Genética (D) que estima el número de sustituciones alélicas por locus que han ocurrido en la evolución independiente de las dos poblaciones. El método tiene en cuenta el hecho de que no todas las sustituciones alélicas observadas son completas: un alelo puede haber sido reemplazado parcialmente por otro diferente, pero existiendo aún el alelo original en mayor o menor frecuencia (Ayala y Kiger, 1984).

El valor de I se define por:

$$I_k = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

siendo I_k la probabilidad de que dos alelos, uno tomado de cada población, sean idénticos.

Si lo extendemos a varios loci:

$$I = \frac{I_{x,y}}{\sqrt{I_x I_y}}$$

La identidad genética I, puede variar desde 0 -sin alelomorfos comunes- a 1 -los mismos alelos, y en las mismas frecuencias, se encuentran en ambas poblaciones-.

La distancia genética (D) viene expresada por:

$$D = -\ln I$$

y puede oscilar entre cero, es decir, ningún cambio alélico o identidad genética, e infinito. (D) puede ser mayor que

uno porque cada locus puede experimentar más de una sustitución alélica completa cuando la evolución transcurre durante periodos largos de tiempo.

A este valor de distancia (D) se le ha llamado "Distancia genética estándar" de Nei (1972). Sin embargo, cuando el tamaño de muestra analizado es pequeño, es preferible usar la "Distancia genética estándar no sesgada" (D_m) de Nei (1978), la cual tiene en cuenta el tamaño de muestra mediante la corrección de Nei y Roychoudhury (1974).

Debido a que por errores de muestreo (D) puede ser negativa, el problema se soluciona aumentando el tamaño de la muestra o asumiendo que la distancia es cero, cuando el valor estimado es negativo.

Si asumimos que existe equilibrio de ligamiento entre todos los loci, podemos estimar la varianza de las distancias genéticas (Nei y Roychoudhury, 1974; Nei, 1987)

$$\sigma_D^2 = (1-I) / (Ix_n)$$

siendo n el número de loci analizados.

II.6.2.4.- DISTANCIA DE ROGERS

Para obviar el inconveniente que presentaba por ejemplo la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards, en la que diferencias iguales en las frecuencias génicas podían dar distancias distintas, Rogers (1972) propone una distancia más sencilla:

$$D_{xy} = \sqrt{1/2 \sum (q_{xi} - q_{yi})^2}$$

donde i es el número de alelos para uno de los loci analizados y q_{xi} y q_{yi} son las frecuencias alélicas de cada uno

de ellos en las poblaciones "X" e "Y" respectivamente. Generalizado para r loci,

$$D_T = 1/r \sum D$$

Los valores de distancia varían entre 0 y 1.

Este índice tiene las propiedades que dice el autor, si los alelos existentes en los loci son sólo dos. En cambio, si las poblaciones que se comparan presentan loci con más de dos alelos, vuelve a surgir el inconveniente mencionado anteriormente, es decir, a diferencias idénticas entre las frecuencias génicas pueden corresponder distancias genéticas distintas. Además esta distancia subestima la diferenciación existente cuando dos poblaciones no comparten alelos en loci polimórficos donde existan un número elevado de ellos.

II.6.2.5.- DISTANCIA DE HEDRICK

Si las poblaciones no están en equilibrio de Hardy - Weinberg para los loci examinados, entonces una medida basada en las frecuencias genotípicas puede ser útil para describir las diferencias genéticas entre poblaciones. En este caso, se puede usar la probabilidad de identidad genotípica de Hedrick (1971) que utiliza las frecuencias genotípicas observadas. Esta medida para un locus simple es:

$$I_H = \frac{\sum P_{1,i,x} P_{1,i,y}}{1/2 (\sum P^2_{1,i,x} + \sum P^2_{1,i,y})}$$

donde $P_{1,i,x}$ y $P_{1,i,y}$ son las frecuencias del genotipo ij en las poblaciones X e Y, y estos sumatorios son para todos los genotipos.

La distancia genética es el complemento de I_H

$$D_H = 1 - I_H$$

I_H oscila entre 1 -para poblaciones con idénticas frecuencias genotípicas- y 0 -para aquellas que no tienen genotipos en común-.

Este índice expresa la relación entre la probabilidad de extraer dos genotipos idénticos de las dos poblaciones comparadas y el promedio de la probabilidad de extraer dos genotipos idénticos en dos extracciones sucesivas de la misma población. No obstante, persiste el inconveniente de que pueden obtenerse índices distintos para idénticas diferencias en las frecuencias génicas.

II.6.2.6.- DISTANCIA DE PREVOSTI

Según Prevosti, las dificultades que ofrecen los distintos índices propuestos podrían superarse utilizando directamente las diferencias entre las frecuencias génicas, o el promedio de las mismas en distintos loci si se desea considerar varios de éstos conjuntamente.

$$D_{xy} = 1/2 \sum |q_{xi} - q_{yi}|$$

donde i es el número de alelos para uno de los loci analizados y q_{xi} y q_{yi} son las frecuencias alélicas de cada uno de ellos en las poblaciones "X" e "Y" respectivamente.

Esta distancia expresa directamente, se podría decir en bruto, la diferenciación entre las poblaciones y es totalmente independiente de los valores de las frecuencias que se comparan, del número de alelos existentes en cada locus y de los factores que han determinado la diferenciación. Para Prevosti (1974), el cálculo de esta distancia sería el más conveniente en las investigaciones que tuvieran por objeto una medida de la distancia genética entre poblaciones, que

expresase, sin otras implicaciones, simplemente el grado de diferenciación entre los acervos génicos de las mismas.

Como hemos visto, son numerosas las limitaciones que afectan a todas las distancias existentes. El término "distancia" se aplica a una función que atribuye a un par de poblaciones un valor no negativo d_{xy} , calculado a partir de estructuras genéticas. En realidad, en un plano matemático, una "verdadera distancia" debe tener otras propiedades:

- 1) $d_{yy} = d_{yy}$
- 2) $d_{xx} = 0$
- 3) $d_{xy} > 0$, si $A \neq B$
- 4) $d_{xz} \leq d_{xy} + d_{yz}$ (desigualdad del triángulo)

La distancia de Nei por ejemplo, viola la desigualdad del triángulo, ya que no es una distancia métrica, pero nos mide una propiedad biológica, el número promedio de sustituciones electroforéticamente detectables por locus, acumuladas entre dos poblaciones desde su separación.

Los valores de distancia estándar de Nei hallados en los diferentes rangos taxonómicos, en varios organismos, oscilan entre unos valores que van desde 0,00 a 0,05 para las razas, 0,02 a 0,20 para las subespecies, 0,10 a 2,00 para las especies y de más de 1 entre los géneros (Kimura, 1983; Nei, 1987)

Por otra parte, ninguna de las distancias tienen en cuenta el desequilibrio gamético, ya que todas ellas consideran los loci independientes unos de otros. En el grado en que las interpretaciones genéticas de las distancias se apoyan la mayoría de las veces en modelos de tipo neutralista, ésto podría parecer que no tiene importancia. Sin embargo, la diferencia entre dos poblaciones o taxones puede provenir

no de las frecuencias alélicas, sino de diferencias a nivel de combinaciones gaméticas (Vienne y Damerval, 1985).

Por todo ésto, es conveniente realizar el cálculo de varias distancias cualitativamente diferentes, Nei, Rogers, Cavalli-Sforza y Edwards, por ejemplo, comparándolas y sacando posteriormente las conclusiones correspondientes.

II.7.- TAXONOMIA Y FILOGENIA

La **Sistemática** es el estudio científico de la diversidad y diferenciación de los organismos, así como de las relaciones que existen entre ellos, sean éstas de parentesco o de otro tipo. La **Taxonomía** es el estudio teórico de los principios, procedimientos y reglas de la clasificación, y se la considera como una parte de la Sistemática. Finalmente, la **Clasificación** es la ordenación de los organismos en grupos, a través del estudio de las relaciones que existen entre ellos.

El conocer las relaciones entre organismos y su posterior clasificación es de vital importancia, como lo demuestra el hecho de que, por ejemplo, podamos extrapolar los resultados de un experimento realizado en un organismo concreto a otros organismos afines a él. Pero donde la clasificación adquiere plena justificación es en el estudio de la Evolución y sus mecanismos. Hoy día sabemos que las relaciones evolutivas (filogenéticas) entre los organismos son el criterio más "natural" para su clasificación.

La clasificación sistemática estaba ya firmemente establecida antes de la formulación de la teoría darwiniana de la Evolución; sin embargo, la Taxonomía -metodología de la clasificación sistemática-, ha estado plagada de

arbitrariedades y los sistemáticos se han enfrentado durante más de cien años con problemas en los criterios clasificatorios. En la década de los 50 empezaron a surgir varias escuelas taxonómicas que intentaron formalizar las bases de la clasificación.

II.7.1.- FENETICOS, CLADISTAS Y EVOLUCIONISTAS

En la **Taxonomía fenética** los organismos se agrupan teniendo en cuenta solamente las relaciones de parecido o semejanza basadas en un conjunto de caracteres fenotípicos. Para ello dan a todos los caracteres el mismo peso y establecen algoritmos para cuantificar la semejanza entre especies.

Las técnicas electroforéticas permiten resultados cualitativos que pueden ser transformados en cuantitativos en función del tipo de análisis y su tratamiento debe ser generado a partir de matrices de distancia para estos valores. Para la escuela fenética, basada en los métodos de la taxonomía numérica (Sneath y Sokal, 1973), este tipo de transformación es necesaria para medir los niveles de similitud entre los OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) sometidos a estudio, no así para la escuela cladista que considera que este tipo de transformación genera una pérdida de información ya que se utilizan todos los datos disponibles con independencia de su calidad informativa desde el punto de vista genealógico. Con estos valores se calcula un índice de semejanza que permite construir un diagrama de relaciones o fenograma que tiene valor sistemático..

Para la escuela fenética las clasificaciones sólo pueden estar basadas en el nivel de similitud -genética o de otro tipo- de los organismos (Sneath y Sokal, 1973), ya que, según ellos, es prácticamente imposible estar seguro de que una reconstrucción filogenética sea correcta.

En 1950 Henning propuso el criterio cladista. La Taxonomía cladista considera la genealogía como la única base de la clasificación. Su visión filogenética consiste en una sucesión de ramificaciones dicotómicas que representan eventos de especiación (cladogénesis) en los que la especie ancestral se transforma en dos especies hijas emparentadas; además, cada taxón de la clasificación debe ser estrictamente monofilético. Este proceso genera un árbol filogenético denominado cladograma.

Como ya hemos dicho, para la escuela cladista, la transformación de los datos cualitativos en cuantitativos genera una pérdida de información, por lo que prefieren, cuando ello sea posible, el uso de datos cualitativos de los caracteres para definir los presumibles puntos de cladogénesis en los árboles filogenéticos. Según Nei (1987), se puede pensar que esta aproximación es mejor que la fenética en la construcción de árboles filogenéticos, pero en la práctica, sin embargo, las asunciones requeridas por los métodos cladistas no siempre se satisfacen con los datos moleculares, por lo que la superioridad de esta aproximación no está garantizada. Ambas escuelas han sugerido algoritmos para el análisis de los datos electroforéticos.

Los evolucionistas critican la ausencia de un verdadero contenido histórico-evolutivo en la formación de taxones por parte de fenéticos y cladistas. Esta escuela de Taxonomía evolutiva, propugna la inclusión de todos los criterios basados en cualquier tipo de información evolutiva sobre los organismos como son las correlaciones entre caracteres, la adaptación ecológica y la distribución presente y pasada. Los sistemáticos evolutivos coinciden con los cladistas en que la genealogía es la base de la clasificación, pero esto no es suficiente. Según ellos, el hecho de que un grupo de especies compartan caracteres derivados o apomórficos no es suficiente para elevarlos a la misma categoría taxonómica.

La razón es que después del evento cladogenético la divergencia prosigue (anagénesis) y algunas especies pueden diferenciarse mucho más adquiriendo nuevos caracteres que las elevan a una nueva categoría sistemática (Sokal, 1985; Fontdevila, 1987).

II.7.2.- ARBOLES FILOGENETICOS

Los árboles filogenéticos son las representaciones diagramáticas de los valores de las distancias obtenidas a partir de una serie de datos de distinta naturaleza, como pueden ser morfológicos, electroforéticos, inmunológicos. Para su construcción se hace necesaria la utilización de una serie de algoritmos, siendo los más usados el análisis de cluster con el algoritmo UPGMA -método no ponderado de grupo par usando promedios aritméticos- (Sneath y Sokal, 1973), el método de Fitch y Margoliash (1967) y el método de Wagner (Farris, 1972; Swofford, 1981).

El método fenético, como ya se ha comentado, requiere el uso de datos cuantitativos -diluidos en una matriz de distancias-, para medir los niveles de similitud entre los OTUs.

El método cladista, prefiere el uso de datos cualitativos de los caracteres, cuando ello es posible, para así poder definir los presumibles puntos de cladogénesis en los árboles filogenéticos. Sin embargo, también han desarrollado algoritmos para el análisis cuantitativo de los datos.

II.7.2.1.- ANALISIS CUALITATIVO

El análisis cualitativo de los caracteres (morfológicos y enzimáticos en nuestro caso) nos provee de una serie de datos sobre la distribución de esos caracteres entre los taxones. Dado que el proceso evolutivo consiste en cambios

de los estados genéticos del carácter, existe por tanto una potencial información filogenética que puede ser aprovechada considerando directamente estos estados. La evolución del estado de los caracteres puede incluir convergencias, reversiones y retenciones paralelas de los estados ancestrales, fenómeno que no puede ser aclarado cuando estos datos cualitativos son transformados a cuantitativos e introducidos en una matriz de distancias. Así los análisis cualitativos nos permiten distinguir las relaciones genealógicas entre los diferentes taxones (Avise, 1983).

El principio en el que se basa el análisis de los datos cualitativos, codificados binariamente (0,1) -ausencia / presencia-, es el de la "parsimonia"; es decir, el árbol generado sería aquel que requeriera el menor número posible de pasos o transiciones del estado del carácter, sumados a través de todas las ramas. El número de árboles posibles para un moderado o pequeño número de OTUs es astronómico (p.e. para 10 OTUs son posibles al menos 34.000.000 de árboles, Felsenstein, 1978), por lo que metodológicamente es imposible examinarlos todos, pero se han introducido algunos algoritmos que obtienen las aproximaciones más parsimoniosas. El método de Camin y Sokal (1965) es utilizado cuando se conocen los estados ancestrales del carácter. Si 0 representa el estado ancestral, los cambios $0 \rightarrow 1$ son permitidos pero no así los cambios $1 \rightarrow 0$. El método de Wagner (Farris, 1970) se utiliza cuando el estado ancestral del carácter es desconocido y los dos tipos de cambios son igualmente probables (no debe confundirse este método con el de la distancia de Wagner para caracteres cuantitativos).

Se han sugerido algunos criterios para decidir si un determinado estado del carácter es ancestral o derivado. Se puede tomar como estado primitivo el que aparece con más frecuencia en el grupo que está siendo examinado. Otro criterio propone que si se dispone de registro fósil, el estado

primitivo del carácter es el que está presente en el fósil. Y por último, la más racional estimación de la polaridad del estado del carácter, es el análisis del "outgroup" que consiste en utilizar poblaciones filogenéticamente relacionadas pero fuera del grupo (p.e. Canis lupus) en cuyo caso se consideran primitivos aquellos estados del carácter que se presentan a la vez dentro del grupo y en el "outgroup", considerando que el ancestro común ya los poseía (Avise, 1983).

Si trabajamos con datos electroforéticos podemos considerar el alelo como un carácter independiente en dos estados posibles: presente, si su frecuencia es mayor que 0,05, y ausente. Como la selección sólo puede cambiar las frecuencias de los alelos presentes, adquirir un alelo para la escuela cladista sería más importante que la consecuente modificación de su frecuencia. Farris (1981), está de acuerdo en descartar el uso de las frecuencias a partir de subespecies hacia rangos taxonómicos superiores, pues a estos niveles las principales diferencias consisten en no compartir alelos.

Otra alternativa es utilizar al locus como carácter. Las distintas distribuciones de frecuencias alélicas de cada locus, se utilizarían como estados distintos del carácter. Cada locus sería un carácter con distintos estados. Puede usarse el criterio del 0,05% para considerar la presencia de un alelo y evitar diferencias debidas al tamaño de la muestra analizada.

Su utilización con datos electroforéticos es escasa y tropieza con la dificultad de establecer las series de transformación (orden filogenético) a partir de las distintas movilidades obtenidas electroforéticamente.

En nuestro caso particular, el análisis cualitativo de los datos electroforéticos no nos parece indicado -no así el

análisis de los datos morfológicos- ya que no trabajamos con especies, ni con rangos taxonómicos superiores, sino con razas, teniendo todos los sistemas analizados idénticas movilidades electroforéticas y compartiendo la mayoría de los mismos alelos, por lo que la distribución de frecuencias génicas adquiere una vital importancia.

II.7.2.2.- ANALISIS CUANTITATIVO

Si queremos realizar un análisis cuantitativo de los caracteres, en el que los datos están diluidos en una matriz de distancias, podemos usar, en una primera instancia, los métodos de Fitch y Margoliash (1967) y Cavalli-Sforza y Edwards (1967), siendo el objetivo perseguido por ambos encontrar el árbol que mejor se adapte a la matriz de distancias dada. En estos métodos se calcula primero un árbol semejante al generado por el análisis de cluster y después se altera su topología en un intento de mejorar el valor de bondad de ajuste.

Los árboles inferidos son no-rotados, es decir, cualquier nodo del árbol puede ser el punto inicial del evento cladogenético. La rotación del árbol sólo puede ser empleada previo conocimiento -empleando el análisis de "outgroup"- o asumiendo que las tasas evolutivas para las diferentes líneas son constantes. Los métodos asumen implícitamente los criterios de aditividad (la distancia entre dos poblaciones es el valor de la suma de las distancias del árbol desde una a otra población) e independencia (cada distancia es medida independientemente de las otras), así como que el único mecanismo de divergencia entre los OTUs es la deriva genética. Farris (1981) señala que el llamado método de F-M es en la práctica bastante diferente del método original del mismo nombre y para evitar confusiones propone referirse a él como la técnica de "Prager y Wilson".

Por otra parte, si asumimos que las tasas de cambio esperadas son constantes en todas las líneas y que todas las poblaciones son contemporáneas, es decir, la longitud total desde el punto de rotación del árbol hasta las poblaciones es la misma, los métodos pueden ser considerados como una estimación de la filogenia asumiendo que el fenotipo se comporta como un reloj evolutivo (Felsenstein, 1984, 1986).

El principal método utilizado por la escuela fenética es el análisis de cluster. A partir de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) construye con ellas una matriz de distancias que somete a determinados algoritmos (UPGMA, WPGMA, UPGMC, WPGMC, etc). Cuando se aplica el algoritmo UPGMA la primera operación consiste en buscar los OTUs que presentan la distancia más pequeña, ajustándolos primero para formar un cluster o grupo y sucesivamente se busca en la matriz el siguiente OTU con la distancia más pequeña, hasta incorporar a todos los existentes. El algoritmo UPGMA calcula la distancia promedio de un OTU candidato a un cluster con la de los OTUs ya unidos a ese cluster. El resultado final es una representación del nivel de similitud entre los OTUs que constituyen la matriz de distancias.

La limitación principal de este método aglomerativo es suponer que todas las ramas del árbol presentan tasas homogéneas de cambio, aunque Li (1980) establece algunas correcciones para superar esta dificultad.

El principal método cuantitativo utilizado por la escuela cladista es el método de Wagner. Este utiliza algoritmos expresamente diseñados para minimizar la distorsión entre el árbol construido y la matriz original de datos. El método cladista requiere la utilización de una distancia métrica, es decir que no viole la desigualdad del triángulo. La distancia de Nei no es métrica, por lo que su uso para la construcción de los cladogramas queda descartado. El método

de Wagner, a diferencia del de F-M, añade una restricción especial en la configuración del árbol, y es que la distancia observada (D_{ij}) no puede exceder a la verdadera distancia patrística (o distancia estimada d_{ij}), $D_{ij} \leq d_{ij}$, con lo cual la matriz de distancias derivadas no es usualmente la misma que la estimada por el método de Prager y Wilson (F-M). Además, si las longitudes de las ramas representan cantidades de cambio evolutivo, no pueden ser lógicamente negativas. El método de distancia de Wagner, a diferencia del de F-M, fue diseñado de manera que las longitudes de las ramas no fueran negativas, a menos que la matriz observada violara la desigualdad del triángulo (Farris, 1981).

Estos algoritmos propuestos por la escuela cladista no precisan asumir uniformidad en las tasas evolutivas y el criterio central es el de la "parsimonia", obteniéndose la "máxima parsimonia" cuando se han relacionado todos los OTUs con la mínima distancia posible. Al árbol obtenido se le asigna una dirección evolutiva, mediante el método "outgroup" o minimizando la varianza de las tasas evolutivas, asumiendo homogeneidad en ellas. En este caso, los OTUs más divergentes del árbol tienen que haber pasado por la misma tasa de cambio y el cladograma se genera a partir del punto medio entre ambos, el cual se toma como origen "midpoint rooting" (Farris, 1972).

II.7.2.3.- COMPARACION DE LOS METODOS

La superioridad de los métodos de las dos escuelas, fenética y cladista, continúa siendo fuente de polémica y los defensores de ambas escuelas la han intentado demostrar a partir de distintos tipos de aproximaciones. Cuatro aspectos se han venido considerando en el estudio comparativo de ambos métodos.

Un criterio sería comparar los árboles generados con distintos tipos de datos (morfológicos con bioquímicos, por ejemplo), aunque los resultados, obtenidos hasta la fecha, no son concluyentes ya que las tasas de cambio evolutivo pueden ser muy distintas para caracteres diferentes (Farris, 1981).

Otro criterio sería simular una filogenia "verdadera" (simulación por computadora del cambio evolutivo), para comparar posteriormente los árboles generados por las distintas metodologías (Nei, 1981), concluyéndose que cualquier método puede dar errores si las ramas del árbol no son lo suficientemente largas. Nei y col. (1983) comparan cinco distancias genéticas y tres algoritmos (UPGMA, Wagner y Fitch y Margoliash (F-M) modificado por Farris), también con una filogenia simulada, encontrando que la mejor combinación es utilizar el análisis de cluster (UPGMA) con la distancia de Nei (1972).

Los otros dos criterios, el de "bondad en el ajuste" y el de estabilidad de las clasificaciones generadas, hacen referencia fundamentalmente al diseño de los algoritmos utilizados por cada uno de los dos métodos para reconstruir las filogenias.

La comparación directa de los diversos métodos mediante los estadísticos de bondad de ajuste, no permite según Swofford (1981) decidir cual es el mejor método para la estimación de los árboles filogenéticos, ya que algunos de ellos (F-M y Wagner) han sido diseñados expresamente para minimizar determinados criterios. Así un método que puede dar mejores árboles por un criterio, puede ser peor cuando lo evaluamos por otro. A pesar de ésto, dichos estadísticos han sido ampliamente empleados en la bibliografía para evaluar los árboles. Entre los más utilizados tenemos: la correlación cofenética, el porcentaje de desviación estándar

de Fitch y Margoliash (1967), el valor "f" de Farris (1972) y el valor "F" de Prager y Wilson (1976). Miden el grado en que las distancias "output" (distancia derivada en el árbol o distancia patrística) entre los OTUs reflejan las correspondientes distancias "input" (distancias observadas). La diferencia entre la distancia "output" y la distancia "input", ($O_{ij} - I_{ij}$), refleja la cantidad de "homoplasia" entre un par de taxones (Farris, 1972). Estos estadísticos se usan a menudo para escoger entre los diferentes árboles generados por un método único o para comparar los árboles generados por diferentes métodos.

Basándose en estos estadísticos, Prager y Wilson (1978) demuestran la superioridad del método de F-M en relación al UPGMA y al Wagner, aunque Swofford (1981) no encuentra suficiente justificación empírica para mantener esta afirmación, e incluso basándose en los mismos datos obtenidos por Prager y Wilson para la construcción de los árboles, y optimizando el método de distancia de Wagner diseñado para minimizar el valor F de estos autores, demuestra que el método de Wagner es superior al F-M y UPGMA. También Farris (1981) defiende la superioridad del método de Wagner sobre el de Prager y Wilson (F-M), comparándolos en términos de minimización del porcentaje de desviación estándar (SD). En general, los algoritmos de F-M son más seguros que los análisis UPGMA o que el método de Wagner para obtener las topologías de los árboles, mientras que el UPGMA da una estimación más precisa de las longitudes de las ramas (Avise, 1983).

Por último, la estabilidad taxonómica de una clasificación significa que ésta no se altera cuando incluimos nuevos caracteres, nuevos OTUs o al utilizar distintos algoritmos de semejanza taxonómica (Sokal, 1985).

La sensibilidad de los dos métodos ante la adición de nuevos caracteres o nuevos OTUs, viene determinada por la

expresión $n/(2t-3)$ (Sokal, 1985), donde n es el número de caracteres analizados y t el número de OTUs incluidos. Cuando el valor de este cociente es superior a 1 los cladogramas presentan más estabilidad que los fenogramas, y al contrario, cuando este valor es inferior a 1 las clasificaciones basadas en los fenogramas son más estables.

Así pues, en la práctica, la elección de uno u otro algoritmo, la elección de un método de distancia u otro (Rogers, 1986) o la combinación de ambos (Nei y col., 1983), depende de las restricciones previas que el autor esté dispuesto a admitir.

Por otra parte, no debemos olvidar que autores como Farris (1981) ante estas dificultades, ponen en entredicho la validez de los análisis cuantitativos basados en distancias genéticas, destacando la pérdida de información que supone pasar de frecuencias a distancias en los datos electroforéticos, aunque para Felsenstein (1984) es más grave el problema de asumir independencia y aditividad, criterios utilizados en la interpretación de las distancias.

II.7.3.- EL RELOJ MOLECULAR DE LA EVOLUCION

Si la teoría neutralista (Kimura, 1983) de la evolución molecular fuese correcta para un gran número de loci génicos, la evolución de las proteínas y del ADN serviría de "reloj" evolutivo. El grado de diferenciación genética entre las especies sería una medida de su relación filogenética y sería justificable reconstruir filogenias basadas en las diferencias genéticas. Además, el tiempo cronológico real de los diversos sucesos filogenéticos podría estimarse aproximadamente (Ayala y Kiger, 1984).

Esta teoría gira en torno al concepto de que la divergencia molecular progresa de un modo constante y se

fundamenta en considerar que la inmensa mayoría de las sustituciones nucleotídicas son equivalentes en cada lugar. La variabilidad enzimática detectada en las poblaciones se mantendría por un equilibrio entre la tasa de mutación y la fijación o extinción al azar de los alelos considerados selectivamente neutros. Por tanto, en una población de tamaño N , su fijación depende exclusivamente de la tasa de mutación (μ) y de la probabilidad de fijación al azar ($1/2N$). En el equilibrio, la tasa de sustitución de alelos neutros (k) es el producto del número total de mutaciones que se producen por generación ($2N\mu$) por su probabilidad de fijación ($1/2N$):

$$k = 2N\mu \cdot (1/2N) = \mu$$

La tasa de sustitución de los alelos neutros es precisamente la tasa con que se originan los alelos neutros por mutación, independientemente del tamaño de la población y de cualquier otro parámetro.

Además, cada gen o proteína representaría un reloj distinto, que suministra una estima independiente de los sucesos filogenéticos y del momento en que han ocurrido. Cada gen o proteína "cambiaría" a una tasa diferente -la tasa de mutación a alelos neutros, μ , del gen-, pero todos cronometrarían los mismos acontecimientos evolutivos. El resultado conjunto de varios genes o proteínas constituiría un reloj evolutivo bastante preciso.

La electroforesis detecta, como ya hemos visto, las sustituciones nucleotídicas (28%-30%) de las proteínas, por lo que se convierte en una herramienta eficaz para estos propósitos. Avise (1974) basa el valor sistemático de la electroforesis en la observación de que las poblaciones de una misma especie tienen identidad (I) alta y este valor disminuye al aumentar la divergencia taxonómica entre ellas.

El que sea o no correcta la teoría neutralista, y la exactitud del reloj molecular, son objeto de controversia en la actualidad. Tanto si la evolución molecular es estocásticamente constante como si no, parece que la heterogeneidad de las tasas evolutivas no es excesivamente grande (Ayala y Kiger, 1984). Por lo tanto, es posible usar los datos genéticos como un reloj evolutivo aproximado; pero para evitar grandes errores, es necesario usar tasas medias obtenidas de muchas proteínas y durante largos períodos de tiempo.

Las medidas de semejanza electroforética entre poblaciones o especies se pueden dar utilizando cualquiera de los métodos publicados de la estimación de la semejanza genética, identidad genética o distancia genética. Aunque el método más generalmente usado en poblaciones genéticas es el de Nei (1972) (Thorpe, 1983). El mismo autor compara las identidades genéticas de Nei (I) con la divergencia taxonómica en un gran grupo de vertebrados, invertebrados y plantas, mostrando que el conjunto de distribución de probabilidades estaba de acuerdo con lo predicho previamente. Los resultados obtenidos son compatibles con la existencia de un reloj molecular y queda patente que existe una relación general entre divergencia taxonómica y distancia genética, tal como se espera si ambos parámetros son función del tiempo evolutivo.

Esta noción de reloj molecular ha sido criticada por Farris (1981) sobre la base de los datos moleculares, indicando que las medidas de distancia no son indicadores precisos de los tiempos de divergencia (Felsenstein, 1984).

Para poner en marcha el "reloj molecular" tenemos que saber el tiempo geológico real de algún suceso de la filogenia. Esto se puede conseguir mediante el registro fósil, determinando posteriormente los tiempos de todos los

demás sucesos mediante simples proporciones. La mayoría de los calibrados se han realizado en vertebrados utilizando distancias inmunológicas. La correlación hallada entre la divergencias de las albúminas y el colágeno con los tiempos de divergencia fósiles, permiten calibrar indirectamente la relación entre estos parámetros. La técnica empleada es el radioinmunoensayo, la cual permite medir cuantitativamente el antígeno reaccionante en la reacción antígeno-anticuerpo producida (Selander, 1982).

Diversos estudios sobre vertebrados indican que una unidad de distancia inmunológica para la albúmina (AID) equivale aproximadamente a 0,54 millones de años. Utilizando las correlaciones encontradas entre los valores de AID y de la distancia de Nei (D), una unidad de D correspondería a 35 AID, es decir, una unidad de D equivale aproximadamente a 18,9 millones de años (18-20). Los valores medios de D para "especies" son de 0,2, lo cual corresponde a 3,8 millones de años (entre 2 y 7 millones de años) (Selander, 1982; Thorpe, 1982, 1983; Fontdevila, 1987). Aunque estos datos son valores medios para el grupo de vertebrados, Thorpe (1982) sugiere que siempre que sea posible, se realice una calibración independiente para el grupo de organismos a estudiar.

Wayne y O'Brien (1987) en un estudio realizado sobre la divergencia aloenzimática entre miembros de la familia Canidae, proponen un calibrado del reloj molecular para los cánidos, basado en el registro fósil del Canis davisii, al cual se le considera como el potencial antecesor de los grupos formados por los llamados "Cánidos con apariencia de lobos" que comprende los géneros *Canis*, *Lycaon* y *Speothos* y el grupo formado por los "Cánidos de Sudamérica" el cual lo integran los géneros del *Chrysocyon*, *Cerdocyon* y *Dusicyon* (Stains, 1975; Clutton-Brock y col., 1976). Asumiendo que la separación de estos dos grupos se produjo hace unos 7 millones de años, 0,1 unidades de distancia genética de Nei (D)

equivaldría aproximadamente a 2,5 millones de años, lo cual es similar a los valores estimados para otros grupos de vertebrados (Thorpe, 1982).

Aunque se ha encontrado una considerable variabilidad en la tasa de evolución protéica entre los vertebrados (Thorpe, 1982), los mismos autores arguyen que al estar la familia Canidae estrechamente emparentada, se puede pensar que la variabilidad en la tasa de evolución protéica entre los cánidos es pequeña. Esta constancia en la evolución protéica es sugerida por la correspondencia que existe entre los tiempos de divergencia y los datos estimados a partir del recuerdo fósil.

Otra aproximación se basa en las premisas de la teoría neutralista y asume una tasa de mutación homogénea para todos los loci usados en la estimación de (D). Entonces $(D) = (D') + 2\mu t$, donde μ es la tasa de mutación y (D') la distancia en el tiempo cero (podría asumirse $D' = 0$) con lo que $(D) = 2\mu t$, siendo (t) el número de años necesarios para producir una divergencia (D) entre las especies comparadas. Nei y Roychoudhury (1982) y Nei (1987), proponen que cuando las distancias son pequeñas ($D < 0,2$) el tiempo de separación viene dado por $t = D \times 5 \times 10$ millones de años si asumimos que 1/4 de las sustituciones se detectan electroforéticamente y $t = D \times 3,75 \times 10$ millones de años si se detectan 1/3 de ellas. La obtención de estas estimaciones en casos particulares como el de las Drosophilas de Hawaii, en las que para unos valores de $(D) = 0,01$ el tiempo de divergencia sería aproximadamente de unos 20.000 años, ponen de manifiesto el nivel de imprecisión asociado a este tipo de cálculos cuando se pretende su generalización (Sánchez, 1986).

III.8.- APORTACIONES BIOQUIMICAS SOBRE EL ORIGEN Y LAS RELACIONES FILOGENETICAS DE LOS CANIDOS

III.8.1.- GENERO CANIS

La filogenia de los cánidos ha sido analizada a través de hallazgos arqueológicos -morfología dental y craneal-, estudios históricos, cromosómicos y estudios comparativos de conducta (Studer, 1901; Antonius, 1922; Peters, 1969; Stains, 1975; Chiarelli, 1975; Olsen y Olsen, 1977; Clutton-Brock y col., 1976, 1984; Robinson, 1984; Wayne, 1986). Los distintos estudios han llegado a la conclusión de que el perro (Canis familiaris) desciende de un único antecesor: el lobo (Canis lupus).

A esta misma conclusión se ha llegado mediante estudios electroforéticos e inmunológicos de proteínas y enzimas sanguíneos, por comparación de los diferentes zimogramas de las especies y géneros estudiados.

Así, Vriesendorp (1972) comparando los antígenos de histocompatibilidad del perro con los de otros miembros de la familia Canidae, postuló que el perro y el lobo tenían un antecesor común.

Por su parte, Wong y col. (1974), no observaron diferencias en los patrones electroforéticos para el enzima Fosfoglucomutasa (PGM) entre lobos y perros domésticos. Los patrones electroforéticos de perros y lobos son muy similares, indicando un común antecesor evolutivo de las dos formas.

De una muestra de catorce enzimas analizados en el zorro, seis tienen zimogramas diferentes a los de los perros. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los enzimas

de los perros y los lobos. Respecto al enzima Glucosa fosfato isomerasa (GPI) los zimogramas de perro y lobo fueron diferentes a los de coyotes y chacales. Estos resultados indican, que el perro y el lobo están estrechamente emparentados y que pueden tener un antecesor común (Simonsen, 1976).

Fisher y col. (1976) realizaron un estudio comparativo, entre 12 lobos, 6 coyotes y 6 dingos, de los productos de 53 loci génicos, llegando a la conclusión de que existía un notable grado de similitud entre ellos.

Richkind y Richkind (1978) encontraron un alelo raro para el locus GPI, presente en cuatro de los 92 perros domésticos que analizaron, siendo probablemente el alelo GPI². Los lobos y los perros tienen el mismo alelo común GPI¹. Este alelo común en perros parece estar presente como alelo raro en la población de coyotes.

Previamente, Simonsen (1976) había observado un tipo electroforético, presumiblemente correspondiente al alelo GPI², en un ejemplar de coyote y en un chacal. El fenotipo GPI 2-1 fue observado en un híbrido perro-chacal. En dos lobos examinados sólo halló el fenotipo GPI-1. Fisher y col. (1976) encontraron cinco individuos homocigóticos y uno heterocigoto para el alelo GPI² en una muestra de seis coyotes y sólo encontraron el fenotipo GPI¹ en una muestra de 12 lobos y 6 perros.

También los zimogramas para el sistema Transferrina (Tf), fueron idénticos para perros y lobos (Clark y col., 1975; Juneja y col., 1981a), siendo muy diferentes en chacales y zorros. El patrón de los chacales mostraba una movilidad intermedia entre perros y zorros (Clark y col., 1975).

Braend y Røed (1987), en un estudio comparativo de 800 perros noruegos y 146 lobos de Alaska, no encontraron diferencias electroforéticas para los sistema Transferrina (Tf) y Arilesterasa (ArE).

Ferrel y col. (1980) hallaron el mismo patrón electroforético para el enzima Fosfatasa ácida (Pac), en una muestra compuesta por 428 perros, 60 coyotes y 221 lobos. Este resultado está de acuerdo con lo obtenido por Fisher y col. (1976). En la misma muestra observaron idéntico patrón para el locus Lactato deshidrogenasa A (LDH-A) que designaron como genotipo LDH¹A/LDH¹A. En uno de los 221 lobos examinados, encontraron el producto de un segundo alelo al que designaron LDH²A. No observaron, sin embargo, variación genética para el locus LDH-B en ninguna de las anteriores especies.

Asimismo, los patrones electroforéticos de Superóxido dismutasa (Sod) de coyotes y lobos fueron indistinguibles del alelo más común hallado en perros. Esto concuerda con otros estudios similares realizados por Baur y Schorr (1969), Simonsen (1976) y Fisher y col. (1976). En el mismo trabajo, Ferrel y col. (1980), encontraron polimorfismo para la Glucosa fosfato isomerasa (GPI) en perros, coyotes y lobos.

Juneja y col. (1981b) observaron que las movilidades electroforéticas de la Albúmina (Alb), la Proteína Gc (Gc), α_1 -Proteasa inhibidor (Pi-1) y Post-albúmina (Pa) -actualmente denominada α_1 B- eran idénticas en perros y lobos.

Una de las aportaciones más interesantes ha sido la realizada por Wayne y Ó'Brien (1987), estudiando las divergencias aloenzimáticas, relaciones filogenéticas y tiempos de divergencia entre 12 grupos de la familia Canidae,

mediante electroforesis en gel de 51 loci génicos, que corrabora la hipótesis de que el perro desciende del lobo. La menor distancia genética -de Nei (1972)- que separa al perro de cualquiera de los otros géneros era la correspondiente al lobo. Según estos autores, el perro (Canis familiaris) se separó de la línea del lobo (Canis lupus) hace aproximadamente unos 300.000 años, y el antecesor común de estos dos grupos con el coyote (Canis latrans) ya existía probablemente al final del Plioceno, hace ahora unos 2 millones de años.

En resumen, se acepta generalmente que el perro desciende del lobo, pero la gran diversidad de razas, características, tamaños, hace improbable que todas desciendan de un mismo tronco común. Tal como hemos comentado, Olsen y Olsen (1977), basándose en estudios comparativos de morfología dental a partir de hallazgos arqueológicos, postularon una serie de hipótesis de las diferentes ramas de lobos que dieron origen a las actuales razas de perros.

II.8.2.- ESPECIE CANIS FAMILIARIS

Si nos adentramos ya, específicamente, en la especie Canis familiaris, comprobamos que los estudios filogenéticos realizados mediante metodología numérica son más bien escasos, quizá debido a la dificultad que entraña inferir filogenias fiables a partir de distancias genéticas muy pequeñas, como veremos en posteriores apartados.

Uno de los primeros trabajos realizados fue el de Leone y Anthony (1966) quienes compararon mediante técnicas inmunoelectroforéticas la actividad enzimática de las Esterasas aromáticas y las Colinesterasas, de una muestra sérica de 110 perros, representantes de 40 razas. Mediante computador se construyeron los dendrogramas de las diferentes razas de acuerdo con sus cualidades enzimáticas. Los

coeficientes de correlación determinados de la distribución y actividad de cada enzima entre las razas, indicaban un 66% de concordancia entre los datos derivados y la presumible genealogía de los perros.

En el periodo 1974-1978 se realizaron varios trabajos que intentaron inferir las relaciones filogenéticas entre distintas razas, a partir de las frecuencias génicas de determinadas proteínas y enzimas. Así, Tanabe y col. (1974) usando una combinación de los grupos definidos por Studer (1901) y Antonius (1922), propusieron una clasificación a partir de las diferencias encontradas por electroforesis de un enzima de la sangre, la Leucin aminopeptidasa (Lap). Reconocieron cinco grupos más uno extra, formado por los perros japoneses. Son los siguientes:

1. Perros nativos japoneses
2. *C.familiaris palustris*
3. *C.familiaris metris-optimae*
4. *C.familiaris intermedius*
5. *C.familiaris inostranzewi*
6. *C.familiaris leineri*

Las razas caninas incluidas en el grupo palustris (Pomeranian, Pug, Spitz y varias razas de Terriers) y en el grupo metris optimae (Pastor Alemán, Collie, Pastor de Shetland y Bobtail), tenían fijado el alelo Lap^A. Se observaron mayores frecuencias del alelo Lap^B (0.17) en los grupos inostranzewi (San Bernardo, Bulldog, Boxer, Gran Danés y Doberman Pinsher) y leineri (Afghanhound y Borzoi) y se obtuvieron valores medios en el grupo intermedius, Lap^B (0.04), (Pointer, Dálmata, Setter, Dachshund, Beagle, Poodle, Chin, Pekinés, Maltés y Cocker Spaniel) y en el grupo de los perros nativos Japoneses, Lap^B (0.02), (Akita, San in-Shiba, Shinshu-Shiba, Kai y Kishu). Este trabajo indica que es posible encontrar una correlación entre los grupos.

basada en estudios enzimáticos y estudios morfológicos (Simonsen, 1976).

La importancia de los polimorfismos bioquímicos en el estudio de la evolución de las diferentes razas, quedó patente en el trabajo de Tanabe y col. (1978) con el estudio de las variantes genéticas de la Hemoglobina (Hb) en eritrocitos caninos. Sólo se observó el alelo Hb^A en razas caninas japonesas (7 de las 8 estudiadas), y no se observó en ninguna de las 25 europeas y 5 orientales (excepto japonesas), teniendo éstas por tanto fijado el alelo Hb^B. Esto sugiere que las razas japonesas se originaron de un tipo ancestral común, el cual poseía ambos alelos de hemoglobina el A y el B, mientras que las razas europeas se originaron de un grupo ancestral que no poseía el alelo A.

Similares conclusiones se obtienen en otros trabajos de los mismos autores (Tanabe y col. 1977), como por ejemplo el referente a la Glucosa fosfato isomerasa (GPI): el alelo GPI^B sólo se ha encontrado en seis razas caninas japonesas y en ninguna de las europeas, a excepción del Dálmata.

Estudios genéticos realizados sobre las Esterasas resistentes a eserina (Es) en plasma de perros (Sugiura y col. 1977) muestran que el alelo Es^C sólo se halla presente en cinco razas caninas japonesas (de un total de ocho razas) y en ninguna de las 30 razas europeas estudiadas, excepto el Spitz. Todos estos resultados indican una marcada diferencia de la constitución genética de las razas nativas japonesas con respecto a las europeas.

Juneja y col. (1981b) a partir de la distribución de frecuencias del sistema Pa -actualmente α_1 B- clasifican las razas estudiadas en tres grandes grupos. Las razas del primer grupo (Cocker Spaniel, Collie, Golden Retriever, Newfoundland y San Bernardo) poseían el alelo Pa^F como el

más común, las razas del segundo grupo (Basenji, Basset Hound, Beagle y Boxer) tenían el alelo Pa^S como el más frecuente, mientras que las razas del tercer grupo (Dachshund, Pastor Alemán, Poodle y Terrier) poseían los alelos Pa^F y Pa^S con igual frecuencia. Además, se realizó una comprobación con muestras de las mismas razas provenientes de un área geográfica distinta (Dinamarca "versus" Hannover): los resultados obtenidos estaban en buena concordancia con los valores de frecuencias descritos.

Hashimoto y col. (1984), mediante Cromatografía en capa fina, describen un nuevo polimorfismo, al que designan tentativamente como Gangliósido monooxigenasa (Gmo), en eritrocitos caninos, regulado por un alelo dominante en un locus autosómico. El alelo dominante Gmo^G expresaba el Ácido N-glicolilneuramínico (tipo G) en el azúcar terminal de diferentes tipos de Ácido siálico, mientras que el alelo recessivo Gmo^A expresaba el Ácido N-acetilneuramínico (tipo A). En ese estudio analizaron 1.591 muestras sanguíneas pertenecientes a 36 razas caninas, y demostraron que el alelo Gmo^G estaba limitado a sólo algunas razas caninas orientales. Sin embargo la incidencia de dicho alelo era mucho más alta en razas del norte de China, Corea y sur del Japón, que en otras razas orientales. La raza canina japonesa Hokkaido era la única que no expresaba el gen Gmo^G, al igual que las razas del sur de China (3) y todas las Europeas analizadas (31).

Estos resultados sugieren que las razas nativas del sur del Japón provienen del norte de China vía península de Corea, y que la raza Hokkaido (norte de Japón) proviene del sur de China vía Taiwan. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad, según los autores, de que el Hokkaido provenga de Europa ya que en dichas razas sólo se ha encontrado el tipo A.

Estas hipótesis fueron corroboradas por Kobayashi y col. (1987) mediante el estudio electroforético de 26 sistemas enzimáticos en 31 razas. Los datos obtenidos fueron tratados para calcular las distancias genéticas, usando la ecuación de Nei, y con ellos se construyó un dendrograma. Asimismo se realizaron análisis de componentes principales en dos y tres dimensiones. Las conclusiones a que llegaron fueron las mismas que Hashimoto y col. (1984), pero además incluyeron en el eje norte de Japón (Hokkaido) - sur de China - Taiwan, a los perros nativos de Bangladesh, reafirmando la hipótesis de que las razas del norte de Japón provienen del sur de Asia. El dendrograma mostraba una marcada relación entre las razas con un hipotético origen surasiático y las europeas y por el contrario, una marcada divergencia con las integrantes del eje norte de China - Corea - sur de Japón.

Ejima y col. (1986), analizando diferentes grupos sanguíneos (DEA 1, DEA 3, DEA 6, D y J1), también confirman la divergencia genética existente entre razas nativas japonesas y europeas, concretamente en el grupo D en el que las razas japonesas mostraban una elevada frecuencia del gen D¹, mientras que las europeas lo hacían respecto del D². También el sistema DEA 3 mostraba marcadas diferencias, la frecuencia del gen DEA 3⁺ era elevada en razas japonesas siendo por el contrario muy baja en las europeas, llegando incluso 9 de las 12 razas a tener fijado el gen DEA 3⁻.

Por lo expuesto en este apartado, podemos comprobar que las técnicas electroforéticas pueden ser un instrumento eficaz que complemente los datos obtenidos por otras vías, como los hallazgos arqueológicos, históricos, estudios morfológicos, cromosómicos, de conducta, etc., para así poder inferir las posibles relaciones filogenéticas entre las diversas razas caninas.

III.- MATERIAL Y METODOS

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- ANALISIS MORFOLOGICO

III.1.1.- CARACTERES MORFOLOGICOS. MATRIZ DE SEMEJANZAS MORFOLOGICAS

A efectos de realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los datos obtenidos a partir de caracteres morfológicos, de las nueve razas reconocidas por la Federación Cinológica Internacional (FCI) como son Gos d'Atura, Mastín de los Pirineos, Mastín Español, Perdiguero de Burgos, Galgo Español, Sabueso Español, Ca de Bestiar, Podenco Ibicenco y Podenco Canario y otra, no reconocida aún, como es el Podenco Ibérico, se han considerado un total de treinta y dos caracteres morfológicos, establecidos a partir de sus estándares oficiales y de una revisión de lo publicado por Avila (1982), I Symposium Nacional de las Razas Caninas Españolas (1982), Gómez-Toldrà (1985), Sotillo y Serrano (1985) y Delalix (1986). Los caracteres utilizados y el estado de los mismos se muestran en la Tabla III.1.

El análisis cualitativo de caracteres discretos, requiere que éstos sean codificados en series (0,1) es decir, con dos estados. Como no conocemos su ancestralidad, en los caracteres multiestado se ha hecho la siguiente transformación:

Carácter con tres estados (0, 1 y 2)

<u>estado del carácter</u>	<u>estado en el programa</u>
0	00
1	10
2	01

Tabla III.1.- Caracteres y estados de los mismos, utilizados en la construcción de la matriz de semejanzas morfológicas

(A) <u>Variaciones de peso</u>	(B) <u>Proporciones long/anch</u>
0. Eumétrico	0. Longilineo
1. Hipermétrico	1. Mesolineo
2. Elipométrico	2. Brevilineo
(C) <u>Perfil craneal</u>	(D) <u>Alzada a la cruz</u>
0. Subconvexo	0. ≤ 55 cm.
1. Convexo	1. 58 - 62 cm.
2. Rectilineo	2. 63 - 67 cm.
3. Cónvexo	3. 68 - 75 cm.
	4. > 75 cm.
(E) <u>Relación cráneo/cara</u>	(F) <u>Líneas cráneo faciales</u>
0. 1,00 - 1,10	0. Paralelas
1. 1,11 - 1,20	1. Divergentes
2. 1,21 - 1,30	2. Convergentes
3. 1,31 - 1,40	
4. 1,41 - 1,50	
(G) <u>Cresta Occipital</u>	(H) <u>Stop</u>
0. Marcada	0. Marcado
1. Ligeramente marcada	1. Moderado
2. Nula	2. Ligeramente marcado
	3. Nulo
(I) <u>Perfil de la cara</u>	(J) <u>Posición de los dientes</u>
0. Recto	0. Cierre en tijera
1. Subconvexo	1. Cierre en pinza
2. Convexo	
(K) <u>Inserción de las orejas</u>	(L) <u>Posición de las orejas</u>
0. Alta (encima línea ojos)	0. Caídas
1. Media (misma altura)	1. Erectas
2. Baja (debajo línea ojos)	2. Dobladas
(M) <u>Tamaño de las orejas en relación a la cabeza</u>	(N) <u>Forma de los ojos</u>
0. Pequeñas	0. Redondeados
1. Medianas (Proporcionadas)	1. Almendrados
2. Grandes	2. Oblicuos
(O) <u>Color de los ojos</u>	(P) <u>Color de la Trufa</u>
0. Avellana (oscuros)	0. Negra
1. Ambar	1. Carne
	2. Marrón
	3. Varios



Tabla III.1.- Continuación

(P) <u>Labios</u>	(Q) <u>Comisura labial</u>
0. Rectos	0. No evidente
1. Sup.cubre justo al inf.	1. Moderada
2. Sup.cubre al inferior	2. Marcada
(R) <u>Relajación del párpado inf.</u>	(S) <u>Línea dorsal</u>
0. No	0. Recta
1. Moderada	1. Liger. ensillada
2. Marcada	2. Liger. encarpada
(T) <u>Papada en cuello</u>	(U) <u>Punta del esternón</u>
0. Presente	0. Liger. pronunciada
1. Ausente	1. Pronunciada
(V) <u>Espaldas</u>	(W) <u>Cruz</u>
0. Ligeramente oblicuas	0. Simplemente marcada
1. Oblicuas	1. Bien definida
2. Rectas	
(X) <u>Piel</u>	(Y) <u>Pelo</u>
0. Tensada	0. Largo
1. Con pliegues	1. Corto
	2. Liso
	3. Varios
(Z) <u>Vientre</u>	(A') <u>Espolones</u>
0. Poco recogido	0. Con
1. Recogido	1. Sin
2. Muy recogido	2. Con o sin
(B') <u>Membrana interdigital</u>	(C') <u>Inserción de la cola</u>
0. Sin	0. Alta
1. Moderada	1. Media
2. Marcada	2. Baja
(D') <u>Forma de la cola</u>	(E') <u>Forma del pie</u>
0. Caída (espada)	0. De gato
1. Sable	1. De liebre
2. Hoz	
3. Amputada	

Carácter con cuatro estados (0, 1, 2 y 3)

<u>estado del carácter</u>	<u>estado en el programa</u>
0	000
1	100
2	010
3	001

y así sucesivamente.

Las matrices de semejanzas morfológicas, sin efectuar la transformación y con los datos codificados se muestran en las Tablas III.2. y III.3. respectivamente.

III.2.- ANALISIS BIOQUIMICO

III.2.1.- POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS

Para la medida de la variabilidad genética de las diferentes razas analizadas y para el estudio de la similitud o divergencia genética entre dichas poblaciones, se han utilizado los valores de las frecuencias alélicas de una muestra de genes representativos del genoma, correspondientes a genes neutros estructurales que codifican para proteínas y enzimas solubles de la sangre, detectados mediante técnicas electroforéticas.

Según Lewontin (1979), analizar un gran conjunto de loci, es más importante incluso que muestrear un gran número de individuos. La experiencia con los estudios electroforéticos indica que una muestra de unos veinte loci génicos es usualmente suficiente, pues los valores estimados suelen cambiar poco cuando el número de loci excede de veinte (Séger y Lucotte, 1981; Ayala y Kiger, 1984).

Tabla III.2.- Matriz de semejanzas morfológicas

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	A'	B'	C'	D'	E'
GOS D'ATURA	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	2	0			
MASTIN PIRINEOS	1	1	0	4	2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1	0	1	1	1	0	0	2	1	1	1			
MASTIN ESPAÑOL	1	1	1	4	4	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1	0	1	1	1	1	0	2	1	1	1			
CA DE BESTIAR	1	1	0	3	0	1	0	0	0	0	2	0	1	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	2	1	1			
GALGO ESPAÑOL	0	0	0	2	1	1	2	2	0	2	1	1	0	0	1	0	0	2	1	1	1	0	0	2	2	1	1	2	2			
PERDIGUERO BURGOS	0	1	1	2	1	1	1	2	1	0	1	0	2	1	0	2	2	2	2	0	0	1	0	1	1	2	0	1	1	3		
SABUESO ESPAÑOL	0	0	1	2	0	1	1	2	1	0	2	0	2	1	0	3	2	2	1	1	0	1	1	0	1	2	0	2	1	1		
PODENCO IBICENCO	0	0	1	3	0	1	0	2	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	3	1	1	0	2	0		
PODENCO CANARIO	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	1	1	2	1	3	0	0	0	1	0	1	1	0	2	1	1	0	2	0		
PODENCO IBERICO	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0	1	1	0	0	3	1	1	0	1	0	1			

Tabla III.3.- Matriz codificada de semejanzas morfológicas

GOS D'ATURA	01000	01110	10000	00001	00000	00001	00000	00000	00000	00000	00000	00101	000
MASTIN PIRINEOS	11010	00011	11000	01010	01000	00001	01000	00101	10100	00000	11010	100	
MASTIN ESPAÑOL	11110	00011	11000	01000	11000	00001	01000	00101	10101	00000	11010	100	
CA DE BESTIAR	11010	00001	10100	10000	00000	00010	01000	00110	00001	00001	00000	010	
GALGO ESPAÑOL	00011	00111	00101	00100	00101	00011	01000	01000	00010	10011	01001	010	
PERDIGUERO BURGOS	01111	00010	11001	00100	00110	10000	11001	00101	01000	10001	01010	001	
SABUESO ESPAÑOL	00111	00011	01001	00000	00110	01000	11000	10101	10100	10000	11010	100	
PODENCO IBICENCO	00110	01111	10100	10000	00100	00101	00110	00000	00000	01101	00001	000	
PODENCO CANARIO	00110	01101	10010	00000	00100	00101	00100	10000	00000	10101	00001	000	
PODENCO IBERICO	00011	00110	00110	00000	00100	10101	00000	10000	00000	01101	00010	000	

Los veintiún sistemas electroforéticos analizados en nuestro estudio han sido los siguientes: Superóxido dismutasa (Sod), Glucosa fosfato isomerasa (GPI), Leucina aminopeptidasa (Lap), 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-Pgd), Manosa fosfato isomerasa (MPI), Fosfoglucomutasa-1 (PGM₁), Malato deshidrogenasa forma soluble (MDH_S), Malato deshidrogenasa forma mitocondrial (MDH_M), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), Albúmina (Alb), Peptidasa D (Pep-D), Fosfatasa ácida (Pac), Transferrina (Tf), Prealbúmina (Pr), Proteína Gc (Gc), α_1 -B-Glicoproteína (α_1 -B), α_1 -Proteasa inhibidor (Pi-1), Proteasa inhibidor-3 (Pi-3), Postalbúmina-1 (Pa-1), Pretransferrina-1 (Prt-1) y Pretransferrina-2 (Prt-2).

III.2.2.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y SUBDIVISION DE LAS POBLACIONES

III.2.2.1.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Cuando se quiere medir la variabilidad electroforética de una población, el número de individuos analizados debe ser suficientemente importante, de manera que las desviaciones debidas al muestreo sean mínimas. Ya se ha comentado que en la práctica de 40 a 50 individuos es un mínimo suficiente (Séger y Lucotte, 1981). Nei (1987) sugiere que si el número de loci estudiados es cercano a 25, son suficientes de 20 a 30 individuos analizados.

Las dos condiciones, referentes al número de loci e individuos analizados, se cumplen en nuestro estudio, a excepción del número requerido de individuos en la raza del Podenco Canario (15), debido a dificultades materiales, personales y asociativas.

Se han recogido un total de 484 muestras sanguíneas correspondientes a las razas en estudio, durante el periodo

que va desde el 1 de Junio de 1986 -fecha de la primera extracción- hasta el 9 de Octubre de 1988 -fecha de la última extracción-. Las muestras se distribuyen por razas de la siguiente manera:

(GA1) GOS D'ATURA:	93 individuos
(MP2) MASTIN PIRINEOS:	55 "
(ME3) MASTIN ESPAROL:	45 "
(PB4) PERDIGUERO DE BURGOS:	42 "
(GE5) GALGO ESPAROL:	31 "
(SE6) SABUESO ESPAROL:	53 "
(CB7) CA DE BESTIAR:	46 "
(PE8) PODENCO IBICENCO:	71 "
(PC9) PODENCO CANARIO:	15 "
(PI10) PODENCO IBERICO:	33 "

Se ha intentado, dentro de lo posible, muestrear individuos de muy diversas procedencias, labor que no ha sido fácil en algunos casos. La localización geográfica de los individuos, reseñada por razas, se muestra en la Tabla III.4 del Apéndice.

III.2.2.2.- SUBDIVISION DE LAS POBLACIONES

Para poder realizar el análisis intrarracial de las poblaciones estudiadas y así conocer mejor la estructura genética de cada población, lo que nos servirá posteriormente para discutir e intentar aclarar las posibles relaciones filogenéticas resultantes entre las diferentes razas, hemos subdividido cada población en varias subpoblaciones, basándonos para ello en criterios geográficos, en algunos casos, y en áreas de influencia de determinados criadores, en otros. En este último caso, a las subpoblaciones se les ha asignado el nombre de la localidad o zona de influencia, para mantener en el anonimato a personas o instituciones. La raza Gos d'Atura se ha subdividido en dos variedades, la que llamamos Típicos (pelo largo) y la denominada Cerdà (variedad de pelo corto), aunque oficialmente no está reconocida como tal. Las dos subpoblaciones de la raza Podenco Canario,

**Tabla III.5.- Distribución por razas y subpoblaciones
del material analizado**

Razas	Subpoblaciones
GA. Gos d'Atura (93)	GA1. Típico (59) GA2. Cerdà (34)
MP. Mastín Pirineos (55)	MP1. Zaragoza (36) MP2. Benabarre (11) MP3. Resto (08)
ME. Mastín Español (45)	ME1. Prat-Resto (15) ME2. Barna-Norte (16) ME3. Madrid (14)
PB. Perdiguero de Burgos (42)	PB1. Barcelona (19) PB2. Resto (23)
GE. Galgo Español (31)	GE1. Catalunya (21) GE2. Resto (10)
SE. Sabueso Español (53)	SE1. Catalunya (25) SE2. Asturias (28)
CB. Ca de Bestiar (46)	CB1. Mallorca (20) CB2. Palma (13) CB3. Resto (13)
PE. Podenco Ibicenco (71)	PE1. Catalunya (41) PE2. Baleares (30)
PC. Podenco Canario (15)	PC1. PC1.I (07) PC2. PC2.P (08)
PI. Podenco Ibérico (33)	PI1. Urgell (10) PI2. Garrigues (17) PI3. Resto (06)

(-) Las cifras entre paréntesis representan el número de individuos muestreados

al no disponer de datos de los individuos, se han construido mediante un criterio puramente aleatorio.

En la Tabla III.5 se muestra la subdivisión de las diferentes razas.

III.2.3.- OBTENCION, PROCESADO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Mediante jeringas desechables se han recogido las muestras sanguíneas, a partir de las venas de uso normal para una toma de muestras -cefálica o tibial-. Comprobamos que la cantidad óptima de sangre extraída no debía ser inferior a 5 ml. (7-8 ml.), ya que la técnica de separación de glóbulos blancos precisaba un cierto volumen debido a su menor concentración.

Una vez extraída la sangre, se introducía en tubos de plástico o de vidrio siliconado, para evitar que con el uso de tubos de vidrio normal los leucocitos polimorfonucleares quedaran adheridos a sus paredes, con lo cual se agravarían las pérdidas de células blancas (Gella y col., 1979). Estos tubos contenían el anticoagulante en su interior.

El anticoagulante de elección es EDTA 2Na (1 mg. por 1 ml. de sangre), ya que según Gella y col. (1979) minimiza la agregación plaquetaria sobre los leucocitos, aconsejable si se siguen técnicas que precisan de centrifugación.

Las muestras extraídas pueden guardarse en nevera a 4-7°C. Para que el proceso de separación de las distintas fracciones sea óptimo, se aconseja realizarlo antes de transcurridos 3 ó 4 días. Sin embargo, se realizaron diferentes pruebas de almacenaje y procesado, llegando incluso hasta los 8 - 10 días con resultados satisfactorios.

El procesado de las muestras requiere la separación y posterior almacenaje de tres componentes principales de la sangre: plasma o suero, células rojas o eritrocitos y células blancas o leucocitos. El proceso que hemos seguido para ello es el siguiente:

Las muestras sanguíneas se centrifugan a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. Posteriormente se separa el suero, mediante pipeta Pasteur, y se almacena en tubos Eppendorf. Asimismo, con pipeta Pasteur, se separa la capa de glóbulos blancos. Es importante tomar una buena muestra de éstos aunque en ella incluyamos una elevada cantidad de glóbulos rojos, ya que luego éstos se lisan perfectamente con solución amónica.

El suero y los glóbulos blancos sobrantes los desecharmos con la ayuda de una trompa de vacío, con lo cual nos quedan dos tubos que contienen células sanguíneas, uno de glóbulos rojos y otro de glóbulos blancos. Para cada uno de ellos seguimos técnicas separadas.

Lavamos la suspensión de glóbulos rojos 2 ó 3 veces con una solución isotónica de ClNa (0,85%) a pH = 7,4:

NaCl	8,5 gr
Na ₂ HPO ₄	0,1 gr
KH ₂ PO ₄	0,1 gr
H ₂ O dest. hasta	1,0 litro

Se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos y se retira el sobrenadante con el fin de eliminar células lisadas e impurezas. Con la ayuda de una micropipeta, se toman 500 μ l de muestra y se almacenan en tubos Eppendorf, convenientemente numerados; asimismo se añade igual volumen de agua destilada para provocar, junto con la congelación y descongelación, la lisis de los glóbulos rojos.

A la muestra de **glóbulos blancos** le añadimos aproxi-
madamente 4 ml. de la solución hemolítica (Ansay y Hanset,
1972, modificada), compuesta de:

NH ₄ Cl	8,3 gr
NaHCO ₃	1,0 gr
EDTA	37,0 mg
H ₂ O dest. hasta	1,0 litro

El pH se ajusta a 7,4 mediante una solución de TRIS
(hidroximetil-aminoetano) al 0,1%.

La finalidad de esta solución es lisar los glóbulos rojos y evitar, en lo posible, la contaminación eritrocitaria. Si los análisis electroforéticos se realizaran poco tiempo después de la llegada de las muestras al laboratorio, la lisis de los glóbulos rojos no sería imprescindible, ya que los enzimas que se hallan en los leucocitos mostrarian un buen nivel de actividad y una pequeña muestra de los mismos bastaría para la identificación de las bandas electroforéticas. Pero como ésto no es siempre posible, debemos procurar que la mayor parte de células que se impregnen en el papel de inserción sean mayoritariamente glóbulos blancos, para así poder detectar los posibles electromorfos en el caso de que la actividad enzimática disminuya.

Para ello dejamos actuar la mezcla durante 5 minutos en nevera a 4°C. Posteriormente se centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos y con la ayuda de la trompa de vacío retiramos el sobrenadante -el cual contendrá en suspensión los glóbulos rojos lisados-. En el fondo del tubo, pegado al mismo, nos queda el botón de glóbulos blancos.

Las células blancas así obtenidas, se lavan con solución salina isotónica. Homogeneizamos el contenido y centrifugamos durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. Según la cantidad

de glóbulos blancos obtenidos, añadimos a la muestra entre 150 y 250 μ l de agua destilada. Volvemos a homogeneizar y con una pipeta Pasteur lo trasvasamos a tubos Eppendorf.

Las muestras de suero, glóbulos rojos y glóbulos blancos, se almacenan, debidamente etiquetadas, en congelador a una temperatura de -20°C hasta el momento de su análisis.

III.2.4.- TECNICAS ELECTROFORETICAS

III.2.4.1.- TECNICAS GENERALES

Vamos a detallar a continuación la metodología general de las tres técnicas básicas empleadas en el presente trabajo, que son la electroforesis horizontal en gel de almidón, electroforesis en gel de agarosa y electroforesis en gel de poliacrilamida. Aunque no hemos utilizado específicamente la electroforesis en gel de agarosa para ninguno de los sistemas descritos, ésta es parte integrante de la técnica de electroforesis bidimensional, usada extensamente en nuestro estudio, que combina la técnica sobre gel de agarosa con la técnica electroforética sobre soporte de poliacrilamida.

III.2.4.1.1.- Electroforesis horizontal en gel de almidón

En un erlenmeyer de 1 litro de capacidad se coloca una cantidad de almidón hidrolizado que depende del polimorfismo que se investiga y del grado de hidrólisis de cada lote de almidón. A continuación se vierten 275 ml de solución tampón -la composición de esta solución varía según el polimorfismo- y se agita vigorosamente la mezcla hasta comprobar que todo el almidón ha pasado a constituir una suspensión. Se coloca el erlenmeyer a la llama de un mechero Bunsen, agitando constante y vigorosamente. Al principio, la suspensión va espesándose, dando una masa opaca y densa que se va

haciendo fluida y transparente, comenzando a formarse las primeras burbujas de la ebullición. En este preciso momento se retira el erlenmeyer del fuego, se cierra y se somete a la acción del vacío, lo que da lugar a una ebullición vigorosa del contenido, manteniéndose en este estado durante 1 minuto. A continuación se desconecta el vacío y se vierte la mezcla sobre un molde, con mucho cuidado para evitar la formación de burbujas de aire que darían lugar a un gel heterogéneo que impediría el paso de la corriente eléctrica por determinados puntos.

El molde usado es una placa de metacrilato de 430 x 170 x 30 mm., provista de dos tiras longitudinales de 3,5 cm. de ancho y 5 mm. de grosor que configurará un molde de 430 x 100 x 5 mm., provisto en su interior de un serpentín refrigerante. Los extremos de la placa se cierran con varillas de metacrilato de 100 x 10 x 5 mm. que evitan las pérdidas de almidón mientras dura la gelificación -aproximadamente 1 hora-, estas varillas se retiran al iniciarse la electroforesis. El gel resultante, de 5 mm. de grosor, es refrigerado a 4°C. mediante un criostato provisto de una bomba de circulación para el líquido refrigerante. La refrigeración no debe iniciarse antes de que haya transcurrido al menos una hora desde el vertido del gel en la placa, para asegurar una gelificación completa y homogénea.

Posteriormente se practican a una distancia variable de la base del gel, que depende del polimorfismo, ranuras de 8 mm. de anchura con la ayuda de una espátula, para fijar los lugares donde se insertarán las muestras. Rutinariamente se pueden analizar unas 40 muestras en un gel de estas dimensiones. Es conveniente dejar 2 ó 3 cm. libres de muestra en el centro del gel para facilitar el corte en dos, al realizar la tinción.

Las muestras, consistentes en rectángulos de papel Whatmann 3MM de 6 x 8 mm., empapados en suero, fracción eritrocitaria o leucocitaria de sangre a analizar, se insertan en las ranuras dispuestas al efecto en el gel. El tiempo de migración se mide por la movilidad de una disolución de azul de Bromofenol con la que se marcan las muestras extremas del gel.

Los electrodos -de hilo de platino- se colocan en una cubeta de 500 x 80 x 80 mm. con 1.000 ml. del tampón adecuado y se conectan a una fuente de electroforesis provista de control para el voltaje y la intensidad. El tiempo de duración de la electroforesis oscila entre 4 y 6 horas según los sistema analizados, manteniéndose durante todo este tiempo la placa refrigerada a 4°C.

Finalizada la electroforesis, se procede al corte del gel en una plataforma de metacrilato provista de guías longitudinales de 2,5 mm. de grosor, por las que se desliza un filamento metálico de 0,2 mm. de diámetro, con lo cual se obtienen dos mitades de gel por muestra, realizándose la tinción por su cara interna, es decir, la superficie del corte.

Una vez añadida la solución de tinción, los geles se incuban en una estufa a 37°C hasta la aparición de las bandas correspondientes. Para detener la reacción de tinción y conservar los geles, se retira dicha solución y se añaden 100 ml de solución fijadora (alcohol metílico : agua : ácido acético en proporción 5:5:1) durante unas 8 horas. Tras su secado los geles se pueden conservar en estas condiciones a 4°C durante varios meses.

III.2.4.1.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

III.2.4.1.2.1.- Preparación de los moldes

Para la confección de un gel de poliacrilamida utilizamos dos vidrios rectangulares de 300 x 260 x 5 mm. Los limpiamos con alcohol etílico y acetona y a continuación colocamos entre ellos una tira de plástico flexible en forma de U, siendo las medidas de los dos lados cortos 260 x 20 x 2 mm. y la del lado largo 300 x 230 x 2 mm., con lo que se origina una cámara de 260 x 230 x 2 mm. donde se alojará la solución que posteriormente dará lugar al gel.

Seguidamente colocamos una serie de cinco pinzas en cada uno de los lados del molde, a excepción del superior que quedará abierto para la posterior introducción de la solución que va a gelificar.

III.2.4.1.2.2.- Confección de las soluciones base

Las soluciones de trabajo para la confección de los geles de poliacrilamida son tres y las designamos con las letras A, B y C respectivamente. El método seguido, aunque con ligeros retoques de nuestro laboratorio, es el propuesto por Gahne y col., (1977), modificado por Juneja y Gahne (1987b).

1.- Solución de acrilamida (A). Contiene 160 gr de acrilamida y 4 gr de N,N'-metilén-bisacrilamida, disueltos en agua destilada hasta completar un volumen de 500 ml. No es necesario el filtrado de esta solución, la cual se almacena en frigorífico a 4°C, siendo estable por un período no inferior al mes. Este procedimiento obvia la necesidad de pesar con asiduidad la acrilamida y bis-acrilamida, ambas de efectos neurotóxicos.

2.- Solución tampón TRIS-cítrico (B). 45 gr de TRIS y 10 gr de ácido cítrico monohidrato, disueltos en un volumen final de 500 ml. La solución se almacena igualmente a 4°C.

3.- Solución de persulfato amónico (C). Es una solución de 2 mg/ml de agua destilada que hay que preparar justo antes de su uso.

III.2.4.1.2.3.- Confección de los geles

El gel de poliacrilamida consta de tres capas con diferente concentración de acrilamida, 8%, 4% y 12%, ocupando un volumen de 10,4 cm³, 20,8 cm³ y 83,2 cm³ respectivamente. La composición de la solución para un gel es la siguiente:

Concentración de acrilamida %	Solución de trabajo (ml)			Agua dest. (ml)	TEMED (μl)	Volumen (ml)
	A	B	C			
12	20	13.5	13.5	7	40	54
4	2	2	4	8	12	16
8	2	1	2	3	6	8

Primero se introduce la solución del 8%, hasta ocupar una banda de 2 cm. de anchura, contados a partir del inicio del gel. A continuación ponemos de 1 a 2 ml. de isobutanol, que no es soluble en la solución y que al ser menos denso que ésta se sitúa en la parte superior del gel, con lo que evitamos el contacto de éste con el aire, lo que nos llevaría a una mala polimerización del mismo. Al cabo de 15 minutos aparece una fina, pero marcada, banda de 1 - 2 mm. por debajo de la interfase poliacrilamida - isobutanol debida a que los 1 - 2 mm. superiores de la solución de

poliacrilamida no han polimerizado, que nos indica que la capa del 8% ha polimerizado.

Acto seguido se introduce la solución del 4% hasta formar una zona de 4 cm. de anchura, contados desde el final de la capa del 8%. El isobutanol se va situando encima de la capa del 4%, realizando de nuevo la función antes comentada. Despues de la polimerización añadimos la última capa, la del 12% de concentración. Cuando ésta ha polimerizado sacamos el isobutanol -o dejamos que se evapore-, cerramos con papel Parafilm* el lado abierto e introducimos los geles en una bolsa de plástico, almacenándolos posteriormente en frigorífico a 4°C. Los geles son estables, en estas condiciones, durante un plazo mínimo de dos semanas.

III.2.4.1.2.4.- Aplicación de las muestras

Quitamos las pinzas del molde y con ayuda de un escarpelo levantamos uno de los cristales, quedando el gel encima del otro. Posteriormente se retira la pieza en forma de U.

En el centro de la capa del 4% se coloca una guía de plástico flexible de 26 cm. de longitud, señalizada centímetro a centímetro. Las muestras -en nuestro caso suero canino- se empapan en papeles Whatman 3MM de 3 x 8 mm. y se disponen horizontalmente en la zona del 4% perfectamente alineadas y sirviéndonos de guía la goma colocada anteriormente. En un gel disponemos 25 muestras.

III.2.4.1.2.5.- Electroforesis

Se colocan 800 ml. de tampón electrodos en cada una de las cubetas de 370 x 80 x 60 mm. Dicho tampón lo podemos reutilizar una vez, pero mezclando previamente el tampón de las dos cubetas -la anódica y la catódica- antes de usarlo para la nueva electroforesis.

Utilizando las cubetas como soporte, colocamos una placa de metacrilato de 270 x 330 x 20 mm. provista en su interior de un serpentín refrigerante, conectado al criostato. Asimismo se coloca encima de la placa un papel de filtro de las mismas dimensiones y empapado en agua -con lo cual aseguramos una mejor y más uniforme refrigeración del gel-, para a continuación poner el cristal que lleva adherido el gel de poliacrilamida. Sobre el gel colocamos dos tiras de papel de filtro (Whatman 3MM) cada una de 26 x 2 cm., empapadas con el tampón electrodo, una en el extremo catódico y otra en el extremo anódico, asegurando de esta manera una entrada más uniforme de la corriente.

Como puentes de contacto entre el gel y el tampón electrodo se coloca una doble bayeta Chifonet* que puede reutilizarse durante varios meses. Por último, se coloca sobre el gel una capa de papel plástico para prevenir las pérdidas por evaporación durante el tiempo de electroforesis.

Una vez realizado todo este proceso conectamos a una fuente de alto voltaje (LKB 2197*), provista de control para la intensidad, voltaje y potencia. Al cabo de 20 minutos las muestras se retiran, dejando que continúe la electroforesis entre 5-6 horas, es decir, hasta que la zona de albúmina-visible a contraluz- haya migrado entre 11-12 cm. del origen de la capa del 12%.

Finalizado el tiempo de electroforesis se desechan las capas de 8% y 4%, teñimos la capa del 12% con un colorante de proteínas totales, compuesto por una solución de Coomassie Blue G-250, durante 1 hora aproximadamente y a continuación decoloramos en ácido acético diluido al 5%. La solución tinción puede ser reusada 5 ó 6 veces, debiendo descartarse cuando el color cambia de marrón a azul. Los

geles pueden conservarse durante meses en la mencionada solución acética.

III.2.4.1.3.- Electroforesis en gel de agarosa

Como ya hemos dicho anteriormente, utilizamos esta técnica en combinación con la electroforesis en gel de poliacrilamida para realizar la electroforesis bidimensional, la cual nos permite visualizar sistemas que no serían diferenciables mediante las técnicas habituales en una dimensión. Además nos sirve para comprobar algunos sistemas detectados en poliacrilamida unidimensional.

III.2.4.1.3.1.- Preparación de los moldes

El sistema es idéntico a la confección de moldes de acrilamida, salvo que las medidas de los vidrios son más pequeñas, 240 x 240 x 5 mm., así como las de los plásticos flexibles utilizados, 240 x 230 x 2 mm. Las medidas finales del gel resultante son, 215 x 215 x 2 mm. Una vez preparados los moldes y antes de colocar la solución de agarosa, se colocan en estufa a 60°C hasta que alcancen esta temperatura, para evitar que la agarosa solidifique al contacto con unas placas frías.

III.2.4.1.3.2.- Confección del gel (agarosa al 1%)

El tampón electrodos (Juneja y col., 1987c) es el mismo que usamos para la confección del gel (acetato sódico 0,05M, EDTA-ácido 1gr/litro, pH = 5,4). Por tanto preparamos 2 litros de tampón, colocando 800 ml. en cada cubeta; los 400 ml. restantes los guardamos en nevera a 4°C y nos servirán para preparar los geles necesarios.

En un matraz erlenmeyer de 250 ml. se pesan 650 mgr. de agarosa y se añaden 65 ml. del tampón previamente preparado.

Llevamos la mezcla hasta la ebullición, la dejamos enfriar hasta 60°-70°C y seguidamente la introducimos en el molde previamente calentado.

Después de la gelificación -aproximadamente 20 minutos-, cerramos el molde con papel Parafilm* y en bolsa de plástico lo guardamos en frigorífico a 4°C. Se pueden usar en un periodo que va de 1 a 3 días.

III.2.4.1.3.3.- Aplicación de las muestras.

Electroforesis

Una vez sacado el gel del molde, mediante el mismo procedimiento que para los geles de poliacrilamida, se seca la zona de inserción de las muestras con papel Whatman 1MM, retirándolo posteriormente y colocando los aplicadores, cuatro tiras de plástico por gel separadas entre ellas 3 cm. Con una micropipeta colocamos 10 μ l de la muestra de suero en los pocillos del aplicador. Dejamos reposar aproximadamente 30 minutos, para que la muestra penetre completamente en el gel y a continuación ponemos unas gotas de azul de bromofenol en algunas muestras para tener un control de la migración.

Las placas de metacrilato con serpentín refrigerante conectado al criostato y las cubetas para el tampón electrodo, son las mismas que las utilizadas para la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. En los extremos anódico y catódico del gel colocamos dos tiras dobles de papel Whatman 1MM (22 x 2 cm.). Como puentes de contacto entre el gel y el tampón de electrodos usamos una doble bayeta Chifonet*. Sobre el gel, aunque sin tocarlo, se coloca un vidrio, con la finalidad de prevenir las pérdidas por evaporación durante el tiempo de electroforesis.

Seguidamente conectamos a la fuente de alimentación, realizándose todo el recorrido a un voltaje constante de 400 V. El tiempo de electroforesis termina cuando el azul de bromofenol ha migrado 1,80 cm. desde el origen de la muestra -aproximadamente 1 hora 15 minutos-.

III.2.4.1.3.4.- Trasvase de las muestras al gel de poliacrilamida. Electroforesis bidimensional

Aunque ésto no concierne a la técnica que hemos descrito, lo hemos de reseñar porque es el punto de unión de las dos técnicas que forman la base de la electroforesis bidimensional, que nos permitirá observar electromorfos no diferenciables cuando se utiliza cualquiera de las técnicas unidimensionales.

En el gel de agarosa se cortan con un bisturí tiras de 4 muestras, de 5 a 6 mm. de anchura, siendo su longitud de 12,6 cm. Con ayuda de una espátula se levantan las muestras del gel de agarosa y se colocan en el centro de la zona del 4% del gel de poliacrilamida, ayudándonos para ello con una guía de plástico. Colocamos así un total de 8 muestras por gel.

Las condiciones de la migración electroforética son idénticas a las descritas para poliacrilamida unidimensional. Sólo reseñar que el tiempo de inserción de las muestras es de 40 minutos, pasado el cual las retiramos y continuamos la electroforesis. El tiempo total de corrido oscila entre 5-6 horas, cuando la zona de albúmina ha migrado aproximadamente 10 cm. Tefñimos con la solución de Coomassie Blue G-250 decolorando posteriormente con ácido acético diluido al 5%.

III.2.4.2.- TECNICAS ESPECIFICAS

Los sistemas analizados corresponden al producto de veintiún loci génicos estructurales que codifican para proteínas y enzimas solubles de la sangre, analizados electroforéticamente en geles de almidón, poliacrilamida y agarosa-poliacrilamida (bidimensional).

La metodología utilizada se basa en la propuesta por diferentes autores, con o sin modificaciones de las técnicas originales, las cuales detallaremos a continuación. En cuanto a la designación de los alelos de los diferentes sistemas se ha mantenido la propuesta por los autores originales.

Se describen en primer lugar las proteínas y enzimas analizadas sobre gel de almidón con sus técnicas correspondientes, para a continuación describir las que utilizan como soporte el gel de poliacrilamida y agarosa-poliacrilamida.

III.2.4.2.1.- Técnicas realizadas sobre gel de almidón

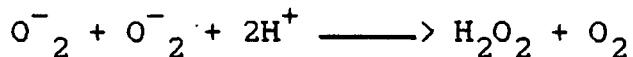
Todas las técnicas se han realizado con una concentración de almidón del 10%, a excepción de la Manosa fosfato isomerasa (MPI) en la cual hemos utilizado el 12%.

Tras la tinción -específica en la mayoría de los casos-, los geles se decoloran durante un tiempo aproximado de 1 hora en solución fijadora 5:5:1.

En las páginas que siguen describiremos en detalle las distintas técnicas.

III.2.4.2.1.1.- Superóxido dismutasa (Sod) EC 1.15.1.1

Conocida igualmente con el nombre de Indofenol oxidasa o Tetrazolium oxidasa. Realiza una importante función fisiológica, catalizando la siguiente reacción:



Su función esencial es actuar como un mecanismo de defensa contra la potencial toxicidad del oxígeno iónico. Enzima de estructura dimérica, se halla presente en todos los tejidos a excepción de los leucocitos polimorfonucleares. Para nuestro estudio hemos utilizado la fracción eritrocitaria.

Diferentes autores han descrito polimorfismo de este enzima en distintas razas; citaremos a Baur y Schorr (1969), Vriesendorp y col. (1973, 1974, 1976), Meera Khan y col. (1973), Los y col. (1973), Weiden y col. 1974, McDermid y col. (1975), Simonsen (1976), Andresen y Christensen (1977), Ferrell y col. (1980), Klauw y Bouw (1980), Reetz (1981), Dhyan y Bouw (1983), Arnold y Bouw (1985), Müller y col. (1987) y Kobayashi y col. (1987).

TAMPON GEL:
Ac.Bórico 0,0076 M
Tris 0,0144 M
Ac.Cítrico 0,0058 M
pH: 7,6 ajustado con LiOH

TAMPON ELECTRODOS:
Ac.Bórico 0,38 M
LiOH 0,06 M
pH: 7,8

Condiciones de corrido: 70 mA. durante 4 h.

REACCION DE TINCION: 100 ml. tampón TRIS/HCl 0,1 M. pH:8.0

20 mg. MgCl₂

8 mg. MTT

28 mg. PMS

Exposición a la luz durante 30 - 40 minutos, hasta la aparición de las bandas.

Referencias: Zutphen y col. (1981)

ALELOS: Sod^A, Sod^B

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 5 cm. del extremo catódico del gel. El alelo A migra anódicamente y el B catódicamente.

III.2.4.2.1.2.- Glucosa fosfato isomerasa (GPI)

EC 5.3.1.9

Conocida también con el nombre de Fosfohexosa isomerasa (PHI) o Fosfoglucosa isomerasa (PGI), cataliza la reacción reversible de Glucosa 6-fosfato a Fructosa 6-fosfato.

Enzima de estructura dimérica, se puede detectar en todos los tejidos, utilizando para nuestro estudio la fracción eritrocitaria.

En razas caninas europeas la frecuencia del alelo más común (GPI^A) es altísima, no habiendo encontrado variación electroforética en ninguna de las razas. Meera Khan y col. (1973), Vriesendorp y col. (1973), Los y col. (1973), Weiden y col. (1974), Clark y col. (1975), Simonsen (1976). Variantes electroforéticas han sido descritas por Tanabe y col. (1977) en el Dálmata, Richkind y Richkind (1978) en varias razas, Dhyan y Bouw (1983) en Chow Chow y por Arnold y Bouw (1985, 1989) también en Chow Chow. Ferrell y col. (1980) también describen variantes en varias razas de perros, pero además describen un tercer alelo designado por

ellos PGI³, presente sólo en Poodles, el cual se corresponde al hipotético GPI^C (Arnold y Bouw, 1989).

Por el contrario, existe un buen nivel de polimorfismo para este sistema en razas nativas japonesas (Tanabe y col., 1977) y en razas nativas de Bangladesh (Kobayashi y col., 1987).

TAMPON GEL: Ac.Bórico 0,0076 M
 Tris 0,0144 M
 Ac.Cítrico 0,0058 M
 pH: 7,6 ajustado con LiOH

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Bórico 0,38 M
 LiOH 0,06 M
 pH: 7,8

Referencias: Zutphen y col. (1981)

Condiciones de corrido: 70 mA. durante 4 h.

REACCION DE TINCION: (Brewer y Sing 1970, modificada)

100 ml. tampón TRIS/HCl 0,1 M. pH:8,0
40 mg. MgCl₂
10 mg. MTT
10 mg. PMS
14 mg. NADP
60 mg. Fructosa 6-fosfato
40 un. G6PD

Incubar a 37°C, durante 45 minutos.

ALELOS: GPI^A, GPI^B, GPI^C

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 5 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra catódicamente.

III.2.4.2.1.3.- Leucin aminopeptidasa (Lap) EC 3.4.1.1

La Leucin aminopeptidasa es una exopeptidasa que hidroliza el substrato L-leucil- β -naftilamida HCl. Sin embargo el enzima es usualmente capaz de una actividad exopeptidasa más amplia, por lo que el término "aminopeptidasa" parece ser el más apropiado. También ha sido usado el término "arilamidasa".

El sistema se rige por dos alelos codominantes localizados en un locus autosómico y se trata de un enzima de estructura monomérica. Polimorfismo plasmático del mismo ha sido descrito por Tanabe y col. (1974), Simonsen (1976), Dhyan y Bouw (1983), Arnold y Bouw (1985), Kobayashi y col. (1987).

TAMPON GEL: Tris 0,022 M
Ac.Cítrico 0,006 M
pH: 7,5

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Bórico 0,3 M
NaOH 0,1 M
pH: 8,7

Referencias: Sugiura y col. (1977)

Condiciones de corrido: fijar a 60 mA. hasta alcanzar 100 V. y mantener este voltaje hasta finalizar. Duración total del corrido 5 h.

REACCION DE TINCION: (Tanabe y col., 1974)

100 ml. tampón fosfato 0,15 M. pH:6,3

KH_2PO_4 77,5 ml. 0,15 M

Na_2HPO_4 22,5 ml. 0,15 M

30 mg. L-leucil- β -naftilamida HCl

60 mg. Fast Black K salt

Incubar a 37°C, durante 1,30 h.

ALELOS: Lap^A, Lap^B

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 30 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente. Antes de la tinción, es necesario sumergir el gel durante 15 minutos en una solución con 0,5 M de Ac. Bórico y 0,005 M de MgCl₂ (Brewer y Sing, 1970; Randi y col., 1986), y posteriormente lavar con abundante agua bidestilada. El substrato de tinción tarda en disolverse, por lo que es conveniente dejarlo en agitación con el tampón durante 15 minutos.

III.2.4.2.1.4.- 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-Pgd)
EC 1.1.1.44

Este enzima de estructura dimérica, cataliza la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato.

Aunque se ha descrito polimorfismo en varias especies, no se han hallado variantes electroforéticas en cánidos: Naik y col. (1971), Meera Khan y col. (1973), Los y col. (1973), Vriesendorp y col. (1973), Weiden y col. (1974) y Simonsen (1976).

El enzima se halla presente en todos los tejidos, aunque para nuestro estudio hemos utilizado la fracción eritrocitaria.

TAMPON GEL: Ac.Cítrico 0,0023 M
 Tris 0,0170 M
 pH: 8,0

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Cítrico 0,057 M
 Tris 0,250 M
 pH: 8,0

Condiciones de corrido: 75 mA. durante 5,30 h.

REACCION DE TINCION: 100 ml. tampón TRIS/HCl 0,5 M. pH:8,0

500 mg. MgCl₂

12 mg. MTT

12 mg. NADP

2 mg. PMS

25 mg. Ac.6-fosfoglucónico

Incubar a 37°C, durante 1 h.

Referencias: Harris y Hopkinson (1976), (modificada, tamaños de GPI)

ALELOS: 6-Pgd^A

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, a 2 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente.

III.2.4.2.1.5.- Manosa fosfato isomerasa (MPI)

EC 5.3.1.8

Cataliza la conversión reversible de Manosa 6-fosfato a Fructosa 6-fosfato. Enzima de estructura monomérica, regida por dos alelos codominantes en un locus autosómico. Se halla presente en el músculo y en las células blancas de la sangre, tejido que hemos elegido para nuestro estudio.

Se ha descrito polimorfismo en perros por: Klaauw y Bouw (1980), Dhyan y Bouw (1983), Arnold y Bouw (1985).

TAMPON BASE:	Tris	0,90 M
	EDTA	0,02 M
	Ac.Bórico	0,50 M
	pH:	8,6

TAMPON GEL: dilución 1:20 del tampón base

TAMPON ELECTRODOS: Cátodo: dilución 1:5 del tampón base
Anodo: dilución 1:7 del tampón base

Condiciones de corrido: 80 mA. durante 4,30 h.

REACCION DE TINCION: (modificada)

100 ml. tampón TRIS/HCl 0,1 M. pH:8,0
40 mg. $MgCl_2$
12 mg. MTT
12 mg. NADP
50 mg. D-Manosa 6-fosfato
40 un. G6PD
120 un. GPI
2 mg. PMS

Incubar a 37°C. durante 2 h.

Referencias: Nichols y col. (1973)

ALELOS: MPI^A, MPI^B

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente. Previo a la tinción, sumergir el gel en una solución 0,5 M de Ac. Bórico durante 15 minutos, lavando posteriormente con abundante agua bidestilada.

III.2.4.2.1.6.- Fosfoglucomutasa-1 (PGM₁) EC 2.7.5.1

Cataliza la reacción reversible



Juega un importante papel en el organismo, regulando los metabolismos de la glucosa y del glucógeno.

Tres loci genéticamente independientes controlan la síntesis de la PGM (PGM₁, PGM₂, PGM₃). Del 80% al 95% de la

actividad es atribuible a PGM_1 , y el resto a PGM_2 . La contribución de PGM_3 es bajísima en todos los tejidos y en algunos como el músculo esquelético y los glóbulos rojos no es detectable. Su estructura es monomérica.

En el presente estudio sólo hemos analizado el sistema PGM_1 , por diversas razones. Para que el sistema PGM_3 sea visible es condición indispensable añadir a la reacción de tinción el cofactor Glucosa-1,6-difosfato. Hasta hace pocos años ésto no era problema ya que el substrato usado, la Glucosa-1-fosfato, lo contenía como elemento contaminante, pero con las nuevas técnicas de purificación dicho producto ha desaparecido. El comprar directamente la G-1,6-diP encarece muchísimo la técnica, por lo que hemos optado no incluirlo en el estudio.

El caso del sistema PGM_2 es distinto. Tanto en glóbulos rojos como blancos, la actividad es buena -aunque existen diferencias apreciables cuando las muestras llevan almacenadas varios meses-, siendo el problema la cantidad de isoenzimas secundarios que aparecen, los cuales podrían enmascarar la posible presencia de las variantes electroforéticas. Por esta razón, ante la duda de los análisis realizados hemos preferido desecharlo.

Los estudios realizados hasta la fecha, indican que el sistema PGM_1 es monomórfico en perros (Weiden y col., 1974; Clark y col., 1975; Simonsen, 1976), aunque Meera Khan y col. (1973) encontraron una variante electroforética en un total de 92 perros.

Se ha descrito polimorfismo para PGM_2 y PGM_3 por los siguientes autores: Meera Khan y col. (1973), Vriesendorp y col. (1973, 1976), y Los y col. (1973), aunque a frecuencias bajísimas.

TAMPON GEL: Ac.Cítrico 0,005 M
 Tris 0,076 M
 pH: 8,6

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Bórico 0,30 M
 NaOH 0,06 M
 pH: 8,1

Condiciones de corrido: fijar a 60 mA. hasta que se alcancen los 100 V., dejando este voltaje hasta el fin de la prueba (unas 5 h.).

REACCION DE TINCION: (modificada)

100 ml. tampón TRIS/HCl 0,1 M. pH:7,1
200 mg. MgCl₂
20 mg. MTT
10 mg. NADP
50 mg. EDTA
400 mg. G-1-P
50 un. G6PD
2 mg. PMS

Incubar a 37°C, durante 1 h.

Referencias: Sánchez (1986)

ALELOS: PGM₁ 1, PGM₁ 2

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente.

III.2.4.2.1.7.- Malato deshidrogenasa (MDH)
EC 1.1.1.37

La Malato deshidrogenasa cataliza la conversión reversible de L-Malato a Oxaloacetato, según la siguiente reacción:



Existen dos formas de MDH, que difieren en sus propiedades físicas y químicas: la forma soluble o citoplasmática MDH_S y la forma mitocondrial MDH_M . Ambas son de estructura dimérica y están localizadas en dos loci autosómicos diferentes. Por ejemplo, en el hombre, la forma soluble se localiza en el cromosoma 2 y la forma mitocondrial en el 7 (Séger y Lucotte, 1981). Se hallan presentes en todos los tejidos con excepción de los glóbulos rojos donde sólo se aprecia la forma soluble. Para nuestro estudio hemos utilizado la fracción leucocitaria.

La forma soluble MDH_S es monomórfica en perros (Meera Khan y col., 1973; Los y col., 1973; Vriesendorp y col., 1973; Clark y col., 1975; Simonsen, 1976). Sin embargo, en la forma mitocondrial MDH_M , se han hallado variantes electroforéticas (Meera Khan y col., 1973; Los y col., 1973).

TAMPON GEL: 83 ml. de Tampón electrodos
 192 ml. de agua bidestilada

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Cítrico: 0,0258 M
 Tris: 0,0810 M
 pH: 6,3

Condiciones de corrido: 95 mA. durante 6 h.

REACCION DE TINCION: 100 ml. tampón TRIS/HCl 0,05 M. pH:8,6
 125 mg. Ac.L-Málico
 20 mg. MTT
 20 mg. NAD
 2 mg. PMS

Incubar a 37°C, durante 45 minutos para MDH_S y 1 h.
para MDH_M

Referencias: Sánchez (1986), (modificada)

ALELOS: MDH_S^1 , MDH_M^1 , MDH_M^2

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 30 minutos, colocadas a 4 cm. del extremo catódico del gel. La forma soluble migra anódicamente, mientras que la mitocondrial lo hace catódicamente. Existe una marcada diferencia de actividad cuando las muestras llevan almacenadas varios meses y además, debido a la parcial saturación del enzima por el coenzima NAD, pueden aparecer ciertos isoenzimas secundarios; para obtener patrones isoenzimáticos lo más consistentes posibles, es necesario saturar los isoenzimas con el coenzima incluyéndolo como un constituyente de los tampones electroforéticos (Harris y Hopkinson, 1976), por lo cual diluimos 20 mg. de NAD en 10 ml de tampón gel y lo añadimos en la solución gel justo antes de realizar el vacío.

III.2.4.2.1.8.- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
(G6PD) EC 1.1.1.49

Este enzima cataliza la oxidación de Glucosa 6-fosfato a 6-Fosfogluconato y es una de las proteínas enzimáticas más estudiadas y mejor conocidas, a razón de los problemas ligados con la existencia de alelos con poca actividad o nula, responsables de accidentes hemolíticos agudos provocados por agentes exógenos: drogas, infecciones, etc., (Séger y Lucotte, 1981).

Enzima de estructura monomérica ligado al cromosoma X (Meera Khan y col., 1973). Se halla presente en todos los tejidos, por lo que hemos usado para nuestro estudio la fracción eritrocitaria.

No han descrito polimorfismo de la G6PD en perros los siguientes autores: Naik y col. (1971), Vriesendorp y col. (1973), Clark y col. (1975), Weiden y col. (1974), Simonsen (1976), Kobayashi y col. (1987). Por el contrario, se han

descrito variantes electroforéticas por: Meera Khan y col. (1973), Los y col. (1973), Vriesendorp y col. (1976).

TAMPON GEL: Ac.Cítrico 0,0023 M
 Tris 0,0170 M
 pH: 8,0

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Cítrico 0,057 M
 Tris 0,250 M
 pH: 8,0

Referencias: Harris y Hopkinson (1976). (tampones de GPI)

Condiciones de corrido: 75 mA. durante 5,30 h.

REACCION DE TINCION: Sánchez (1986)

100 ml. tampón TRIS/HCl 0,05 M. pH:8,6
25 mg. MTT
15 mg. NADP
100 mg. Glucosa-6-fosfato
2 mg. PMS

Incubar a 37°C. durante 1 h.

ALELOS: G6PD¹, G6PD²

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente.

III.2.4.2.1.9.- Albúmina (Alb)

La albúmina, sintetizada en el hígado, representa la fracción más importante de las proteínas plasmáticas. Su gran concentración, alrededor de 4,5 gr./100 ml. y su peso molecular del orden de 70.000, hacen que tenga una gran influencia sobre la presión osmótica del plasma. La principal función fisiológica de la albúmina parece ser el transporte, debido a su gran afinidad con vitaminas, hormonas, iones

metálicos y ácidos grasos (Séger y Lucotte, 1981; Bortolozzi, 1983).

Se ha descrito polimorfismo del sistema albúmina en perros por Day y col. (1971), Vriesendorp y col. (1973, 1976), Simonsen (1976), Mgheni y col. (1979), Juneja y col. (1981b), Christensen y col. (1985), Kobayashi y col. (1987).

El sistema se rige por dos alelos codominantes de un locus autosómico.

TAMPON GEL:
Ac.Cítrico 0,027 M
Tris 0,033 M
pH: 4,2

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Cítrico 0,051 M
Tris 0,057 M
pH: 3,9

Condiciones de corrido: 240 mA. durante 6,30 h.

REACCION DE TINCION: Solución de Amido Black (negro amido), a razón de 1 gr. de Amido Black por litro de solución 5:5:1.

Sumergir el gel en la solución tinción durante 10 minutos, lavarlo posteriormente con agua bidestilada y decolorarlo durante 30 minutos en solución 5:5:1.

Referencias: Christensen y col. (1985)

ALELOS: Alb^F, Alb^S

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 15 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo anódico del gel. Debido al bajo pH, las fracciones de albúmina migran catódicamente. Si se desea una mejor resolución de las bandas, puede utilizarse albúmina purificada, precipitando las muestras según el método descrito por Korner y Debro (1956).

III.2.4.2.1.10.- Peptidasa D (Pep-D) EC 3.4.13.9

También conocida como Prolina Dipeptidasa, actúa específicamente sobre los dipéptidos que tienen prolina o hidroxiprolina como el aminoácido carboxiterminal, no pudiendo las otras peptidasas hidrolizar estos dipéptidos.

Enzima de estructura dimérica, se halla presente en virtualmente todos los tejidos, usando para nuestro estudio muestras plasmáticas.

Polimorfismo de la Pep-D ha sido descrito por Saison (1973), sobre las bases de un sistema con dos alelos codominantes de un locus autosómico. Los y col. (1973) describen un tercer alelo en este sistema designándolo Pep-D³, el cual se corresponde a la Pep-D^C descrita por Dhyan y Bouw (1983). También han descrito polimorfismo para este sistema Vriesendorp y col. (1973, 1974, 1976).

TAMPON GEL: 55 ml. de Tampón Electrodos
 220 ml. de agua bidestilada

TAMPON ELECTRODOS: Tris 0,180 M
 Ac.Bórico 0,100 M
 EDTA 0,004 M

Condiciones de corrido: 100 V. durante 5h.

REACCION DE TINCION: (Técnica en sobregel de agar)

Tampón de tinción: 1 gr. Na₂HPO₄ 12H₂O en 100 ml.
 pH: 7,6

120 mg. de agar en 15 ml. de tampón (agitar calentando hasta ebullición)

(1) Disolver en 15 ml. de tampón:

12 mg. L-Fenilalanil-L-Prolina (o
Leucil-Prolina)

6 mg.. Veneno de serpiente (Snake Venom)
12 mg. Peroxidasa
(2) Disolver en 1,7 ml. de N-N-dimetil-formamida,
15 mg. de 3-Amino-N-Etil-Carbazol
Dejar enfriar el agar hasta 50°C y añadir (1) y (2)
Incubar a 37°C, hasta aparición de las bandas (aprox.
1,30 h.)

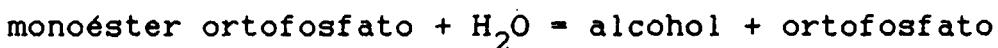
Referencias: Sánchez (1986)

ALELOS: Pep-D^A, Pep-D^B (Ver apartado IV.1.)

CARACTERISTICAS: el tiempo de inserción de las muestras es de 45 minutos, colocadas a 2 cm. del extremo catódico del gel.

III.2.4.2.1.11.- Fosfatasa ácida (Pac) EC 3.1.3.2

Este enzima de estructura monomérica cataliza la siguiente reacción:



La variación genética de la Fosfatasa ácida viene determinada por un par de alelos codominantes en un simple locus autosómico, denominados Pac^F y Pac^S (Braend y Austad, 1973).

Elliot y Wong (1972) no encontraron variación para dicho enzima en un total de 76 perros pertenecientes a 22 razas puras y 34 perros mestizos. Simonsen (1976) tampoco halló variación en un total de 150 perros pertenecientes a diferentes razas.

Sólo se ha descrito polimorfismo para este sistema en la raza Labrador Retriever, siendo la frecuencia del alelo menos común (Pac^F) del orden de 0,09 (Braend y Austad, 1973; Ferrell y col., 1980; Klauw y Bouw, 1980; Dhyan y Bouw,

1983; Arnold y Bouw, 1985). Por su parte, Weiden y col. (1974) describen una variante en un perro alemán de pelo corto de un total de 79 muestras pertenecientes a diferentes razas. Más recientemente Kobayashi y col. (1987) describen dos variantes de un total de 60 muestras en perros nativos de Bangladesh.

El enzima se halla presente en la práctica totalidad de los tejidos, pero donde muestra una mayor actividad es en los glóbulos rojos, aunque para nuestros análisis hemos utilizado la fracción leucocitaria ya que se utiliza el mismo sistema de tampones y condiciones electroforéticas requeridos para visualizar el sistema Malato deshidrogenasa (MDH), con lo cual en el mismo gel obtenemos los zimogramas de los dos sistemas.

TAMPON GEL: 83 ml. de T.Electrodos
192 ml. de agua bidestilada

TAMPON ELECTRODOS: Ac.Cítrico 0,0258 M
Tris 0,0810 M
pH: 6.3

Condiciones de corrido: 95 mA. durante 6 h.

REACCION DE TINCION: 100 ml. de tampón Acético pH: 5,0
(0,05 M NaOH : Ac.acético)
100 mg. de acido β-naftil fosfato
100 mg. de Fast Blue BB
Incubar a 37°C, durante toda la noche.

Referencias: Sánchez (1986), (modificada)

ALELOS: Pac^F , Pac^S

CARACTERISTICAS: El tiempo de inserción de las muestras es de 30 minutos, colocadas a 4 cm. del extremo catódico del gel. El enzima migra anódicamente. Antes de la tinción,

sumergir el gel en Ac. bórico 0,5 M durante 15 minutos, retirar el ácido y lavar el gel con agua bidestilada.

III.2.4.2.2.- Técnicas realizadas sobre gel de poliacrilamida

Se han analizado las muestras plasmáticas de las diferentes razas de perros, mediante electroforesis horizontal sobre gel de poliacrilamida, para un total de seis sistemas diferentes: Transferrina (Tf), Prealbúmina (Pr), Proteina Gc "Group specific component" (Gc), α_1 -B-glicoproteína (α_1 B), α_1 -Proteasa inhibidor (Pi-1) y Proteasa inhibidor 3 (Pi-3).

Todos los sistemas son visibles mediante la misma técnica en un sólo gel. El método seguido es el propuesto por Gahne y col. (1977), modificado por Juneja y Gahne (1987b).

TAMPON ELECTRODOS: Juneja y Gahne (1987b)

Tris-bórico 0,066 M pH: 9,0

8 gr. Tris

2 gr. Ac.bórico

1.000 ml. agua bidestilada

REACCION DE TINCION: Gahne y col. (1977)

Coomassie Blue G 250 0,04%

Ac.perclórico 3,50%

Metanol 20,00%

La tinción se realiza por inmersión durante un tiempo aproximado de 1,30 h., decolorando posteriormente en una solución de Ac. acético diluido al 5%.

Condiciones de corrido: fijar la potencia a 30 W./gel hasta el final del proceso (cuando la zona de albúmina ha migrado entre 11-12 cm. del origen de la capa del 12%, aproximadamente entre 5 y 6 horas), dejando voltaje y amperaje libres,

los voltajes oscilan desde 700 V. (inicio) a 1.100 V. (final).

CARACTERISTICAS: el tiempo de inserción de las muestras es de 20 minutos, colocadas horizontalmente en el centro de la capa del 4%.

III.2.4.2.2.1.- Transferrina (Tf)

Las transferrinas o β -globulinas son glicoproteínas cuya función principal es el transporte del hierro sérico. Gblett y col. (1959), utilizando hierro radioactivo (Fe^{59}), demostraron el papel fisiológico de esas β -globulinas, redenominándose por ello transferrinas.

Braend (1966) usando una técnica de electroforesis en gel de almidón, comprueba, en una muestra de 65 perros pertenecientes a 25 razas diferentes, la existencia de tres alelos distintos para el sistema transferrina, denominándolos Tf^F , Tf^M y Tf^S . Stevens y Townsley (1970) analizando muestras plasmáticas de individuos emparentados, confirmaron que el polimorfismo Tf en suero estaba controlado por un locus autosómico con tres alelos codominantes, a los que denominaron Tf^A , Tf^B y Tf^C . En el primer y segundo "International Workshop" sobre inmunogenética canina, se confirmó la existencia de un cuarto alelo, de menor movilidad, al que se designó como Tf^D (Vriesendorp y col. 1973, 1976).

Reetz y Schneider (1977) identifican mediante electroforesis en gel de almidón tres fenotipos de transferrina. Estudios familiares mostraron que estos fenotipos estaban controlados por un locus autosómico con dos alelos codominantes. Se designaron como Tf^{M1} y Tf^{M2} y los supusieron idénticos a los alelos Tf^B y Tf^C descritos por Stevens y Townsley (1970).

En algunos estudios (Braend, 1966; Shifrine y Stormont, 1973; Clark y col., 1975; Shaughnessy y col., 1975) no se ha encontrado polimorfismo de Tf en distintas razas, lo cual puede ser debido a la posibilidad de no diferenciar los tipos Tf^B y Tf^C por el método de electroforesis en gel de almidón o quizá porque la población bajo estudio descendía de unos pocos individuos.

Juneja y col. (1981a) mediante electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida, describen un nuevo alelo, de menor movilidad, en 4 individuos de un total de 1127, al que denominan Tf^E.

La simbología para Tf usada en algunos laboratorios F, M₁, M₂, S y S' (Reetz y col., 1980; Klaauw y Bouw, 1980; Reetz, 1981; Braend y Røed, 1987) se corresponde exactamente a la utilizada en nuestro estudio A, B, C, D y E según Juneja y col. (1981a).

También han descrito polimorfismo para Tf en diferentes razas de perros Simonsen (1976), Dhyan y Bouw (1983), Arnold y Bouw (1985), Müller y col. (1987) y Kobayashi y col. (1987).

ALELOS: Tf^A, Tf^B, Tf^C, Tf^D y Tf^E

III.2.4.2.2.2.- Prealbúmina (Pr)

Juneja y col. (1981a, 1981b) utilizando dos metodologías diferentes, electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida (1127 muestras analizadas) y electroforesis bidimensional en gel de agarosa-poliacrilamida (1119 muestras), no observaron variación para estas fracciones.

Por el contrario, Kobayashi y col. (1987), mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida de Gahne

y col. (1977), describen dos sistemas de Prealbúminas, a los que denominan Pa-1 y Pa-2, en una muestra de 60 perros nativos de Bangladesh. La Pa-2 resultó ser monomórfica y la Pa-1 polimórfica con unas frecuencias de 0,433 para el alelo Pa-1^A y de 0,567 para el alelo Pa-1^B.

ALELOS: Pr^A

III.2.4.2.2.3.- Proteína Gc "Group specific component" (Gc)

El papel biológico de esta α -2-glicoproteína, sintetizada en el hígado, parece ser la fijación y el transporte de la vitamina D (Séger y Lucotte, 1981).

Gahne y Juneja (1978) incubaron con vitamina D₃ marcada con carbono-14, muestras de plasma de vacas y caballos, para tipos conocidos de post-albúminas. Estas muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente autoradiografiadas. Los patrones observados eran idénticos a los de las post-albúminas conocidas. Esas post-albúminas polimórficas de caballos y vacas fueron así identificadas como la "vitamin D binding protein", resultando ser homólogas a la proteína Gc del plasma humano. De la misma manera se tipificó en cánidos la proteína Gc (Juneja y col., 1981b) aunque no se observó variación en un total de 1119 muestras analizadas de diferentes razas.

Recientemente Yoshida e Ikemoto (1986) han descrito polimorfismo genético en perros mestizos para la proteína Gc, mediante una técnica de electroforesis micro bidimensional en gel de poliacrilamida, habiendo comprobando mediante cruzamientos su modo de herencia. El sistema se rige por un par de alelos codominantes de un locus autosómico. Las frecuencias génicas estimadas fueron de 0,595 para el alelo Gc¹ y de 0,405 para el alelo Gc².

ALELOS: Gc¹

III.2.4.2.2.4.- α_1 B-Glicoproteína (α_1 B)

Reetz y col. (1980) mediante técnicas de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida describen dos nuevos sistemas polimórficos a los que denominan Post-albúmina 1 (Pa-1) y Post-albúmina 3 (Pa-3) por comparación de su movilidad electroforética con la fracción de albúmina.

Por su parte, Juneja y col. (1981b) describen mediante electroforesis bi-dimensional en geles de agarosa - poliacrilamida un sistema que migra por detrás de la albúmina y al que denominan Post-albúmina (Pa). Analizando muestras remitidas por el laboratorio de Reetz en Hannover, comproueban que el sistema descrito es idéntico al sistema Pa-3 descrito por Reetz y col. (1980). Mediante un sistema de cruzamientos confirman que los tres tipos observados de Pa (F, FS y S) estaban controlados por un locus autosómico con dos alelos codominantes.

Otros autores que han descrito polimorfismo para este sistema han sido Dhyan y Bouw (1983), Müller y col. (1987) y Kobayashi y col. (1987), denominándolo éstos últimos Post-albúmina 3 (Poa-3).

Juneja y col. (1987a) separaron mediante electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida (pH = 9,0) proteínas plasmáticas de cerdos, caballos y perros, siendo transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa, y posteriormente testadas mediante reacciones cruzadas con antisuero α_1 B-glicoproteína de plasma humano. Los resultados mostraban que las postalbúminas plasmáticas de cada una de estas especies (PO2 cerdo, Xk caballo y Pa perro) eran homólogas a la α_1 B del plasma humano. Ninguna otra proteína plasmática, bajo las condiciones descritas por Juneja y col.

(1987a), mostraba reacción apreciable con antisuero α_1 B de plasma humano, por lo que dichos autores proponen que las proteínas plasmáticas P02 de los cerdos, Xk de los caballos y Pa de los perros sean redesignadas como α_1 B-glicoproteína (α_1 B) con símbolo de locus A1B.

ALELOS: A1B^F, A1B^S

III.2.4.2.2.5.- α_1 -Proteasa inhibidor (Pi-1)

Otro de los sistemas polimórficos descritos por Reetz y col. (1980) fue el que denominaron Post-albúmina 1 (Pa-1). Juneja y col. (1981b) describen mediante electroforesis bi-dimensional en gel de agarosa-poliacrilamida, un sistema que migra justo detrás de la fracción albúmina, ligeramente a la derecha de la proteína Gc (Gc) y al que denominan α_1 -proteasa inhibidor (Pi-1), ya que dicha proteína inhibía la actividad esterolítica de algunas proteasas (tripsina y quimotripsina bovina).

Mediante cruzamientos confirman que los seis fenotipos observados de Pi-1 (F, FS, S, FI, SI, I) estaban controlados por tres alelos codominantes de un locus autosómico (F = rápido, I = intermedio, S = lento).

Con muestras remitidas por el laboratorio de Reetz en Hannover, comprueban que el sistema genético Pi-1 es idéntico al Pa-1 descrito por Reetz y col. (1980). Sin embargo éstos últimos habían postulado que el sistema estaba regido por dos alelos codominantes (Pa-1^A, Pa-1^B) de un locus autosómico. Esto fue debido a que no diferenciaron el alelo de movilidad intermedia (I) con el método usado por ellos de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida.

Kobayashi y col. (1987) usando electroforesis en gel de poliacrilamida según el método descrito por Gahne y col.

(1977), describen asimismo este sistema al que denominan Post-albúmina (Poa), pudiendo diferenciar perfectamente los tres alelos, a los que designan como Poa^A, Poa^B y Poa^C.

ALELOS: Pi-1^F, Pi-1^I, Pi-1^S

III.2.4.2.2.6.- Proteasa inhibidor-3 (Pi-3)

No se han hallado variantes de este sistema descrito por Juneja y col. (1981b) en un total de 1119 perros pertenecientes a diferentes razas. Consta de una única fracción y se localiza justo debajo de la α_1 B-glicoproteína. Posee la propiedad de inhibir la actividad esterolítica de algunas proteasas (tripsina y quimotripsina bovina).

ALELOS: Pi-3¹

Otros sistemas proteasa inhibidor encontrados -visibles perfectamente mediante la técnica de electroforesis bidimensional- han sido Pi-2 y Pi-1 Ag.

El sistema Pi-2 inhibe la actividad esterolítica de la tripsina bovina pero no así la de la quimotripsina, lo cual sirve de ayuda para diferenciarlas. Consta de dos hileras estrechamente unidas, conteniendo cada una de 6 a 7 subfracciones de las que por las técnicas habituales de electroforesis nos es imposible encontrar variantes. Suponemos que con el perfeccionamiento de las técnicas sería posible encontrar algún nuevo polimorfismo dentro de este grupo.

El sistema Pi-1 Ag presenta polimorfismo, detectable mediante electroforesis bidimensional, inhibiendo asimismo la tripsina y quimotripsina bovina. Se localiza en la zona que hay entre las Transferrinas y la Pi-3. Pero Juneja y col. (1981b) comprobaron que los patrones electroforéticos de Pi-1 Ag se correspondían directamente con las fracciones

de Pi-1, indicando que la proteína Pi-1 Ag, probablemente, no era más que una forma agregada de la proteína Pi-1. La concentración proteica de las fracciones Pi-1 Ag era considerablemente más alta en muestras viejas que en muestras frescas, lo que hemos comprobado en nuestro laboratorio.

III.2.4.2.3.- Técnicas realizadas sobre agarosa - poliacrilamida (bidimensional)

Todas las técnicas realizadas mediante electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida, son visibles e interpretables usando la técnica en dos dimensiones sobre geles de agarosa-poliacrilamida, a excepción de las Transferrinas, en las cuales la diferenciación de los alelos B y C se hace extremadamente difícil, sin embargo, nos permite corroborar la presencia de los productos de los alelos Tf^A , Tf^D y Tf^E . Podemos considerar esta técnica como una herramienta muy útil para la comprobación de los diferentes polimorfismos analizados en una sola dimensión.

Por el contrario, existen sistemas que sólo pueden ser interpretados con el uso de esta técnica. Dentro de ellos tenemos los siguientes polimorfismos plasmáticos: Postalbúmina-1 (Pal), Pretransferrina-1 (Prt1) y Pretransferrina-2 (Prt2), descritos por primera vez por Juneja y col. (1987c).

El método seguido es el propuesto por Juneja y col. (1979), modificado por Juneja y Gahne (1987b). Consta de dos etapas sucesivas:

a) Primera dimensión: Electroforesis en gel de agarosa

TAMPON ELECTRODOS: Juneja y Gahne (1987b), Juneja y col. (1987c)

Acetato sódico-EDTA 0,05 M pH: 5,4
6,8 gr. Acetato sódico $3\text{H}_2\text{O}$
1,0 gr. EDTA-ácido
1.000 ml. Agua bidestilada

Condiciones de corrido: fijar a 400 V. hasta el final del proceso, aproximadamente 1,15 h. (cuando el azul de bromofenol ha migrado 1,80 cm. del origen de la muestra). Seguidamente se realiza el trasvase de las muestras al gel de poliacrilamida.

b) Segunda dimensión: Electroforesis en gel de poliacrilamida

TAMPON ELECTRODOS: Juneja y Gahne (1987b)

Tris-bórico 0,066 M pH: 9,0
8 gr. Tris
2 gr. Ac.bórico
1.000 ml. Agua bidestilada

Condiciones de corrido: fijar la potencia a 30 W. hasta el final del proceso (cuando la zona de albúmina ha migrado entre 9-10 cm. del origen de la capa del 12%, aproximadamente unas 5 h.), dejando voltaje y amperaje libres; los voltajes oscilan desde 700 V. (inicio) a 1.100 V. (final). El tiempo de inserción de las muestras (zona del 4%) es de 40 minutos.

REACCION DE TINCION: Gahne y col. (1977)

Coomassie Blue G 250	0,04%
Ac.perclórico	3,50%
Metanol	20,00%

La tinción se realiza por inmersión durante un tiempo aproximado de 1,30 h., decolorando posteriormente en una solución de Ac. acético diluido al 5%.

III.2.4.2.3.1.- Postalbúmina-1 (Pal)

Juneja y col. (1987c) describen este nuevo polimorfismo, que se localiza en el gel entre las fracciones Pi-2 y α_1 B-glicoproteína. Los fenotipos observados de Pal están controlados por dos alelos codominantes de un locus autosómico. Las fracciones Pal no se observaron en muestras que llevaban almacenadas más de 2 años a -20°C. Además dichas fracciones sólo eran visibles cuando no se reutilizaban los tampones.

ALELOS: Pal^F, Pal^S

III.2.4.2.3.2.- Pretransferrina-1 (Prt1) y Pretransferrina-2 (Prt2)

Descritos asimismo por Juneja y col. (1987c), se localizan anódicamente a las transferrinas. Parecen ser proteínas muy estables, ya que, según los autores, se pueden analizar perfectamente al cabo de 7 años, almacenadas durante ese tiempo a -20°C. Las fracciones de Prt2 se mueven ligeramente por detrás de las Prt1 y la fracción Prt2 F resulta ser un buen punto de referencia para tipificar la Prt1.

Estudios genéticos avalan la hipótesis de que los fenotipos observados de Prt1 están controlados por un locus autosómico con tres alelos codominantes Prt1^D, Prt1^F, y Prt1^S, (D = rápido, F = intermedio, S = lento), mientras que los fenotipos de Prt2 lo estarían por un locus autosómico con dos alelos codominantes Prt2^F y Prt2^S (F = rápido, S = lento).

Los alelos Prt1^D y Prt1^F son los más comunes de este sistema, habiéndose encontrado el alelo Prt1^S en sólo ocho de las veintiún razas estudiadas. El alelo Prt2^F resulta ser también el más común, y sólo se ha descrito polimorfismo

para este sistema en las razas Cocker Spaniel y Springer Spaniel (Juneja y col. 1987c).

III.3.- ANALISIS DE LOS DATOS

Para el cómputo de los valores del polimorfismo enzimático, así como para las medidas de la diferenciación interpoblacional a partir de datos moleculares, se ha utilizado el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981). Para el análisis de los datos procedentes de caracteres morfológicos, se han utilizado diversos programas del paquete informático PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 2.9 (Felsenstein, 1986) y para la realización del análisis factorial de componentes principales nos hemos servido del programa BMDP 4M versión 1988 (Frane y col., 1985). Dichos programas se hallan implementados en un ordenador Digital VAX 8800-VMS versión V4.7, instalado en el Centro de Cálculo de la Universidad Autónoma de Barcelona.

III.3.1.- EL POLIMORFISMO ENZIMATICO

A partir de los fenotipos isoenzimáticos se han obtenido las frecuencias genotípicas, para calcular posteriormente, como indicadores del nivel de polimorfismo en las poblaciones analizadas, los estadísticos (P), (H) y (n_a).

(P) o Tasa de Polimorfismo, es la proporción de loci polimórficos en el conjunto de loci estudiados de la población. Se ha admitido 0,95 como valor máximo del alelo más común para que un locus sea considerado polimórfico.

$$P = x/m$$

siendo x = número de loci polimórficos

m = número total de loci

La varianza binomial de esta estimación es:

$$\sigma^2 (P) = P(1-P)/m$$

(H) o Heterocigosidad, estima la frecuencia promedio de individuos heterocigotos por locus. Se ha calculado para cada locus polimórfico el nivel de heterocigosidad observado (H_o) y el esperado (H_e) en función del equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de sus frecuencias alélicas. Al ser el tamaño de muestra pequeño -menos de 50 individuos por población analizada-, aplicamos un factor de corrección para el cálculo de la heterocigosidad esperada (Nei y Roychoudhury, 1974; Nei, 1978).

$$h = (1 - \sum p_i^2) 2N / 2N - 1$$

La heterocigosidad media por locus cuando son analizados r loci, se obtiene por la siguiente fórmula:

$$H = \sum h_k / r$$

siendo su varianza de muestreo,

$$V_h = \sum (h_k - H)^2 / r - 1$$

donde: N = es el número de individuos muestreados
r = número de loci analizados

Mediante un test de Chi-cuadrado de significación (χ^2), se analizó el ajuste de las frecuencias genotípicas observadas a las esperadas en el equilibrio, en aquellos loci variables de todas las poblaciones. Las frecuencias genotípicas esperadas se han calculado utilizando la fórmula de Levene (1949) para tamaños pequeños de muestra:

$$n_{ii} = \frac{nx_i(2nx_i - 1)}{2n-1} \quad n_{ij} = \frac{4n^2 x_i x_j}{2n-1}$$

siendo, n el tamaño de la muestra y x_i y x_j las frecuencias génicas esperadas en el equilibrio para los alelos i y j .

Cuando las frecuencias esperadas de alguna de las clases son demasiado pequeñas, se plantean problemas en este test (Sokal y Rohlf, 1969); en consecuencia, cuando en un locus polimórfico se presentaban más de dos alelos se repetía el test, de modo que los distintos genotipos se agrupaban en tres clases: (1) homocigotos para el alelo más frecuente, (2) heterocigotos entre el alelo más frecuente y otro de los alelos y (3) todos los demás genotipos. El test se analiza con un grado de libertad. Además se utilizó la corrección de "Yates" en los casos en que alguna de las clases mostraba valores observados iguales o menores que 5, cuando eran analizadas con un grado de libertad, o valores iguales o menores que 1, cuando los grados de libertad eran superiores a uno.

Asimismo se calculó el "Indice de fijación de Wright" (1965) para cada locus polimórfico, considerado un buen indicador de la estructura genotípica para un locus determinado. Se define como:

$$F = (H_e - H_o)/H_e$$

El déficit de heterocigotos (D) para cada locus se calculó según la fórmula:

$$D = (H_o - H_e)/H_e$$

La desviación de (F) de 0 también puede ser testada mediante el test Chi-cuadrado de significación.

$$X^2 = NF^2$$

con un grado de libertad, siendo N el tamaño de muestra (Nei, 1987; Hedrick, 1985). Se ha utilizado este test para analizar los valores de (F) de cada población, teniendo en cuenta el conjunto de loci. De la expresión, podemos observar que el tamaño de muestra adquiere una gran importancia en la significación estadística de (F). Según Hedrick (1985), para unos valores dados de frecuencias génicas ($p = q = 0,5$) y de heterocigosidad ($H = 0,45$), el valor de (F) es 0,10. Con esta desviación de los valores esperados, debido a consanguinidad, selección u otras causas, se hace necesario un tamaño de muestra de 400 individuos para detectar este efecto ($F = 10\%$) al nivel del 5%. Si el valor de (F) fuera 0,05 se necesitarían más de 1.500 individuos para detectar ese efecto al mismo nivel (5%). Por lo que, según Hedrick (1985), si el tamaño de muestra es pequeño, los resultados deben interpretarse con precaución.

Finalmente, (n_a) o Tasa de Alelismo, indica el número promedio de alelos por locus en la población.

III.3.2.- LA DIFERENCIACION INTERPOBLACIONAL

Se ha cuantificado la divergencia genética entre poblaciones mediante los índices de distancia genética y los índices de fijación o F-estadísticos de Nei (1977) y Wright (1978). Si el objetivo al comparar la diferenciación interpoblacional, es estimar los niveles de divergencia evolutiva entre poblaciones a partir de la matriz de semejanzas morfológicas o a partir de sus frecuencias génicas enzimáticas, está más indicado el uso de los índices de distancia genética que permiten manejar un elevado número de poblaciones, establecer comparaciones y determinar relaciones filogenéticas entre ellas. Los F-estadísticos están más indicados cuando estudiamos la diferenciación existente

entre subpoblaciones, debido al problema que comporta, a este nivel, el uso de las distancias genéticas. Asimismo, se ha realizado el análisis factorial de componentes principales, para estudiar la relación existente entre poblaciones.

III.3.2.1.- DISTANCIAS GENETICAS

Se han calculado las distancias genéticas entre poblaciones a partir del análisis cuantitativo de datos procedentes de dos tipos de caracteres. Por una parte, caracteres morfológicos y por otra, variabilidad detectada electroforéticamente de enzimas y proteínas de la sangre -polimorfismo bioquímico-.

III.3.2.1.1.- Caracteres Morfológicos

A partir de los datos de la matriz de semejanzas morfológicas (Tabla III.2), se han calculado las distancias entre poblaciones, según la siguiente ecuación:

$$d_{(i,j)} = \sum z_k(i,j)/n$$

siendo,

n = número total de caracteres (32 caracteres)

$z_k(i,j)$ = valor del carácter morfológico k, entre el OTU i y el OTU j.

$$z_k(i,j) = 0 \quad \text{si} \quad z_k(i) = z_k(j)$$

$$z_k(i,j) = 1 \quad \text{si} \quad z_k(i) \neq z_k(j)$$

$d_{(i,j)}$ = valor de distancia entre el OTU i y el OTU j.

III.3.2.1.2.- Polimorfismos Bioquímicos

Para el cómputo de las diferencias enzimáticas entre las poblaciones se calculó la "Distancia estándar no sesgada" de Nei (1978), que no es más que la "Distancia estándar"

(Nei, 1972) corregida para pequeños tamaños de muestra y la Distancia de Cuerda (d_c) de Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

Nei (D_s),

$$I_{xy} = \sum q_x q_y / \sqrt{(\sum q_x^2) \cdot (\sum q_y^2)}$$

$$D_{xy} = -\ln I_{xy}$$

$$\sigma^2_D = (1-I) / I \cdot n$$

siendo n = número de loci analizados

Cavalli-Sforza y Edwards (d_c),

$$d_c = \sqrt{1 - \cos \theta}$$

$$\theta = \arccos \left(\sum \sqrt{q_{x(i)} q_{y(i)}} \right)$$

Dados i alelos para uno de los loci analizados, $q_x(i)$ y $q_y(i)$ corresponden a las frecuencias alélicas de cada uno de ellos en las poblaciones "X" e "Y" respectivamente.

Se han escogido estas dos distancias para la construcción respectiva de fenogramas y cladogramas, ya que según los trabajos de Nei y col. (1983), al comparar diferentes distancias genéticas con diferentes algoritmos, a partir de una filogenia "conocida" simulada por computador y asumiendo una tasa constante de evolución molecular, encuentran que:

1). Los árboles UPGMA y distancia de Wagner generados con la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), producían el más preciso diseño de las ramas.

2). La distancia estándar de Nei (1978) daba la mejor estimación de la longitud de las ramas, cuando se construía el árbol mediante el algoritmo UPGMA. Además, a diferencia de las otras distancias, la distancia estándar de Nei (D), guarda una estrecha relación lineal con el número de sustituciones aminoacídicas, lo cual la hace útil para obtener

estimaciones aproximadas de los tiempos de divergencia (Hedges, 1986; Nei, 1987).

También se ha utilizado el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982) para calcular las distancias de Nei entre poblaciones, ya que según los autores ofrece una estimación más precisa cuando nos movemos en un rango de distancias inferiores a 0,1 y cuando el número de loci muestreados es pequeño.

El proceso consiste en calcular una serie de pseudovalores de distancia, según la fórmula:

$$S_{n,i} = n D_n - (n-1) D_{n,i}$$

siendo: D_n = distancia estándar de Nei (1972) calculada para n loci

$D_{n,i}$ = distancia estándar de Nei (1972) calculada para n-1 loci, habiéndose omitido el i-jésimo locus ($i=1,2,3,\dots,n$)

el estimador jackknife (D'_n) es simplemente la media de estos n pseudovalores.

$$D'_n = (1/n) \sum_i S_{n,i}$$

La varianza se define de igual manera como:

$$V(D'_n) = (1/n(n-1)) \sum_i (S_{n,i} - D'_n)^2$$

III.3.2.2.- LOS F-ESTADISTICOS DE NEI Y WRIGHT

Como ya hemos comentado en el apartado II.6.1., dada una población subdividida, $F(IS)$ y $F(IT)$ nos miden el exceso o defecto de heterocigotos en cada subpoblación y en la población conjunta, respectivamente, mientras que $F(ST)$ nos

mide el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones. Estos parámetros se relacionan mediante la siguiente fórmula:

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

Por tanto, los F-estadísticos, definidos a partir de las heterocigosidades observadas y esperadas, haya selección o no, quedan de la siguiente manera:

$$F_{IS} = (H_S - H_O) / H_S$$

$$F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T$$

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

siendo,

H_O = promedio de heterocigosidad observada en el conjunto de las subpoblaciones

H_S = promedio de heterocigosidad esperada en el conjunto de las subpoblaciones

H_T = heterocigosidad esperada en el total de la población

Obviamente, $F(IS)$, $F(IT)$ y $F(ST)$ definidos de esta manera satisfacen la fórmula (1) (Nei, 1977).

El grado de diferenciación alcanzado entre las subpoblaciones, una vez efectuadas las modificaciones de Nei (1977), se puede expresar por:

$$F_{ST} = 1 - ((1-F_{IT}) / (1-F_{IS})) = (H_T - H_S) / H_T$$

El valor $F(ST)$ para un locus determinado de una población subdividida, se obtiene mediante la siguiente fórmula (Weir y Cockerham, 1984):

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{p(1-p)}$$

Al ser ahora las poblaciones de tamaño finito, los F-estadísticos están sujetos a error debido a la deriva genética -error de muestreo-. La significación estadística de la desviación de $F(ST)$ de 0 se ha comprobado mediante el test de Chi-cuadrado de heterogeneidad de las frecuencias génicas (Chesser, 1983; Nei, 1987).

$$\chi^2 = 2N F_{ST} (k-1)$$

con $(k-1) \cdot (s-1)$ grados de libertad, donde N es el tamaño total de la muestra, k es el número de alelos para el locus y s es el número de subpoblaciones.

Además se ha realizado el análisis jerárquico de Wright (1978), para comparar el grado de diferenciación existente entre cada nivel de jerarquía con respecto a los demás.

Nei (1977) sugiere que la diversidad total (H_T) puede descomponerse en tres componentes: H_C , la diversidad genética intra colonias (subpoblaciones); D_{CS} , la diversidad genética intra subpoblaciones (razas), y D_{ST} , la diversidad genética inter subpoblaciones (razas), quedando por tanto:

$$H_T = H_C + D_{CS} + D_{ST}$$

Nei recomienda expresar cada uno de estos componentes como proporciones de la diversidad total, así que:

$$H_C/H_T + D_{CS}/H_T + D_{ST}/H_T = 1$$

Los F-estadísticos de Wright podrían presentarse para este caso como:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IC}) (1-F_{CS}) (1-F_{ST})$$

Si no existiera diferenciación entre las colonias de una subpoblación (subpoblaciones de una raza), $D_{CS} = 0$ en el análisis de Nei (1977) y del mismo modo $F_{CT} = F_{ST}$ en el de Wright.

Los resultados del análisis jerárquico consisten en una serie de tablas que dan los componentes de varianza (σ^2_{XY}) y los F-estadísticos (F_{XY}) para cada nivel de jerarquía con respecto a los demás.

Usando el procedimiento de Wright, pueden obtenerse algunas veces componentes negativos de varianza. Este es un problema común resultante de la asunción, para propósitos computacionales, de que la varianza estimada total se puede partir en componentes estimados de varianza. Así, si la suma de estos componentes excede la estimación de la varianza total, el remanente de las estimaciones toma valores negativos.

III.3.2.3.- ANALISIS FACTORIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES

Para el estudio de la relación existente entre las poblaciones, se realizó un análisis factorial de componentes principales mediante la utilización del programa BMDP-4M, a partir de las frecuencias alélicas de los 11 loci polimórficos. Estos se tomaron como variables para caracterizar las distintas poblaciones, existiendo un total de 17 variables linealmente independientes.

Este análisis proyecta sobre el plano las distancias entre las poblaciones, obtenidas a partir de la matriz de varianzas y covarianzas, representadas por sus frecuencias alélicas en un hiperespacio de tantas dimensiones como

variables utilizadas. Las variables que explican la mayor parte de la varianza entre las poblaciones se usan para determinar los factores que luego son representados en el análisis. Las distancias así representadas, sin tener un significado métrico, permiten visualizar el nivel de diferenciación entre las poblaciones y su grado de relación.

III.4.- CONSTRUCCION DE LOS DENDROGRAMAS

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de los datos obtenidos a partir de caracteres morfológicos y la posterior construcción de sus dendrogramas, se han utilizado los programas MIX, FITCH, KITSCH y SHUFFLE del paquete informático PHYLIP versión 2.9 (Felsenstein, 1986), así como el programa BIOSYS-1 escrito en FORTRAN IV (Swofford y Selander, 1981) para la realización de los análisis de cluster (Sneath y Sokal, 1973) y del método de Wagner (Farris, 1972) en la construcción de sus fenogramas y cladogramas respectivos, a partir de datos procedentes de caracteres bioquímicos.

III.4.1.- ALGORITMOS PARA CARACTERES MORFOLOGICOS

El algoritmo utilizado para la construcción del árbol (dendrograma) a partir de datos morfológicos, tanto para el análisis cualitativo como para el cuantitativo, es el mismo. La diferencia entre cada uno de los programas utilizados es que, dada la topología del árbol, cada programa evalúa la cantidad que ha de ser minimizada o maximizada.

La estrategia empleada es la siguiente: Los OTUs se toman en el orden en que han sido introducidos. Con los dos primeros se construye un árbol. Posteriormente se toma el siguiente OTU y se considera en qué lugar del árbol debe ser

añadido, y así sucesivamente. Los posibles lugares de inserción se discuten mediante una serie de criterios, aceptándose el mejor árbol de los propuestos. Después de haberse añadido un OTU y antes de que se añada el siguiente, se suceden una serie de reordenaciones del árbol en un intento para perfeccionarse, el algoritmo se mueve a su través construyendo todas las posibles reordenaciones locales. Esta estrategia comprueba cerca de $2n^2$ topologías diferentes.

El proceso entero depende del orden en el cual han ido entrando los diferentes OTUs en estudio. Se ha intentado encontrar una diferente y mejor solución reordenando la entrada de OTUs y corriendo los programas de esta nueva manera. Si no encontramos variaciones podemos indicar que la topología hallada es la mejor, aunque según Felsenstein (1986) nunca se puede estar seguro de ésto.

Todos los árboles resultantes son "no rotados", es decir, cualquier punto puede tomarse como origen ancestral o punto de rotación. Para facilitar la comprensión y poder comparar los árboles obtenidos por métodos cualitativos y cuantitativos, se ha tomado la población de Galgo Español como punto de referencia para todas las demás razas.

III.4.1.1.- ANALISIS CUALITATIVO

Se ha utilizado el programa MIX del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1986) para construir el dendrograma de las razas caninas españolas a partir de datos cualitativos de los caracteres morfológicos. Los datos deben ser introducidos en codificación binaria (0,1), denotando ausencia o presencia del carácter, a partir de la matriz de semejanzas morfológicas (Tabla III.2).

El principio en el que se basa el análisis cualitativo de los datos es el de la "parsimonia", es decir, el árbol

generado sería aquél que requiriera el menor número posible de pasos o transiciones del estado del carácter, sumados a través de todas sus ramas.

Se han obtenido dos dendrogramas, el primero mediante el método de Wagner (Farris, 1970) que se utiliza cuando desconocemos qué estado del carácter es el ancestral y el segundo mediante el método de Camin y Sokal (1965) que presupone el conocimiento del estado ancestral del carácter, para ello, dentro de los posibles criterios existentes (Avise, 1983), se ha tomado como estado primitivo el que aparece con más frecuencia en el grupo que está siendo examinado.

Además de la topología del árbol, el programa nos informa del número total de pasos requeridos para su construcción, del número de pasos o eventos requeridos para cada carácter, del estado de los caracteres en los hipotéticos nodos ancestrales y si la longitud de las ramas son iguales o diferentes de cero. Para ésto último, si no existe evidencia de ningún cambio en el estado de los caracteres en esa rama se denota como "no", indicando que su longitud es cero; si por el contrario existe una evidencia clara de que se ha producido algún cambio se denota como "si", indicando que la rama tiene una cierta longitud y por último si existe ambigüedad en cuanto a si se ha producido o no el cambio se indica con un "puede ser", indicando que la longitud de la rama puede ser igual o diferente de cero.

III.4.1.2.- ANALISIS CUANTITATIVO

Para realizar el análisis cuantitativo de los caracteres morfológicos, los datos deben ser transformados e introducidos en forma de una matriz de distancias, por lo cual se han calculado las distancias entre las poblaciones a partir de los datos morfológicos codificados de la Tabla III.2.

El programa utilizado es el FITCH, del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1986). También aquí se han obtenido dos dendrogramas, que corresponden a los métodos de Fitch y Margoliash (1967) y Cavalli-Sforza y Edwards (1967), siendo el objetivo perseguido por ambos encontrar el árbol que mejor se adapte a la matriz de distancias dadas. Para ello intentan encontrar el árbol que minimice el sumatorio de cuadrados mediante la siguiente expresión:

$$SC = \sum_i \sum_j \frac{(D_{ij} - d_{ij})^2}{P}$$

donde:

D_{ij} = distancia observada entre las poblaciones i y j

d_{ij} = distancia esperada entre las poblaciones i y j, computada como la suma de las longitudes de los segmentos del árbol, desde la población i a la j (distancia patrística).

P = factor que distingue los dos métodos. Para el método de F-M, P = 2,0 y para el método de Cavalli-Sforza y Edwards, también llamado Método de los Mínimos Cuadrados, P = 0,0, con lo que el denominador se hace siempre igual a 1. La elección de uno u otro depende de las varianzas de los errores de las distancias que asumamos.

En estos métodos se obtiene primero un árbol semejante al generado por el análisis de cluster y después se altera su topología en un intento de mejorar el valor de bondad de ajuste. Los dos métodos asumen los criterios de aditividad e independencia.

Como que el algoritmo usado para la búsqueda de las topologías es el mismo que el del programa MIX, se hace necesario probar diferentes ordenaciones de los OTUs en la entrada de datos. El programa SHUFFLE, del mismo paquete

informático, reordena las matrices de distancias en el orden deseado.

También se ha utilizado el programa KITSCH del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1986), cuando asumimos que las tasas de cambio esperadas son constantes en todas las líneas y que todas las poblaciones son contemporáneas. El fenotipo se comporta como un reloj evolutivo (Felsenstein, 1984, 1986). El árbol resultante, a diferencia de los anteriores, es "rotado" habiéndose escogido el método del "midpoint rooting" o criterio del punto central (Farris, 1972) para darle una dirección evolutiva.

III.4.2.- ALGORITMOS PARA POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS

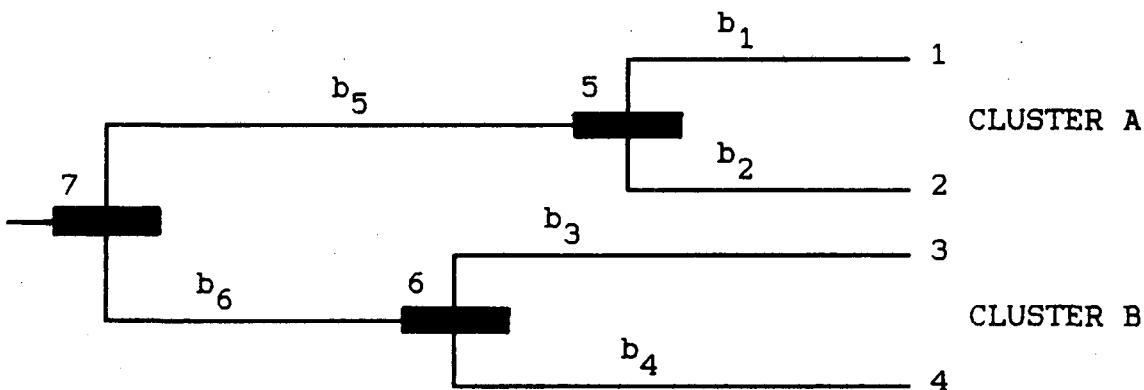
III.4.2.1.- ANÁLISIS DE CLUSTER

Se ha realizado el análisis de cluster utilizando el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), a partir de las matrices de distancias construidas usando el índice de Nei (1978) y la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

La primera operación consiste en buscar los dos OTUs que presentan la distancia más pequeña, formando con ellos un primer cluster o grupo. A continuación se elabora una nueva matriz de datos, considerando dichos OTUs como un nuevo OTU único y calculando las distancias medias de cada OTU restante respecto a estos dos agrupados. En la nueva matriz obtenida se busca el valor mínimo y se forma otro cluster. El procedimiento se repite hasta incorporar a todos los OTUs existentes. Este método aglomerativo asume igualdad en la tasa de cambio evolutivo para todas las ramas del fenograma. El resultado final es una representación del nivel de similitud entre los OTUs que constituyen la matriz de distancias.

Una manera para evaluar la fiabilidad del fenograma resultante, es computar los errores estándar (SE) de cada punto de bifurcación de las ramas del árbol. La evaluación del SE es importante ya que cada punto de ramificación sugiere un suceso importante de especiación o división de la población (Nei y col., 1985).

Supongamos un hipotético árbol evolutivo. 1, 2, 3 y 4 representan poblaciones contemporáneas, mientras que 5, 6 y 7 representan puntos de ramificación -o especies ancestrales-. Las cajitas sombreadas representan la magnitud de SE.



Los valores de distancia (D) entre un par de poblaciones y su varianza, se han estimado mediante los métodos de Nei y Roychoudhury (1974) y Nei (1978). La varianza entre dos poblaciones viene dada por:

$$V(D) = (1-I)/In$$

Sin embargo, no es tan fácil computar la varianza de los puntos de ramificación, ya que las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales (puntos 5, 6 y 7) son desconocidas. Aunque es difícil desarrollar un método general para computar el valor exacto de la varianza en el punto de ramificación, es posible dar una estimación máxima de esa varianza (Nei y col., 1985). Esta estimación máxima es el promedio de las varianzas de todos los pares de distancias

usados para computar un punto de ramificación. La varianza máxima de D_{AB} se obtiene por:

$$V(D_{AB}) = \frac{V(D_{13}) + V(D_{14}) + V(D_{23}) + V(D_{24})}{r \cdot s}$$

donde r y s son los OTUs del cluster A y del cluster B respectivamente.

La varianza del punto de ramificación (7) viene dada por:

$$V(b_{AB}) = V(D_{AB})/4$$

La fiabilidad de esta expresión como estimación de la varianza de los puntos de ramificación depende de la estructura del árbol. Si la mayoría de ramas intracluster son cortas, la fiabilidad es bastante alta. Sin embargo, si algunas de las ramas intracluster son largas, la varianza puede verse seriamente sobreestimada.

Si se calculan los valores de distancia de Nei mediante el método jackknife (Mueller y Ayala, 1982), es posible realizar comparaciones entre clusters comprobando si la diferencia entre la distancia promedio entre clusters y la distancia promedio intracluster es significativamente mayor que cero:

$$U = D_B - D_W$$

siendo, U = distancia hipotética del punto de bifurcación de los dos clusters

D_B = distancia genética promedio entre grupos

D_W = distancia genética promedio intra grupos

Con ésto se quiere comprobar si los dos clusters son genéticamente más distintos que los propios integrantes de

un mismo cluster. Indirectamente estamos comprobando la fiabilidad de los puntos de bifurcación y con ello la fiabilidad de la topología del árbol.

III.4.2.2.- METODO DE WAGNER

El algoritmo del método de distancia de Wagner, (Farris, 1972), construye un árbol filogenético a partir de una matriz de valores de distancia genética. La distancia utilizada debe ser métrica, es decir no debe violar la desigualdad del triángulo. Hemos utilizado la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), la cual cumple este requisito.

El procedimiento consiste en ir añadiendo OTUs a las ramas del árbol de modo que se minimice la distancia de las ramas, es decir, el criterio central es el de la "parsimonia", obteniéndose la "máxima parsimonía" cuando se han relacionado todos los OTUs con la mínima distancia posible. Este algoritmo no precisa asumir uniformidad en las tasas evolutivas, aunque posteriormente al árbol obtenido se le debe asignar una dirección evolutiva, habiéndose elegido para ello el criterio del punto central o método del "midpoint rooting" (Farris, 1972), que consiste en minimizar la varianza de las tasas evolutivas asumiendo homogeneidad en ellas -de forma análoga a la utilizada en los métodos fenéticos-. En este caso, los OTUs más divergentes del árbol tienen que haber pasado por la misma tasa de cambio y el cladograma se genera a partir del punto medio entre ambos, el cual se toma como origen.

Esquemáticamente, el método es el siguiente:

En cada etapa de la construcción del árbol, los OTUs se dividen en dos grupos: los conectados al árbol y los no conectados. El algoritmo funciona seleccionando un OTU de los

no conectados y lo incluye en la rama donde se minimice la distancia. Sea por ejemplo, siguiendo la notación de Swofford (1981), "C" el OTU seleccionado para unirlo a la rama "G-H", entonces:

$$D(C, (G, H)) = 1/2(D(C, G) + D(C, H) - D(G, H)) \quad (1)$$

Donde, en general, $D(I, J)$ se refiere a la "distancia fenética" entre los taxones I y J, reales o hipotéticos, y se obtiene a partir de la matriz original de distancias o a partir de los valores calculados durante un ciclo previo. La rama "G-H" se abre para crear un nuevo nodo (Unidad Taxonómica Hipotética o HTU) designado como "F" y así poder incorporar al OTU "C". De esta manera se construyen nuevas ramas que conectan a "F" con "C", "G" y "H".



El proceso continua hasta que todos los OTUs se unen al árbol. Para realizar la selección de un nuevo OTU pueden usarse tres criterios (Swofford, 1981):

Criterio I. Se selecciona el OTU "C" para unirlo a "G-H" de forma que se haga mínima la relación:

$$m(C, G, H) = 2m(D(C, (G, H)), D(G, (C, H)), D(H, (G, C)))$$

Estas distancias se calculan según la fórmula (1)

Criterio II. Se selecciona por aproximación al minimizar $m(C, G, H)$ según la relación:

$$m(C, G, H) = m(D(C, G), D(C, H), D(G, H))$$

Criterio III. Se selecciona el OTU que minimiza $D(C,(G,H))$ para todos los posibles valores de C, G, y H, donde G y H son nodos adyacentes del árbol y $D(C,(G,H))$ se calcula según (1).

Swofford (1981), observó que la utilización de los distintos criterios solían dar longitudes distintas del árbol para una misma matriz de datos, e incluso podían generarse topologías diferentes. Los valores de "F" y de "SD" también variaban de un criterio a otro y según los datos utilizados.

Los resultados de Swofford (1981) indicaban que la capacidad del método de Farris para encontrar un árbol con óptimos estadísticos de ajuste dependía en gran medida de la secuencia de adición de OTUs y ninguno de los tres criterios resultaba superior para determinar la mejor secuencia de adición. Una manera para resolver el problema sería utilizar los tres criterios simultáneamente, sin la restricción de tomar la secuencia de adición determinada por sólo uno de ellos.

Para ello, se utilizan etapas intermedias en la construcción del árbol ("partial network"), en las que varios OTUs pueden estar conectados. Este método, recibió el nombre de Criterio de Adición Múltiple (MAC) y difiere del procedimiento de Farris (1972) en que se pueden generar varias etapas intermedias durante cada ciclo de la construcción del árbol final.

El primer ciclo se inicia utilizando los tres criterios por separado y construyéndose tantos entramados intermedios ("network") como elecciones distintas ocurran al aplicarlos. Para cada una de estas etapas intermedias, se aplican de nuevo los tres criterios. Si tenemos k etapas intermedias, al aplicar el ciclo siguiente pueden llegar a generarse hasta $3k$ nuevas etapas intermedias. Cada una de estas $3k$

posibles etapas intermedias, pueden ser tratadas independientemente en pasos subsiguientes. En todos los otros aspectos, el algoritmo es idéntico al procedimiento original de Farris (1972).

Como distintas etapas intermedias suelen converger a una misma topología, aunque sus longitudes de rama sean distintas, se puede reducir el número de etapas intermedias guardando para el ciclo siguiente las que presenten mejores valores de bondad de ajuste entre las de igual topología. Se puede disminuir aún más el número de etapas parciales, si éstas se ordenan de forma decreciente en su estadístico de bondad de ajuste y se selecciona, para el siguiente ciclo, un número reducido de éllas fijado arbitrariamente.

Al aplicar este método, pueden generarse al final varios cladogramas, seleccionándose de entre ellos los que presentan una longitud menor o un ajuste más cercano a los valores originales. En general los árboles consiguen mejores valores de bondad de ajuste, aunque si el número de OTUs es pequeño, su topología no suele ser muy distinta a la obtenida por alguno de los tres criterios anteriores.

III.4.2.3.- ESTADISTICOS DE BONDAD DE AJUSTE

La comparación directa de los diversos métodos mediante los estadísticos de bondad de ajuste, no permite según Swofford (1981) decidir cual es el mejor método para la estimación de los árboles filogenéticos, ya que algunos de ellos han sido diseñados expresamente para minimizar determinados criterios. A pesar de ésto, dichos estadísticos se han empleado ampliamente en la bibliografía y se utilizan a menudo para escoger entre los diferentes árboles generados por un método único o para comparar los árboles generados por diferentes métodos. Estos estadísticos miden el grado en que las distancias "output" -distancias derivadas en el

árbol o distancias patrísticas- entre OTUs reflejan las correspondientes distancias "input" -distancias observadas-, es decir, estiman las desviaciones producidas entre la matriz original de distancias y la ordenación de los OTUs en el correspondiente fenograma o cladograma (Swofford, 1981; Farris, 1981; Nei, 1987).

Los cuatro estadísticos utilizados son el porcentaje de desviación estándar (%SD) de Fitch y Margoliash (1967), el valor "f" de Farris (1972), el valor "F" de Prager y Wilson (1976) y la correlación cofenética.

La correlación cofenética compara la matriz de distancias utilizada para el cálculo, con la matriz donde se reflejan las distancias de los OTUs ya relacionados en el árbol filogenético -distancias patrísticas-. Sin embargo, según Nei (1987), esta correlación es muy cercana a 1 en la mayoría de árboles obtenidos a partir de datos moleculares y no tiene mucho poder discriminatorio.

El SD de Fictch y Margoliash se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$SD = \left[\frac{2 \sum_{ij} ((I_{ij} - O_{ij}) / I_{ij})^2}{n(n-1)} \right]^{1/2} \times 100$$

El valor "f" de Farris toma los valores:

$$f = \sum_{ij} |O_{ij} - I_{ij}|$$

El valor "F" de Prager y Wilson, es una simple función de la "f" de Farris y se calcula:

$$F = 100f / \sum_{ij} I_{ij}$$

siendo:

n = número de OTUs en estudio

I_{ij} = distancia observada entre los OTUs (i) y (j)

O_{ij} = distancia derivada en el árbol o distancia
patrística entre los OTUs (i) y (j)

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1.- NIVELES DE VARIABILIDAD GENETICA

Los patrones electroforéticos de los veintiún loci analizados, así como sus nomenclaturas, se dedujeron por comparación directa de los resultados de otros trabajos realizados sobre los mismos sistemas, tal como queda reflejado en el apartado III.2.4.2 de Material y Métodos. En el mismo apartado se detallan las características específicas de cada uno de los loci. En la Figura IV.1 del Apéndice se muestran los patrones de movilidad electroforética de los once sistemas polimórficos resultantes.

Se han identificado un total de treinta y ocho electromorfos y, tomando como criterio de polimorfismo el del 95%, diez sistemas (GPI, 6-Pgd, PGM-1, MDH-S, MDH-M, G6PD, Pac, Pr, Gc y Pi-3) resultaron ser monomórficos para todas las poblaciones, además de los que se detallan en la Tabla IV.1 para cada una de las diferentes razas.

Las frecuencias génicas obtenidas para cada locus polimórfico y raza se muestran en la Tabla IV.2, variando la distribución de electromorfos desde uno para los loci monomórficos hasta cinco en el locus Tf. Los valores de frecuencias para cada una de las subpoblaciones se detallan en la Tabla IV.3 del Apéndice.

La constitución alélica fue similar en las diez razas estudiadas, aunque cabe reseñar algunos puntos de interés.

Se observó una nueva variante electroforética, no descrita, en el sistema Leucin Aminopeptidasa (Lap), en las poblaciones de Podenco Ibicenco y Podenco Canario, a la que

**Tabla IV.1.- Número de electromorfos y razas polimórficas
(criterio del 95%) para cada uno de los 11
sistemas polimórficos analizados**

Locus	Número de electromorfos	Razas									
		GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
<u>Sod</u>	2	-	*	*	-	-	*	-	-	-	-
<u>Lap</u>	3	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
<u>MPI</u>	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-
<u>Alb</u>	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<u>Pep-D</u>	2	*	-	*	*	*	*	*	-	*	*
<u>Tf</u>	5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<u>α1-B</u>	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<u>Pi-1</u>	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<u>Prt-1</u>	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<u>Prt-2</u>	2	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-
<u>Pa-1</u>	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

(*) población polimórfica
(-) población no polimórfica

Tabla IV.2.- Valores de las frecuencias génicas obtenidos para cada uno de los 11 loci polimórficos en las 10 razas caninas españolas

LOCUS	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
Sod										
(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
A	0,973	0,918	0,878	1,000	0,952	0,868	0,967	0,993	1,000	0,955
B	0,027	0,082	0,122	0,000	0,048	0,132	0,033	0,007	0,000	0,045
Lap										
(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
A	0,968	0,991	1,000	0,988	0,952	1,000	1,000	0,930	0,967	1,000
B	0,032	0,009	0,000	0,012	0,048	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,049	0,033	0,000
MPI										
(N)	85	49	27	42	24	35	41	63	10	27
A	0,906	0,724	0,667	0,821	0,688	0,857	0,817	0,937	0,700	0,981
B	0,094	0,276	0,333	0,179	0,313	0,143	0,183	0,063	0,300	0,019
Alb										
(N)	93	55	45	42	31	53	46	70	15	32
S	0,575	0,518	0,667	0,881	0,452	0,377	0,848	0,529	0,867	0,578
F	0,425	0,482	0,333	0,119	0,548	0,623	0,152	0,471	0,133	0,422
Pep-D										
(N)	93	55	45	42	31	45	46	71	15	33
A	0,876	0,964	0,900	0,905	0,903	0,900	0,870	0,958	0,933	0,909
B	0,124	0,036	0,100	0,095	0,097	0,100	0,130	0,042	0,067	0,091
Tf										
(N)	93	55	45	42	31	52	46	70	15	33
A	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,029	0,000	0,000
B	0,457	0,582	0,300	0,107	0,500	0,587	0,272	0,257	0,067	0,424
C	0,532	0,418	0,489	0,881	0,500	0,404	0,728	0,714	0,933	0,545
D	0,000	0,000	0,211	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
E	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030
α_1-B										
(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
S	0,602	0,273	0,589	0,429	0,661	0,443	0,348	0,796	0,633	0,561
F	0,398	0,727	0,411	0,571	0,339	0,557	0,652	0,204	0,367	0,439

.../...

Tabla IV.2.- Continuación

LOCUS	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
Pi-1										
(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
S	0,231	0,155	0,600	0,190	0,290	0,236	0,098	0,585	0,133	0,273
I	0,161	0,073	0,011	0,333	0,097	0,028	0,033	0,049	0,300	0,136
F	0,608	0,773	0,389	0,476	0,613	0,736	0,870	0,366	0,567	0,591
Prt-1										
(N)	91	55	45	42	31	43	46	69	15	32
S	0,055	0,018	0,044	0,000	0,000	0,058	0,054	0,022	0,100	0,063
F	0,709	0,718	0,778	0,655	0,468	0,744	0,402	0,630	0,667	0,656
D	0,236	0,264	0,178	0,345	0,532	0,198	0,543	0,348	0,233	0,281
Prt-2										
(N)	89	54	40	42	29	40	45	67	15	31
S	0,028	0,028	0,013	0,012	0,052	0,025	0,000	0,007	0,000	0,032
F	0,972	0,972	0,987	0,988	0,948	0,975	1,000	0,993	1,000	0,968
Pa-1										
(N)	66	34	28	30	30	34	37	40	15	23
S	0,636	0,691	0,750	0,750	0,667	0,691	0,135	0,675	0,800	0,696
F	0,364	0,309	0,250	0,250	0,333	0,309	0,865	0,325	0,200	0,304

(N) corresponde al tamaño de muestra analizado

hemos designado tentativamente como Lap^C, con frecuencias génicas de 0,049 y 0,033 respectivamente. Al subdividir el Podenco Ibicenco en dos subpoblaciones denominadas PE1. Catalunya y PE2. Baleares, la nueva variante toma unos valores de frecuencia génica de 0,012 y 0,100 respectivamente, con lo cual vemos que presenta una mayor incidencia en la población de podencos insulares. De los seis individuos hallados, en la subpoblación de Baleares, cuatro eran descendientes directos del mismo progenitor y los otros dos también estaban emparentados entre sí, pues uno era bisabuelo del otro. A pesar de que serían necesarios otros cruzamientos prueba para confirmar la base genética de la herencia de este nuevo alelo, las relaciones de parentesco existentes entre los individuos portadores del mismo, parecen confirmar la hipótesis de que el sistema se rige por tres alelos codominantes, localizados en un locus autosómico.

Referente al sistema Peptidasa-D (Pep-D), debemos señalar que se han observado los tres alelos descritos por Los y col. (1973) y por Dhyan y Bouw (1983), Pep-D^A, Pep-D^B y Pep-D^C con movilidades intermedia, lenta y rápida respectivamente. No obstante, debido a la difícil interpretación de este sistema y al presumible error que se comete al no poder diferenciar los individuos heterocigotos Pep-D^B/Pep-D^C, los cuales se solapan y confunden con los Pep-D^A/Pep-D^A, se ha optado por realizar una lectura dialélica A/B, con lo cual reducimos el posible error cometido en el posterior cálculo de las frecuencias genotípicas y génicas.

En el sistema Transferrina (Tf) sólo dos razas presentan el alelo Tf^E, el Gos d'Atura y el Podenco Ibérico, con frecuencias respectivas de 0,005 y 0,030 y también sólo dos el alelo Tf^D, el Mastín Español con una frecuencia comparativamente alta de 0,211 y el Perdiguero de Burgos con una frecuencia de 0,012. Además, las tres subpoblaciones de

Mastín Español presentan frecuencias muy similares, 0,200 para ME1, 0,250 para ME2 y 0,179 para ME3.

Cabe, por último, resaltar la alta incidencia del alelo Pa-1^F en el sistema Postalbúmina-1 (Pa-1) en la población de Ca de Bestiar, con una frecuencia de 0,865, en clara confrontación con todas las demás razas en las que su frecuencia oscila entre valores de 0,200 para Podenco Canario y 0,364 para Gos d'Atura. Las tres subpoblaciones de Ca de Bestiar toman valores para Pa-1^F de 0,816 para CB1, 1,000 para CB2 y de 0,864 para CB3.

Por otra parte, las proteínas estructurales plasmáticas (Alb, Tf, Pi-1, α_1 -B, Prt-1, Prt-2, Gc, Pr, Pi-3 y Pa-1), que suponen el 47,62% de los 21 loci analizados, muestran un nivel de polimorfismo mayor que los sistemas enzimáticos analizados (Sod, GPI, Lap, MPI, 6-Pgd, G6PD, PGM-1, MDH-S, MDH-M, Pep-D y Pac), explicando los primeros un 83,33% del polimorfismo total, en las poblaciones estudiadas.

Los diferentes sistemas polimórficos, en el conjunto de razas estudiadas, explican del polimorfismo total los siguientes porcentajes: Pi-1 (15,33%), Tf (14,21%), α_1 -B (14,02%), Prt-1 (13,78%), Pa-1 (13,66%), Alb (11,03%), MPI (7,74%), Pep-D (4,54%), Sod (3,03%), Lap (1,36%) y Prt-2 (1,30%).

Mediante una sola técnica, la electroforesis bidimensional en gel de agarosa-poliacrilamida, podemos visualizar cinco de los once sistemas polimórficos (Pi-1, α_1 -B, Prt-1, Prt-2 y Pa-1), explicando un 58,10% del polimorfismo total. Esto es importante para una de las aplicaciones prácticas del polimorfismo bioquímico, la identificación y control de parentescos.

En las Tablas IV.4 y IV.5 se muestra de forma resumida los niveles de variabilidad encontrados en las diferentes razas y subpoblaciones estudiadas.

Las diez razas analizadas muestran unos valores de Tasa de Polimorfismo (P) que oscilan entre un 33,3% (\pm 10,28%) para la población de Podenco Ibérico y un 42,9% (\pm 10,80%) para las poblaciones de Mastín Español, Galgo Español y Sabueso Español. Del mismo modo el número de alelos por locus (n_a) varía desde 1,5 (\pm 0,1) para Ca de Bestiar y Podenco Canario, hasta 1,7 (\pm 0,2) para las poblaciones de Gos d'Atura y Podenco Ibicenco. La heterocigosidad media observada por individuo (H_o), oscila entre valores que van desde 0,117 (\pm 0,037) para la raza Ca de Bestiar hasta 0,176 (\pm 0,049) para Galgo Español.

A nivel de subpoblaciones cabe destacar los valores de número de alelos por locus (n_a) observados en las subpoblaciones de Podenco Ibicenco. Para PE1. Catalunya (n_a) toma un valor de 1,7, mientras que en PE2. Baleares tan solo es de 1,4. Estos valores serán interesantes para discutir, posteriormente, la estructura genética de esta raza.

IV.2.- ESTRUCTURA GENETICA DE LAS POBLACIONES

Suponiendo que no se conozca la estructura reproductiva y geográfica de las poblaciones analizadas, el índice de fijación de Wright (1965), que mide el exceso o déficit de heterocigotos en la población analizada, nos da una aproximación de la estructura genética de las diferentes razas, tal como muestra la Tabla IV.6.

Ninguno de los valores obtenidos es significativamente diferente de 0 según el test de $X^2 = NF^2$ (Hedrick, 1985).

Tabla IV.4.- Niveles de variabilidad genética en las razas caninas españolas

POBLACION	INDIVIDUOS	NUMERO DE	PORCENTAJE	HETEROCIGOSIDAD	
	ANALIZADOS POR LOCUS	ALELOS POR LOCUS	DE LOCI POLIMORFICOS*	OBSERVADA	ESPERADA**
1. GOS D'ATURA	91,0 (1,3)	1,7 (0,2)	38,1	0,150 (0,042)	0,167 (0,048)
2. MASTIN PIRINEOS	53,5 (1,0)	1,6 (0,1)	38,1	0,148 (0,042)	0,158 (0,044)
3. MASTIN ESPAÑOL	42,6 (1,2)	1,6 (0,2)	42,9	0,169 (0,051)	0,176 (0,049)
4. PERDIGUERO BUR	41,4 (0,6)	1,6 (0,1)	38,1	0,125 (0,041)	0,139 (0,044)
5. GALGO ESPAÑOL	30,5 (0,3)	1,6 (0,1)	42,9	0,176 (0,049)	0,184 (0,049)
6. SABUESO ESPAÑOL	49,2 (1,4)	1,6 (0,2)	42,9	0,137 (0,037)	0,163 (0,044)
7. CA DE BESTIAR	45,3 (0,5)	1,5 (0,1)	38,1	0,117 (0,037)	0,130 (0,039)
8. PODENCO EIVIS	68,8 (1,5)	1,7 (0,2)	38,1	0,146 (0,045)	0,146 (0,045)
9. PODENCO CANARIO	14,8 (0,2)	1,5 (0,1)	38,1	0,130 (0,041)	0,139 (0,045)
10. PODENCO IBERICO	32,0 (0,5)	1,6 (0,2)	33,3	0,144 (0,045)	0,161 (0,049)

(Error estándar en paréntesis)

* Criterio del 95%

** Nei (1978)

Tabla IV.5.- Niveles de variabilidad genética en las diferentes subpoblaciones analizadas

POBLACION	INDIVIDUOS ANALIZADOS	NUMERO DE ALELOS POR LOCUS	PORCENTAJE DE LOCI POLIMORFICOS*	HETEROCIGOSIDAD	
	POR LOCUS	OBSERVADA ESPERADA**			
GA1. TIPICO	57,9 (0,8)	1,7 (0,2)	33,3	0,148 (0,043)	0,163 (0,048)
GA2. CERDA	33,2 (0,5)	1,7 (0,2)	42,9	0,154 (0,043)	0,170 (0,048)
MP1. ZARAGOZA	34,9 (0,9)	1,6 (0,1)	33,3	0,146 (0,043)	0,140 (0,040)
MP2. BENABARRE	11,0 (0,0)	1,4 (0,1)	28,6	0,135 (0,051)	0,136 (0,045)
MP3. RESTO	7,9 (0,1)	1,5 (0,1)	42,9	0,161 (0,045)	0,181 (0,052)
ME1. PRAT-RESTO	14,8 (0,2)	1,6 (0,2)	42,9	0,174 (0,054)	0,177 (0,050)
ME2. BARNA-NORTE	15,0 (0,6)	1,5 (0,1)	42,9	0,159 (0,048)	0,172 (0,049)
ME3. MADRID	13,2 (0,5)	1,5 (0,1)	42,9	0,176 (0,056)	0,175 (0,050)
PB1. BARCELONA	18,7 (0,3)	1,5 (0,1)	38,1	0,112 (0,039)	0,134 (0,043)
PB2. RESTO	22,7 (0,3)	1,5 (0,1)	38,1	0,135 (0,045)	0,141 (0,044)
GE1. CATALUNYA	20,3 (0,3)	1,6 (0,1)	52,4	0,182 (0,051)	0,194 (0,050)
GE2. RESTO	9,9 (0,1)	1,5 (0,1)	42,9	0,164 (0,050)	0,170 (0,050)

.../...

Tabla IV.5.- Continuación

POBLACION	INDIVIDUOS ANALIZADOS	NUMERO DE ALELOS POR LOCUS	PORCENTAJE DE LOCI POLIMORFICOS*	HETEROCIGOSIDAD	
	POR LOCUS	POR LOCUS	POLIMORFICOS*	OBSERVADA	ESPERADA**
SE1. CATALUNYA	24,1 (0,4)	1,6 (0,1)	42,9	0,133 (0,036)	0,143 (0,037)
SE2. ASTURIAS	25,6 (1,0)	1,5 (0,1)	38,1	0,135 (0,040)	0,162 (0,048)
CB1. MALLORCA	19,7 (0,2)	1,5 (0,1)	38,1	0,109 (0,039)	0,116 (0,038)
CB2. PALMA	12,7 (0,3)	1,4 (0,1)	33,3	0,128 (0,046)	0,131 (0,044)
CB3. RESTO	12,9 (0,1)	1,5 (0,1)	33,3	0,111 (0,036)	0,137 (0,043)
PE1. CATALUNYA	39,5 (0,9)	1,7 (0,2)	38,1	0,167 (0,052)	0,158 (0,048)
PE2. BALEARES	29,2 (0,6)	1,4 (0,1)	33,3	0,117 (0,039)	0,115 (0,039)
PC1. PC1.I	6,9 (0,1)	1,5 (0,1)	42,9	0,151 (0,054)	0,141 (0,047)
PC2. PC2.P	7,9 (0,1)	1,5 (0,1)	38,1	0,115 (0,039)	0,141 (0,046)
PI1. URGELL	9,8 (0,2)	1,5 (0,2)	33,3	0,133 (0,052)	0,167 (0,057)
PI2. GARRIGUES	16,5 (0,3)	1,5 (0,1)	38,1	0,136 (0,045)	0,153 (0,046)
PI3. RESTO	5,9 (0,1)	1,4 (0,1)	38,1	0,171 (0,053)	0,174 (0,053)

(Error estándar entre paréntesis)

* Criterio del 95%

** Nei (1978)

Tabla IV.6.- Valores obtenidos del índice de fijación (F) de Wright (1965) en las razas caninas españolas

Raza	F
(GA) Gos d'Atura	0,1018
(MP) Mastín Pirineos	0,0633
(ME) Mastín Español	0,0398
(PB) Perdiguero	0,1007
(GE) Galgo Español	0,0435
(SE) Sabueso Español	0,1595
(CB) Ca de Bestiar	0,1000
(PE) Podenco Ibicenco	0,0000
(PC) Podenco Canario	0,0647
(PI) Podenco Ibérico	0,1056

(*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001

por lo que, a pesar de que todas las razas -a excepción de Podenco Ibicenco- muestren déficit de heterocigotos, como promedio y tomando todos los loci en conjunto, no podemos asegurar que dichas poblaciones se encuentren en desequilibrio genético para las proporciones de Hardy - Weinberg. Esta ausencia de significación podíamos esperarla debido a la gran importancia que tiene el tamaño de la muestra analizada (ver apartado III.3.1). Así por ejemplo, para que el valor de (F) en la población de Gos d'Atura ($F = 0,1018$) hubiera sido estadísticamente significativo al nivel del 5%, habríamos tenido que disponer de un tamaño de muestra de unos 375 individuos. Al ser el tamaño de muestra pequeño, los resultados deben ser interpretados con precaución.

Más preciso, fiable e informativo, resulta calcular dicho índice para cada locus polimórfico, siendo en este caso un buen indicador de la estructura genotípica de un locus concreto en una población determinada. Las frecuencias genotípicas esperadas se calcularon utilizando la fórmula de Levene (1949) para tamaños pequeños de muestra, repitiéndose el test de Chi-cuadrado en aquellos loci en los que se presentaban más de dos alelos, según la metodología expuesta en el apartado III.3.1. En cada caso se han calculado los índices (F) y (D) para medir el déficit o exceso de heterocigotos encontrados. En la Tabla IV.7 del Apéndice se muestran los resultados detallados para cada raza.

Sólo dos razas mostraban desequilibrio para las proporciones Hardy - Weinberg en alguno de los loci. En concreto, Sabueso Español (SE) para los sistemas $Tf^{(**)}$ y $Prt-1^{(*)}$, siendo el déficit de heterocigotos (D) de $-0,382$ y $-0,374$, respectivamente y Podenco Ibicenco para el sistema $\alpha_1-B^{(*)}$ tomando (D) un valor de $-0,269$.

Estos valores significativos de déficit de heterocigotos nos pueden hacer sospechar, en una primera

instancias, que las razas en cuestión son el producto de una división de las mismas en subpoblaciones (efecto Wahlund) o que alguna de las fuerzas evolutivas, que cambian los valores de las frecuencias génicas, ha tenido una especial importancia en el devenir de la raza. Estas hipótesis deberán ser confirmadas posteriormente con el estudio de la diferenciación interpoblacional mediante el uso de los F-estadísticos.

A nivel de subpoblaciones sólo cinco razas, Gos d'Atura, Mastín de los Pirineos, Mastín Español, Ca de Bestiar y Podenco Canario, mostraban equilibrio genético para todos los loci en todas las subpoblaciones. Las demás presentaban alguna subpoblación en desequilibrio significativo para algún locus, tal como refleja la Tabla IV.8.

IV.3.- LOS F-ESTADISTICOS EN LA DIFERENCIACION INTERPOBLACIONAL

Si tenemos una población subdividida, se puede medir el exceso o déficit de heterocigotos en cada subpoblación (F_{IS}) y en la población conjunta (F_{IT}), así como el grado de diferenciación genética existente entre las subpoblaciones (F_{ST}). Estos parámetros se relacionan mediante la siguiente fórmula (Wright, 1965, 1978; Nei, 1977):

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

El análisis intra e interpoblacional mediante los F-estadísticos, se ha realizado a seis niveles distintos:

- 1) Subpoblaciones respecto al total
- 2) Razas respecto al total
- 3) Troncos ancestrales respecto al total

Tabla IV.8.- Loci y déficit de heterocigotos (D) de las subpoblaciones que muestran desequilibrio genético significativo para las proporciones Hardy - Weinberg

Subpoblación	Locus	D
PB1.Barcelona	<u>MPI</u> [†]	-0,692
EE1.Catalunya	<u>Alb</u> [†]	-0,518
SE2.Asturias	<u>Prt-1</u> [†]	-0,494
PE1.Catalunya	<u>Pi-1</u> [†]	+0,220
PE2.Baleares	<u>Alb</u> [†]	-0,424
PI1.Urgell	<u>Pa-1</u> [†]	-1,000
PI2.Garrigues	<u>Alb</u> ^{††}	-0,754

(†) P < 0,05; (††) P < 0,01; (†††) P < 0,001

- 4) Subpoblaciones dentro de cada raza
- 5) Análisis jerárquico de Wright
- 6) Comparación directa entre razas

IV.3.1.- SUBPOBLACIONES RESPECTO AL TOTAL

Los resultados obtenidos, quedan reflejados en la Tabla IV.9. Los valores de Chi-cuadrado se refieren al test de significación realizado para el estadístico $F(ST)$.

El valor medio $F_{IS} = 0,028$ nos indica que existe un déficit global de heterocigotos del 2,8% como promedio, en el conjunto de loci, para cada subpoblación. El valor $F_{IT} = 0,164$ expresa el déficit existente de heterocigotos en la población conjunta -razas caninas españolas- y por último, el valor $F_{ST} = 0,141$ nos indica que el promedio de diferenciación genética entre las subpoblaciones es de un 14,1%, valor que resulta altamente significativo teniendo en cuenta el conjunto de loci; para cada locus particular se mantiene el mismo nivel de significación, a excepción de los loci Prt-2 y Pep-D, para los que las diferencias no son significativas.

IV.3.2.- RAZAS RESPECTO AL TOTAL

La Tabla IV.10 refleja los resultados obtenidos. Al igual que antes, el valor medio $F_{IS} = 0,065$ nos indica que existe un déficit de heterocigotos del 6,5% como promedio para cada raza. El déficit de heterocigotos para el conjunto de la población, $F_{IT} = 0,157$, es aproximadamente igual al hallado anteriormente, mientras que el promedio de diferenciación entre razas toma un valor del 9,9%, que como era de esperar, es menor que el valor que nos marca la diferenciación existente entre subpoblaciones. El grado de diferenciación entre razas es altamente significativo para el

**Tabla IV.9.- Resultados del análisis de los F-estadísticos
(Nei, 1977) para cada locus variable de las
diferentes subpoblaciones en que se han
dividido las razas caninas españolas**

LOCUS	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	G.L
<u>Sod</u>	-0,057	0,053	0,105	101,6***	23
<u>Lap</u>	-0,075	-0,013	0,058	112,3***	46
<u>MPI</u>	0,128	0,229	0,116	93,5***	23
<u>Alb</u>	0,139	0,285	0,170	163,9***	23
<u>Pep-D</u>	0,105	0,133	0,031	29,5***	23
<u>Tf</u>	-0,079	0,084	0,151	582,2***	92
<u>a1B</u>	0,012	0,137	0,127	122,9***	23
<u>Pi-1</u>	0,023	0,184	0,164	317,5***	46
<u>Prt-1</u>	0,048	0,156	0,113	212,0***	46
<u>Prt-2</u>	-0,046	-0,016	0,028	25,3***	23
<u>Pa-1</u>	-0,034	0,165	0,193	130,1***	23
MEDIA	0,028	0,164	0,141	1890,8***	391

**Tabla IV.10.- Resultados del análisis de los F-estadísticos
(Nei, 1977) para cada locus variable de las
diferentes razas caninas españolas**

LOCUS	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	G.L
<u>Sod</u>	-0,018	0,026	0,044	42,6***	9
<u>Lap</u>	-0,044	-0,016	0,027	52,3***	18
<u>MPI</u>	0,180	0,240	0,073	59,0***	9
<u>Alb</u>	0,182	0,285	0,125	120,5***	9
<u>Pep-D</u>	0,137	0,147	0,011	10,5***	9
<u>Tf</u>	-0,003	0,132	0,134	516,7***	36
<u>a1B</u>	0,062	0,147	0,090	87,1***	9
<u>Pi-1</u>	0,044	0,154	0,115	222,6***	18
<u>Prt-1</u>	0,087	0,141	0,059	110,7***	18
<u>Prt-2</u>	-0,033	-0,020	0,012	10,8***	9
<u>Pa-1</u>	-0,054	0,092	0,138	93,0***	9
MEDIA	0,065	0,157	0,099	1325,8***	153

(*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (*** P < 0,001

conjunto de loci así como para cada locus en particular, a excepción de Prt-2 y Pep-D, como en el caso anterior.

IV.3.3.- TRONCOS ANCESTRALES RESPECTO AL TOTAL

Si englobamos a las diferentes razas en sus hipotéticos troncos ancestrales, basándonos para ello en la recopilación bibliográfica de datos históricos, arqueológicos, morfológicos y enzimáticos (Villemont y col., 1970; Tanabe y col., 1974; Boivin y col., 1983), tal como muestra la Tabla IV.11, podemos realizar, de forma similar, el análisis de los troncos ancestrales mediante los F-estadísticos, cuyos resultados se muestran en la Tabla IV.12. La raza Ca de Bestiar no se ha incluido en ningún tronco particular (*), ya que parece ser el resultado de cruces entre razas pertenecientes a diferentes troncos (Guasp, 1982; Sotillo y Serrano, 1985; Delalix, 1986).

El déficit de heterocigotos promedio para cada tronco ancestral se sitúa en torno al 11,2%. El valor del déficit de heterocigotos para la población global se mantiene, mientras que el grado de diferenciación entre troncos ancestrales es como promedio del 6,9%, estadísticamente significativo.

A modo de resumen de los tres últimos apartados se ha confeccionado la Tabla IV.13. Se puede apreciar que los valores F(IS) aumentan, como es lógico, hacia niveles jerárquicos superiores, indicando que los diferentes niveles son un "pool" de poblaciones subdivididas. El nivel Razas estaría formado por subpoblaciones distintas entre sí y el nivel Troncos Ancestrales lo integrarían a su vez diferentes razas.

Los valores F(IT) se mantienen más o menos constantes en todos los niveles, ya que nos dan una idea del déficit

Tabla IV.11.- Estructura jerárquica de las poblaciones

Troncos Ancestrales	Razas	Subpoblaciones
1.C.F.METRIS-OPTIMAE (93)	1.1. Gós d'Atura (93)	GA1. Típico (59) GA2. Cerdà (34)
2.C.F.INDOSTRANZEWI (100)	2.1. Mastín Pirineos (55)	MP1. Zaragoza (36) MP2. Benabarre (11) MP3. Resto (08)
	2.2. Mastín Español (45)	ME1. Prat-Resto (15) ME2. Barna-Norte (16) ME3. Madrid (14)
3.C.F.INTERMEDIUS (95)	3.1. Perdiguero B. (42)	PB1. Barcelona (19) PB2. Resto (23)
	3.2. Sabueso Español (53)	SE1. Catalunya (25) SE2. Asturias (28)
4.C.F.LEINERI (150)	4.1. Galgo Español (31)	GE1. Catalunya (21) GE2. Resto (10)
	4.2. Podenco Ibicenco (71)	PE1. Catalunya (41) PE2. Baleares (30)
	4.3. Podenco Canario (15)	PC1. PC1.I (07) PC2. PC2.P (08)
	4.4. Podenco Ibérico (33)	PI1. Urgell (10) PI2. Garrigues (17) PI3. Resto (06)
5.(*)CA DE BESTIAR (46)	5.1. Ca de Bestiar (46)	CB1. Mallorca (20) CB2. Palma (13) CB3. Resto (13)

(-) Las cifras entre paréntesis representan el número de individuos muestreados

(*) Ca de Bestiar, por su peculiar formación, no se ha asignado a ningún tronco ancestral concreto

Tabla IV.12.- Resultados del análisis de los F-estadísticos (Nei, 1977) para cada locus variable de los diferentes troncos ancestrales en que se han agrupado las razas caninas españolas

LOCUS	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	G.L.
<u>Sod</u>	0,012	0,030	0,019	18,4***	4
<u>Lap</u>	-0,032	-0,014	0,017	32,9***	8
<u>MPI</u>	0,202	0,229	0,034	27,5***	4
<u>Alb</u>	0,229	0,268	0,050	48,2***	4
<u>Pep-D</u>	0,140	0,148	0,009	8,6***	4
<u>Tf</u>	0,074	0,103	0,032	123,4***	16
<u>a1B</u>	0,097	0,158	0,068	65,8***	4
<u>Pi-1</u>	0,105	0,159	0,060	116,2***	8
<u>Prt-1</u>	0,139	0,191	0,060	112,6***	8
<u>Prt-2</u>	-0,023	-0,018	0,005	4,5***	4
<u>Pa-1</u>	-0,004	0,204	0,207	139,5***	4
MEDIA	0,112	0,174	0,069	697,6***	68

Tabla IV.13.- Valores promedio de los F-estadísticos (Nei, 1977) según los diferentes niveles de jerarquía

NIVEL	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado (1)	G.L.	Chi-cuadrado (2)	G.L.
SUBPOB	0,028	0,164	0,141	119,71***	11	1890,8***	391
RAZAS	0,065	0,157	0,099	115,85***	11	1325,8***	153
TR.ANC	0,112	0,174	0,069	127,48***	11	697,6***	68

(*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001

(1) Valor de chi-cuadrado para F(IT) con los correspondientes grados de libertad

(2) Valor de chi-cuadrado para F(ST) con los correspondientes grados de libertad

Tabla IV.15.- Tabla resumen de la estructura genética de las razas caninas españolas, analizadas cada una de ellas a partir de las subpoblaciones que las integran

RAZA	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	G.L.	Chi-cuadrado	G.L.
GA	0,082	0,094	0,013	10,17	11	38,3***	15
MP	-0,011	0,098	0,108	10,08	11	128,2***	26
ME	-0,011	0,015	0,026	14,50	10	30,7	26
PB	0,077	0,095	0,020	12,24	10	16,0	12
GE	0,009	0,024	0,015	9,12	11	11,9	12
SE	0,102	0,158	0,062	20,57*	10	77,9***	13
CB	0,060	0,103	0,045	14,20	9	42,7**	22
PE	-0,055	0,002	0,054	12,76	11	100,9***	15
PC	-0,021	0,007	0,027	4,78	9	7,0	11
PI	0,053	0,082	0,030	5,43	10	27,0	26

(*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001

jerarquizada de la Tabla IV.11, siguiendo el método propuesto por Wright (1978), obteniéndose los valores del estadístico (F) para cada nivel de jerarquía con respecto a los demás. Si denominamos S,R,A y G a las Subpoblaciones, Razas, Troncos Ancestrales y Total, respectivamente, el valor F(SG) representaría el grado de diferenciación existente entre el nivel más bajo (Subpoblación) y el Total, F(SR) representaría el nivel de diferenciación existente entre las Subpoblaciones y las Razas, y así sucesivamente. Los resultados obtenidos al aplicar el análisis jerárquico de Wright, se muestran en la Tabla IV.16.

El grado máximo de diferenciación se obtiene en la variación de las subpoblaciones con respecto al nivel de troncos ancestrales (0,112), pero este valor es análogo al obtenido por la variación de las subpoblaciones con respecto al total (0,109). -posibles errores de computación nos pueden haber llevado a estas pequeñas diferencias, ilógicas y no significativas- indicando que el nivel de diferenciación existente entre las subpoblaciones de cada tronco ancestral es de la misma magnitud que el existente a nivel global.

Cuando comparamos a nivel de razas, observamos que la diferenciación disminuye. Existen menos diferencias entre razas que entre subpoblaciones de diferentes razas. Sin embargo se mantiene la analogía de valores en la diferenciación respecto a los troncos ancestrales ($F_{RA} = 0,080$) y respecto al total de la población ($F_{RG} = 0,076$), es decir, puede existir el mismo nivel de diferenciación entre razas que pertenecen al mismo tronco ancestral que entre razas que pertenecen a troncos distintos.

El valor superior de $F_{RA} = 0,080$ respecto al valor $F_{SR} = 0,035$, nos está indicando que existe más diferenciación entre el nivel razas (tomado el valor como una media de las razas) respecto al nivel troncos ancestrales, que entre el

Tabla IV.16.- Análisis jerárquico de la diferenciación genética existente entre las poblaciones caninas españolas

COMPARACION		F_{xy}
X	Y	
SUBPOBLACION	- RAZAS	0,035
SUBPOBLACION	- TRONCOS ANCESTRALES	0,112
SUBPOBLACION	- TOTAL	0,109
RAZAS	- TRONCOS ANCESTRALES	0,080
RAZAS	- TOTAL	0,076
TRONCOS ANCESTRALES	- TOTAL	-0,004

nivel subpoblaciones (tomado el valor como una media de las subpoblaciones) respecto al nivel razas.

IV.3.6.- COMPARACION DIRECTA ENTRE RAZAS

Se ha realizado el análisis mediante los F-estadísticos para calcular el grado de diferenciación genética existente entre las razas comparadas dos a dos (Tabla IV.17), comprobando si existen o no diferencias significativas entre ellas.

Sólo dos pares de razas (GA-PI) y (PB-PC), no muestran diferenciación genética entre ellas; todos los demás muestran diferencias altamente significativas (***) a excepción del par (MP-SE) que muestra significación al nivel del 0,05. Además, si juntamos estos tres pares de subpoblaciones en tres poblaciones respectivas, comprobamos que no existe déficit significativo de heterocigotos en las tres hipotéticas poblaciones. Esto nos indica que las estructuras genéticas de estas razas tomadas dos a dos, son altamente semejantes. Estos resultados, como veremos posteriormente, concuerdan con otros tipos de análisis.

Los valores de diferenciación génica $F(ST)$ entre las razas caninas españolas, oscilan en un rango comprendido entre el 0,3% para el par Gos d'Atura - Podenco Ibérico y el 13,7% para el par Ca de Bestiar - Podenco Ibicenco. Sin embargo, es a partir del 1,2% de diferenciación génica (par Mastín de los Pirineos - Sabueso Español) que dichos valores muestran diferencias estadísticamente significativas entre las razas.

Como el estadístico $F(ST)$ es una medida de las diferencias genéticas existentes entre OTUs y sus valores son por definición siempre positivos y comprendidos en un rango entre 0 y 1, pueden tomarse como una medida de la distancia

Tabla IV.17.- Resultados del análisis mediante los F-estadísticos (Nei, 1977) del conjunto de las razas caninas españolas comparadas dos a dos

RAZAS	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	6.L	Chi-cuadrado	6.L
GA-MP	0,075	0,101	0,028	20,71*	11	89,03***	15
GA-ME	0,060	0,090	0,032	26,64**	11	116,17***	16
GA-PB	0,092	0,133	0,045	34,21***	11	186,68***	16
GA-GE	0,059	0,077	0,020	27,54**	11	62,54***	15
GA-SE	0,123	0,138	0,017	34,34***	11	62,28***	15
GA-CB	0,095	0,172	0,086	37,66***	11	225,38***	15
GA-PE	0,048	0,076	0,029	16,97	11	133,64***	16
GA-PC	0,065	0,112	0,050	21,57*	11	187,95***	16
GA-PI	0,093	0,095	0,003	14,85	11	15,29	15
MP-ME	0,040	0,090	0,052	22,41*	11	124,07***	14
MP-PB	0,070	0,137	0,073	28,35**	11	173,60***	14
MP-GE	0,039	0,073	0,035	19,74*	11	66,96***	13
MP-SE	0,104	0,115	0,012	17,01	11	25,72*	14
MP-CB	0,072	0,162	0,096	30,53**	11	145,37***	13
MP-PE	0,026	0,111	0,087	33,16***	11	242,20***	15
MP-PC	0,042	0,126	0,088	18,83	11	109,32***	14
MP-PI	0,073	0,101	0,030	16,95	11	57,35***	14
ME-PB	0,054	0,107	0,056	27,15***	11	122,77***	14
ME-GE	0,026	0,064	0,039	21,09*	11	84,20***	14
ME-SE	0,088	0,130	0,046	21,99*	10	109,15***	14
ME-CB	0,056	0,177	0,128	48,62***	10	235,98***	13
ME-PE	0,013	0,047	0,034	23,15*	11	111,85***	16
ME-PC	0,027	0,082	0,057	9,86	11	93,23***	14
ME-PI	0,058	0,089	0,034	26,34**	10	63,84***	14
PB-GE	0,053	0,118	0,069	35,32***	11	115,78***	13
PB-SE	0,123	0,200	0,088	50,10***	11	193,78***	14
PB-CB	0,091	0,179	0,096	30,19**	11	135,96***	14
PB-PE	0,041	0,106	0,068	29,66**	11	156,11***	16
PB-PC	0,058	0,072	0,014	7,00	10	16,01	14
PB-PI	0,090	0,129	0,043	26,65**	11	100,69***	15
GE-SE	0,086	0,111	0,028	22,76*	11	57,57***	14
GE-CB	0,055	0,143	0,093	28,67**	11	122,31***	13
GE-PE	0,013	0,048	0,036	27,21**	11	87,54***	15
GE-PC	0,027	0,094	0,069	15,88	11	65,90***	14
GE-PI	0,056	0,079	0,024	21,55*	11	36,52***	14
SE-CB	0,127	0,227	0,115	41,29***	10	193,96***	13
SE-PE	0,079	0,136	0,062	35,01***	11	194,34***	15
SE-PC	0,096	0,184	0,097	34,02***	11	156,93***	14
SE-PI	0,122	0,138	0,018	19,35*	10	39,60***	14

.../...

Tabla IV.17.- Continuación

RAZAS	F(IS)	F(IT)	F(ST)	Chi-cuadrado	G.L	Chi-cuadrado	G.L
CB-PE	0,042	0,173	0,137	45,42***	11	286,04***	15
CB-PC	0,061	0,173	0,120	21,29*	10	113,87***	12
CB-PI	0,093	0,177	0,093	34,67***	10	123,96***	13
PE-PC	0,012	0,078	0,068	19,22	11	122,24***	15
PE-PI	0,045	0,072	0,027	10,85	11	82,09***	16
PC-PI	0,062	0,112	0,054	9,60	11	66,17***	14

(*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001

Tabla IV.18.- Matriz de distancias entre razas obtenida a partir de los valores F(ST)

	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
GA	*****									
MP	0,028	*****								
ME	0,032	0,052	*****							
PB	0,045	0,073	0,056	*****						
GE	0,020	0,035	0,039	0,069	*****					
SE	0,017	0,012	0,046	0,088	0,028	*****				
CB	0,086	0,096	0,128	0,096	0,093	0,115	*****			
PE	0,029	0,087	0,034	0,068	0,036	0,062	0,137	*****		
PC	0,050	0,088	0,057	0,014	0,069	0,097	0,120	0,068	*****	
PI	0,003	0,030	0,034	0,043	0,024	0,018	0,093	0,027	0,054	*****

genética entre las razas (Gregorius y Roberds, 1986), configurando con ellos una matriz de distancias (Tabla IV.18), utilizada posteriormente para la construcción de un árbol filogenético de las razas.

IV.4.- RELACION EXISTENTE ENTRE POBLACIONES MEDIANTE ANALISIS FACTORIAL DE COMPONENTES PRINCIPALES

El grado de relación entre las poblaciones, a nivel de razas, subpoblaciones y troncos ancestrales, puede ilustrarse mediante un análisis factorial de componentes principales. Para ello se han utilizado como variables las frecuencias alélicas de los once sistemas polimórficos analizados, resultando un total de diecisiete variables independientes.

Si estudiamos las relaciones existentes a nivel de razas, usando tres factores de componentes principales, obtenemos, como se muestra en la Tabla IV.19, la matriz de los componentes de varianza de los factores, en términos de las variables alélicas.

Lógicamente, las variables que tendrán más peso específico en el porcentaje de variación explicada por cada factor, serán aquellas cuyo valor absoluto sea mayor, por lo que, para una mejor valoración de la importancia relativa de cada una de ellas, se ha confeccionado la Tabla IV.20, que nos muestra los diferentes valores en orden decreciente según la varianza explicada por cada cada variable dentro de cada factor, habiéndose reemplazado por ceros los valores inferiores a 0,250 para su mejor interpretación.

En la Tabla IV.21 se dan los porcentajes de varianza explicada por cada variable para cada uno de los factores, sobre el total de varianza explicada por cada factor.

Tabla IV.19.- Matriz de los componentes de varianza de los factores, en términos de las variables alélicas independientes, a nivel de razas.

Variables	Factor I	Factor II	Factor III
<u>Sod</u> ^A	0,762	0,033	-0,604
<u>Lap</u> ^A	-0,159	-0,629	0,703
<u>Lap</u> ^B	-0,280	0,201	-0,785
<u>MPI</u> ^A	-0,001	0,075	-0,320
<u>Alb</u> ^S	0,890	-0,298	0,209
<u>Pep-D</u> ^A	0,031	0,549	-0,042
<u>Tf</u> ^A	-0,041	0,682	-0,324
<u>Tf</u> ^B	-0,952	-0,156	-0,101
<u>Tf</u> ^C	0,980	0,015	-0,141
<u>Tf</u> ^D	-0,119	0,308	0,726
<u>Pi-1</u> ^S	-0,217	0,825	0,170
<u>Pi-1</u> ^I	0,712	-0,060	-0,149
<u>a1-B</u> ^S	0,146	0,774	-0,321
<u>Prt-1</u> ^S	0,316	-0,106	0,412
<u>Prt-1</u> ^F	-0,177	0,476	0,608
<u>Prt-2</u> ^S	-0,751	-0,048	-0,373
<u>Pa-1</u> ^S	-0,037	0,651	0,193

Tabla IV.20.- Matriz ordenada y corregida, a nivel de razas, de los componentes de varianza.

Variables	Factor I	Factor II	Factor III
<u>Tf</u> ^C	0,980	0,000 [†]	0,000
<u>Tf</u> ^B	-0,952	0,000	0,000
<u>Alb</u> ^S	0,890	-0,298	0,000
<u>Sod</u> ^A	0,762	0,000	-0,604
<u>Prt-2</u> ^S	-0,751	0,000	-0,373
<u>Pi-1</u> ^I	0,712	0,000	0,000
<u>Pi-1</u> ^S	0,000	0,825	0,000
<u>g1-B</u> ^S	0,000	0,774	-0,321
<u>Tf</u> ^A	0,000	0,682	-0,324
<u>Pa-1</u> ^S	0,000	0,651	0,000
<u>Pep-D</u> ^A	0,000	0,549	0,000
<u>Lap</u> ^B	-0,280	0,000	-0,785
<u>Tf</u> ^D	0,000	0,308	0,726
<u>Lap</u> ^A	0,000	-0,629	0,703
<u>Prt-1</u> ^F	0,000	0,476	0,608
<u>Prt-1</u> ^S	0,316	0,000	0,412
<u>MPI</u> ^A	0,000	0,000	-0,320

(†) Los valores inferiores a 0,250 han sido reemplazados por ceros

Tabla IV.21.- Matriz de porcentajes, de varianza explicada por cada variable, para cada uno de los factores, sobre el total de varianza explicada por cada factor, a nivel de razas.

Variables	Factor I (1)	Factor II (2)	Factor III (3)
<u>Tf</u> ^C	20,73	0,01	0,63
<u>Tf</u> ^B	19,56	0,72	0,32
<u>Alb</u> ^S	17,10	2,64	1,38
<u>Sod</u> ^A	12,53	0,03	11,56
<u>Prt-2</u> ^S	12,17	0,07	4,41
<u>Pi-1</u> ^I	10,94	0,11	0,70
<u>Pi-1</u> ^S	1,02	20,23	0,92
<u>a1-B</u> ^S	0,46	17,81	3,27
<u>Tf</u> ^A	0,04	13,83	3,33
<u>Pa-1</u> ^S	0,03	12,60	1,18
<u>Pep-D</u> ^A	0,02	8,96	0,06
<u>Lap</u> ^B	1,69	1,20	19,53
<u>Tf</u> ^D	0,31	2,82	16,71
<u>Lap</u> ^A	0,54	11,76	15,66
<u>Prt-1</u> ^F	0,68	6,73	11,72
<u>Prt-1</u> ^S	2,15	0,33	5,38
<u>MPI</u> ^A	0,00	0,17	3,25

(1) El Factor I explica el 27,66% de la varianza total

(2) El Factor II explica el 21,66% de la varianza total

(3) El Factor III explica el 16,28% de la varianza total

De la observación de estas tres tablas, podemos interpretar que los alelos Tf^C, Tf^B, Alb^S, Sod^A, Prt-2^S y Pi-1^I, determinan, principalmente, el Factor I, que explica un 27,66% de la varianza total. Los alelos Pi-1^S, α1-B^S, Tf^A, Pa-1^S, Pep-D^A y Lap^A determinan, principalmente, el Factor II, que explica un 21,66% de la varianza total, y por último, los alelos Lap^B, Tf^D, Lap^A, Prt-1^F y Sod^A, determinan, principalmente, el Factor III, que explica un 16,28% de la varianza total.

En la Tabla IV.22 se muestran, en orden decreciente, los valores porcentuales de la varianza explicada por cada una de las 17 variables independientes. Podemos observar que, los cinco alelos que aportan más información, en cuanto a la diferenciación racial existente entre las razas caninas españolas, son, por este orden, Tf^C, Tf^B, Alb^S, Sod^A y Lap^A.

Y a modo de resumen, la Tabla IV.23 nos indica, sobre el total de variación existente y sobre el total de variación explicada, los diferentes valores porcentuales, correspondientes a cada uno de los sistemas polimórficos analizados. Se destaca, de manera muy notable, en cuanto a información aportada, el sistema Transferrina (Tf) con un 28,08% sobre el total de varianza explicada, siguiendo por este orden los sistemas Lap, Pi-1, Alb, Sod, Prt-1, α1B, Prt-2, Pa-1, Pep-D y MPI.

Las Figuras IV.2 y IV.3 muestran gráficamente la proyección de los puntos representativos de las razas sobre el plano factorial I-II -cuando se tiene en cuenta el Factor I y el Factor II de componentes principales-, y sobre un espacio tridimensional -cuando se tienen en cuenta los Factores I, II y III de componentes principales-, respectivamente.

Cuando utilizamos sólo dos factores (I y II) y proyectamos los puntos sobre el plano factorial I-II, la varianza

Tabla IV.22.- Matriz de valores porcentuales de la varianza, que explica cada una de las 17 variables alélicas, a nivel de razas.

Variables	(1)	(2)	(3)
	Factor I	Factor II	Factor III
<u>Tf</u> ^C	5,734	0,002	0,103
<u>Tf</u> ^B	5,410	0,156	0,052
<u>Alb</u> ^S	4,730	0,572	0,225
<u>Sod</u> ^A	3,466	0,006	1,882
<u>Lap</u> ^A	0,149	2,547	2,549
<u>Pi-1</u> ^S	0,282	4,382	0,150
<u>g1-B</u> ^S	0,127	3,858	0,532
<u>Prt-2</u> ^S	3,366	0,015	0,718
<u>Lap</u> ^B	0,467	0,260	3,179
<u>Prt-1</u> ^F	0,188	1,456	1,908
<u>Tf</u> ^A	0,011	2,996	0,542
<u>Tf</u> ^D	0,086	0,611	2,720
<u>Pi-1</u> ^I	3,026	0,024	0,114
<u>Pa-1</u> ^S	0,008	2,730	0,192
<u>Pep-D</u> ^A	0,005	1,941	0,010
<u>Prt-1</u> ^S	0,595	0,071	0,876
<u>MPI</u> ^A	0,000	0,037	0,529
TOTAL	27,660	21,660	16,280
			65,600
			100,00

(1) Porcentaje de varianza que explica cada variable, para cada uno de los factores, del total de la variación existente

(2) Porcentaje de varianza que explica cada variable, para los tres factores en conjunto, del total de la variación existente

(3) Porcentaje de varianza que explica cada variable, para los tres factores en conjunto, del total de la varianza explicada

Tabla IV.23.- Valores porcentuales de los once sistemas polimórficos, sobre el total de variación existente (1), y sobre el total de variación explicada (2), a nivel de razas.

Locus	(1)	(2)
<u>If</u>	18,423	28,084
<u>Lap</u>	9,151	13,949
<u>Pi-1</u>	7,978	12,161
<u>Alb</u>	5,527	8,425
<u>Sod</u>	5,354	8,162
<u>Prt-1</u>	5,094	7,766
<u>α1-B</u>	4,517	6,886
<u>Prt-2</u>	4,099	6,248
<u>Pa-1</u>	2,930	4,466
<u>Pep-D</u>	1,956	2,982
<u>MPI</u>	0,566	0,863

Figura IV.2.- Análisis factorial de componentes principales a dos factores de variación en las razas caninas españolas. Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.

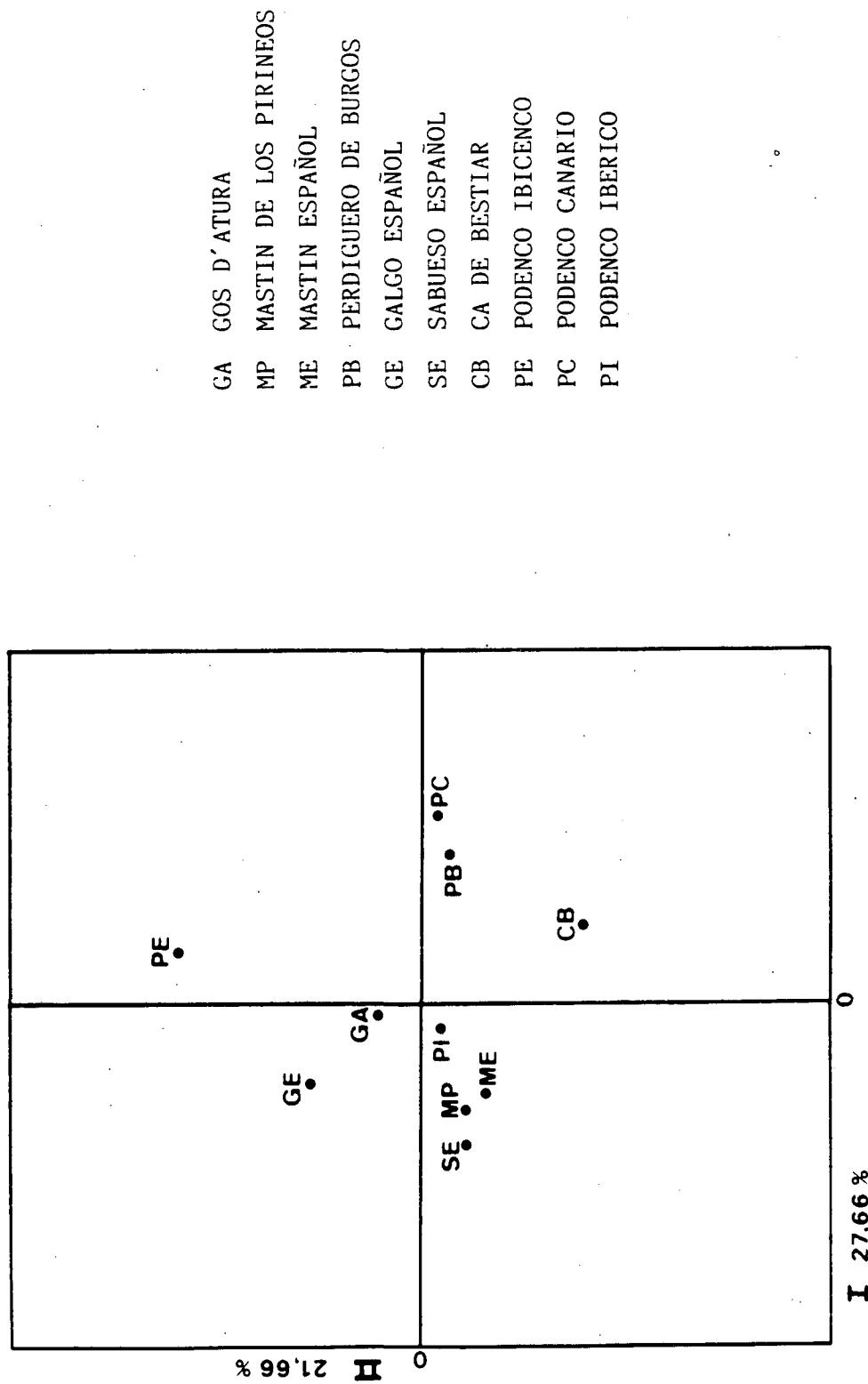
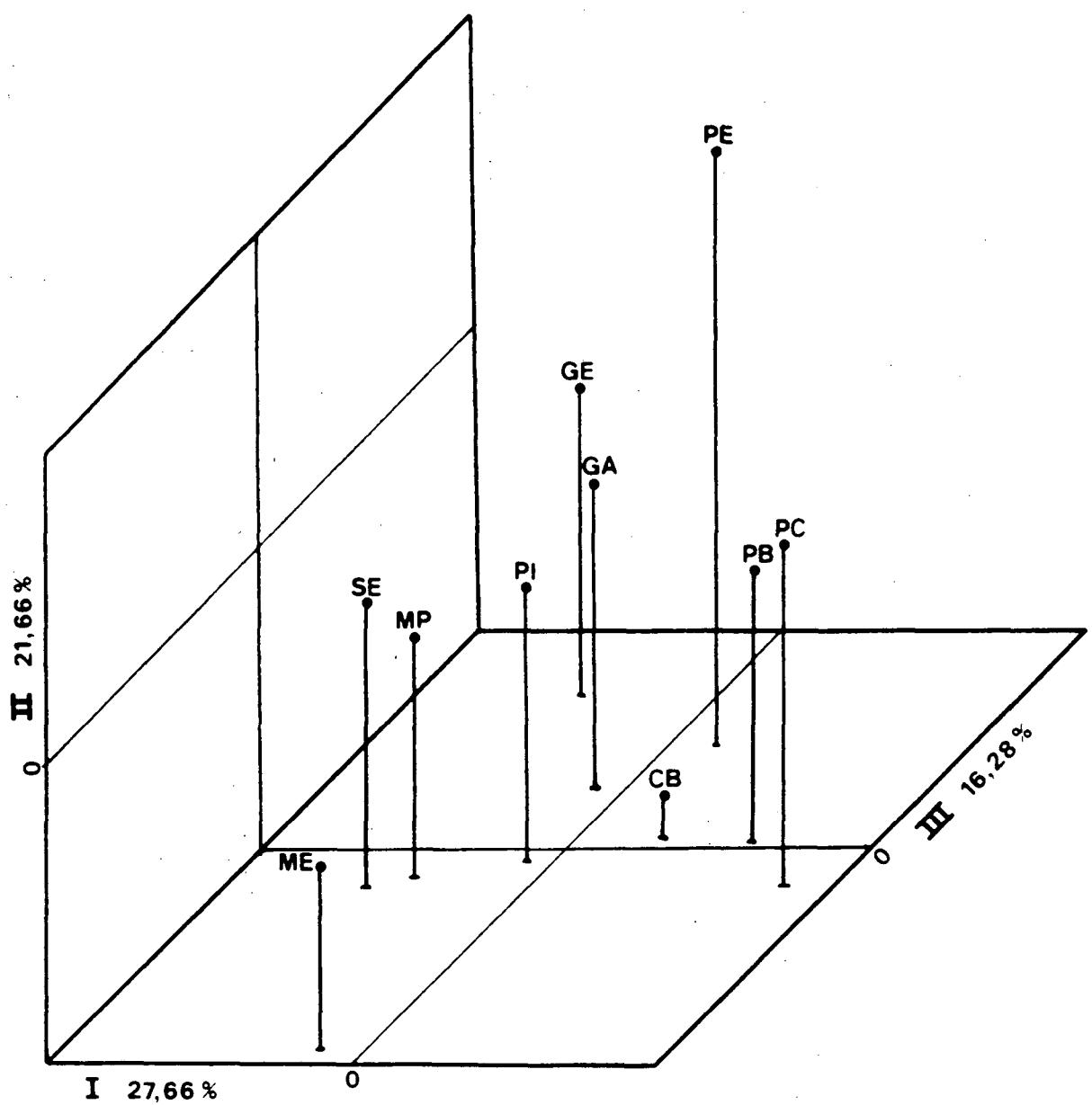


Figura IV.3.- Análisis factorial de componentes principales a tres factores de variación en las razas caninas españolas. Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.



total explicada es de un 49,32%. Las relaciones existentes a este nivel se dan entre las poblaciones de Podenco Canario y Perdiguero de Burgos por una parte, y por otra un gran grupo formado por seis razas, integrado por Gos d'Atura, Podenco Ibérico, Galgo Español, Mastín Español, Mastín de los Pirineos y Sabueso Español, aunque dentro de éste se observan unas relaciones más estrechas entre las razas Gos d'Atura - Podenco Ibérico y entre Mastín de los Pirineos - Sabueso Español - Mastín Español. La raza Galgo Español aunque relacionada con éstas queda algo descolgada de cualesquiera de los dos grupos; sin embargo, su relación más próxima podemos observarla con Gos d'Atura. Quedan como poblaciones aisladas sin relación alguna con ninguno de los grupos las razas Podenco Ibicenco y Ca de Bestiar.

Al utilizar tres factores, la varianza total explicada aumenta hasta un 65,60%, contribuyendo el nuevo Factor III en un 16,28%. Se mantiene la estrecha relación entre Podenco Canario y Perdiguero de Burgos. Se aclaran las relaciones existentes en el gran grupo central cuando realizábamos el análisis a dos factores, quedando por una parte el grupo formado por Gos d'Atura, Galgo Español y Podenco Ibérico, y por otra Mastín de los Pirineos y Sabueso Español. La raza Mastín Español queda como una población aislada, aunque más próxima al grupo formado por Mastín de los Pirineos y Sabueso Español que a ninguna otra raza. La población de Ca de Bestiar, aunque diferenciada de las demás, guarda una cierta relación con el grupo del Podenco Canario y Perdiguero. Por otra parte, continúa la clara diferenciación de la población de Podenco Ibicenco.

A nivel de subpoblaciones, el diagrama de la Figura IV.4 representa el primer y segundo componente principal, explicando cada uno de ellos el 19,97% y el 17,45% de la varianza total respectivamente, lo que da en conjunto un 37,42% del total de varianza. Se aprecian varios grupos

Figura IV.4.- Análisis factorial de componentes principales a dos factores de variación, a nivel de subpoblaciones.
Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.

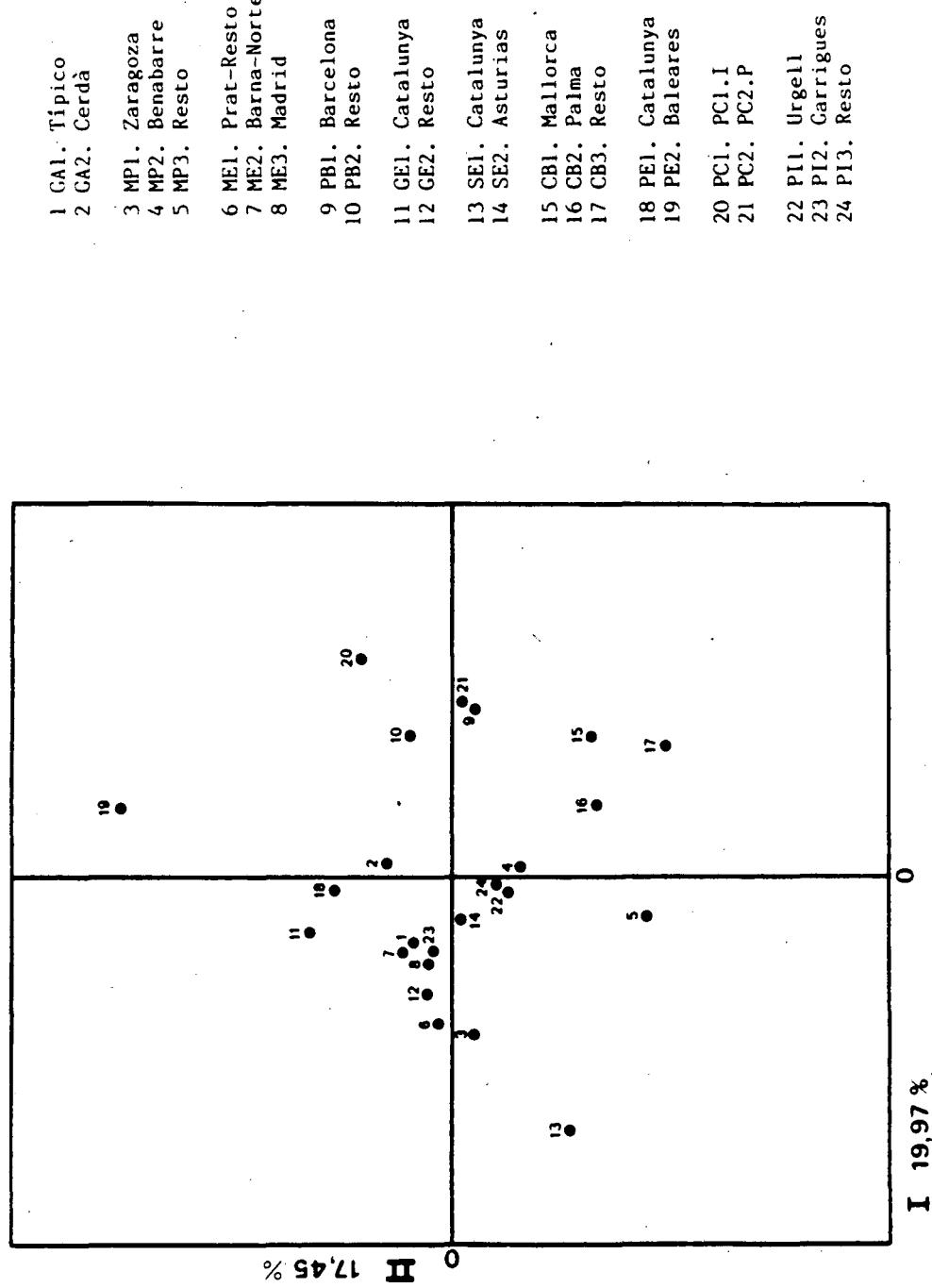
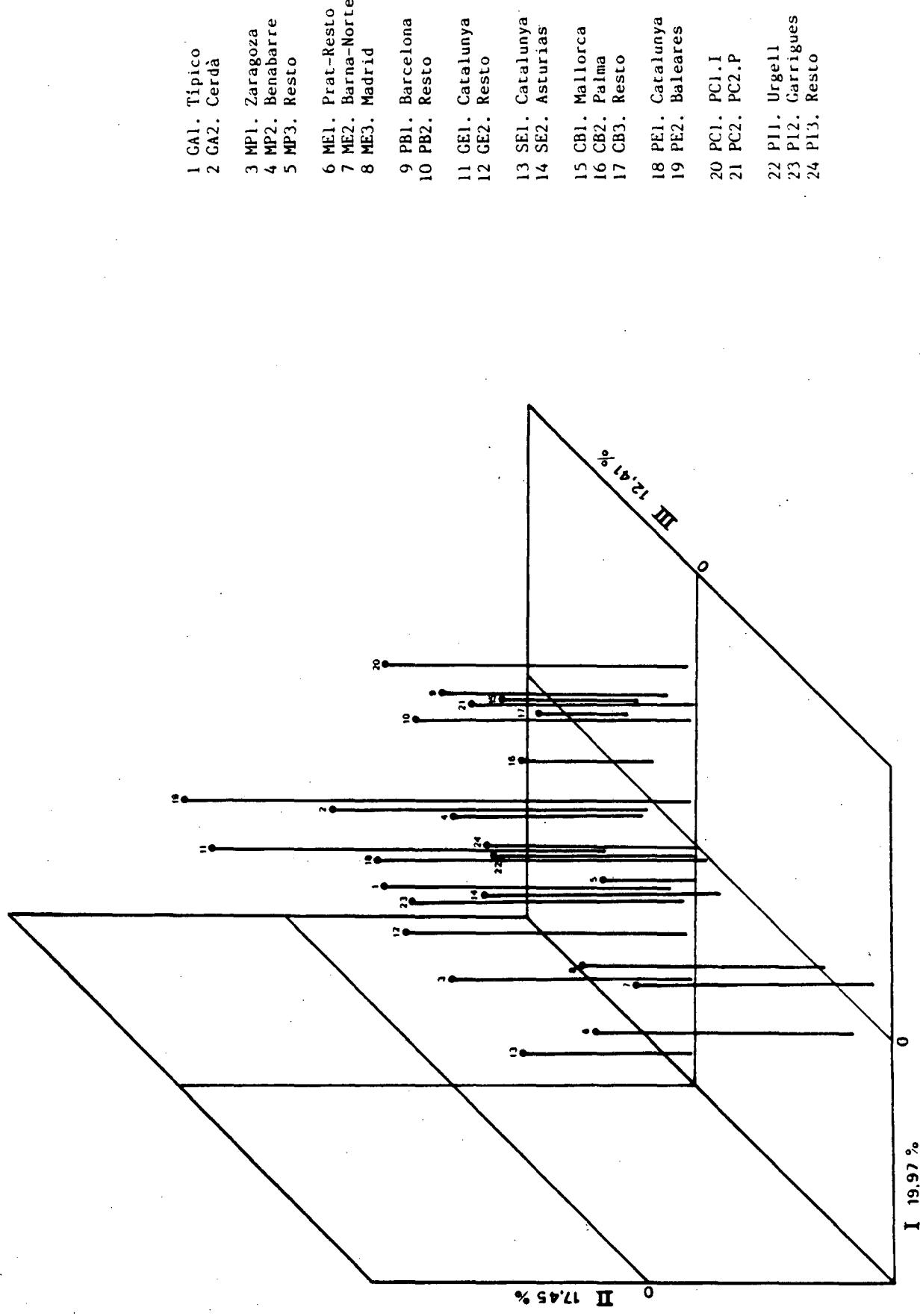


Figura IV.5.- Análisis factorial de componentes principales a tres factores de variación, a nivel de subpoblaciones. Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.



diferenciados; por una parte, las tres subpoblaciones de Ca de Bestiar forman un grupo estrechamente relacionado, mientras que las dos de Podenco Canario (PC1 y PC2) con las de Perdiguero de Burgos (PB1 y PB2) formarían otro grupo. Un gran grupo central lo forman las diferentes subpoblaciones de Gos d'Atura, Podenco Ibérico, Galgo Español, Mastín Español y las subpoblaciones PE1, SE2, MP1 y MP2, de Podenco Ibicenco, Sabueso Español y Mastín de los Pirineos respectivamente; finalmente, las subpoblaciones PE2, SE1 y MP3, son las que presentan mayor nivel de dispersión, claramente diferenciadas de cualquiera de los grupos.

Cuando realizamos el análisis a tres factores (Figura IV.5) el total de varianza explicada aumenta hasta el 49,83% contribuyendo el nuevo Factor III con un 12,41%. En líneas generales, el diagrama es equiparable al obtenido a nivel de razas que mostraba la Figura IV.3. No obstante, las relaciones intrarraciales se definen más claramente. Continúa la estrecha relación entre las subpoblaciones de Ca de Bestiar, las de Mastín Español, las de Gos d'Atura, las de Perdiguero de Burgos, las de Podenco Canario y las de Podenco Ibérico. Las razas restantes guardan una menor relación entre sus subpoblaciones, lo que nos indica un cierto grado de diferenciación genética intrarracial, que será corroborado y cuantificado posteriormente, así como las posibles causas que hayan podido originarlo.

Si englobamos todas las razas en sus hipotéticos troncos ancestrales y realizamos el análisis a dos factores, obtenemos las relaciones que muestra el diagrama de la Figura IV.6, pudiéndose explicar un 79,52% de la varianza total, repartida en un 46,14% para el Factor I y un 33,38% para el Factor II. Las relaciones existentes entre los grupos ya no son tan marcadas, ya que sólo el par formado por C.F.Metris-optimae y C.F.Leineri parecen guardar una relación más estrecha.

Figura IV.6.- Análisis factorial de componentes principales a dos factores de variación en los troncos ancestrales.
Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.

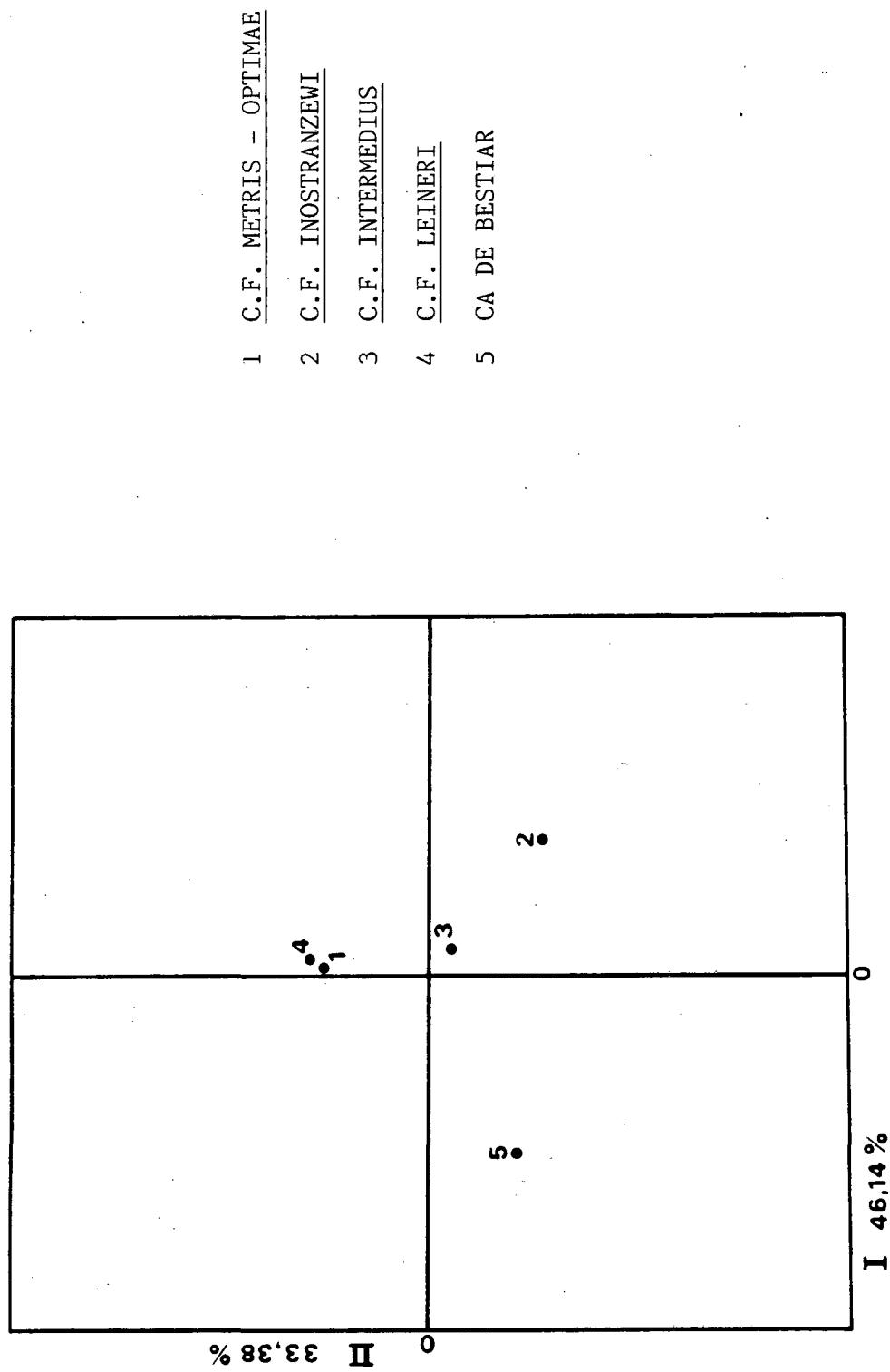
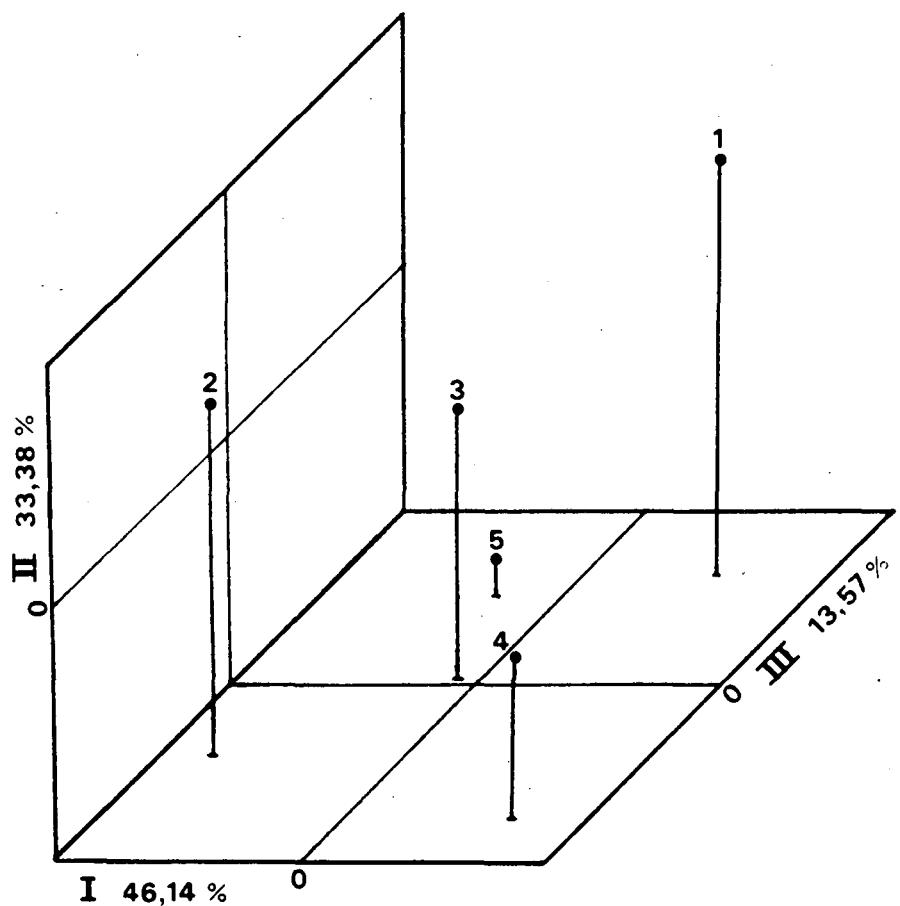


Figura IV.7.- Análisis factorial de componentes principales a tres factores de variación en los troncos ancestrales. Se usaron como variables las frecuencias génicas de los 11 sistemas polimórficos analizados.



- 1 C.F. Metris-Optimae
- 2 C.F. Inostranzewi
- 3 C.F. Intermedius
- 4 C.F. Leineri
- 5 Ca de Bestiar

Mediante el análisis a tres factores (Figura IV.7), discernir las posibles relaciones entre los grupos se hace extremadamente difícil, aunque se logra explicar el 93,09% de la varianza total, aportando el Factor III un 13,57%. Todos los troncos aparecen suficientemente alejados unos de otros. Las relaciones más próximas podríamos hallarlas entre los pares C.F.Inostranzewi y C.F.Intermedius. Con este grupo se relacionaría C.F.Leineri y posteriormente C.F.Metris - optimae.

La moderada magnitud de la varianza explicada cuando realizamos el análisis a nivel de subpoblaciones (49,83%) y a nivel de razas (65,60%), podría ser reflejo de la ausencia de un claro patrón de variación en el conjunto de las poblaciones.

IV.5.- DISTANCIAS GENETICAS INTRA E INTERRACIALES

A partir del análisis cuantitativo de los caracteres morfológicos y bioquímicos, se ha estimado el nivel de divergencia intra e interracial en las diferentes razas caninas españolas, mediante el cálculo de diversos índices de Distancia Genética.

La matriz de distancias obtenida a partir de los valores de diversidad génica (F_{ST}), ya ha sido comentada en el apartado IV.3.6, por lo que no reincidiremos sobre ella.

IV.5.1.- CARACTERES MORFOLOGICOS

Tomando como base la matriz de semejanzas morfológicas y aplicando la ecuación del apartado III.3.2.1.1., se han obtenido los resultados que se muestran en la Tabla IV.24.

Tabla IV.24.- Matriz de distancias genéticas entre las razas caninas españolas, obtenida a partir de datos procedentes de caracteres morfológicos

RAZAS	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
GA	0,0000									
MP	0,5625	0,0000								
ME	0,6250	0,0937	0,0000							
PB	0,6875	0,5000	0,4687	0,0000						
GE	0,6250	0,6562	0,6875	0,5937	0,0000					
SE	0,8125	0,4062	0,3750	0,3125	0,5625	0,0000				
CB	0,6250	0,6562	0,6875	0,6562	0,5625	0,7187	0,0000			
PE	0,4687	0,7187	0,6875	0,7187	0,5000	0,7187	0,5312	0,0000		
PC	0,5000	0,7187	0,6875	0,6875	0,5312	0,6562	0,5625	0,1562	0,0000	
PI	0,5312	0,7500	0,7812	0,6250	0,4687	0,6250	0,6250	0,3125	0,3437	0,0000

La distancia promedio entre razas toma un valor de 0,5729 (\pm 0,1562), con unos valores extremos de 0,0937 entre Mastín de los Pirineos y Mastín Español, y 0,8125 para el par Gos d'Atura - Sabueso Español.

En una primera lectura de la matriz de distancias se pueden hacer algunas observaciones. Comprobamos que los valores de distancia dentro del grupo de los Podencos (PE, PC y PI) son pequeños, así como entre las dos razas de Mastines y entre las razas Perdiguero de Burgos y Sabueso, lo cual en un principio puede dar consistencia a la inclusión de estas razas en sus "hipotéticos" troncos ancestrales. Las relaciones existentes entre las demás o entre grupos de razas serán discutidas posteriormente.

IV.5.2.- POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS

A partir de los valores de las frecuencias génicas y mediante la utilización de diversos índices de distancia genética, se han obtenido las estimaciones de divergencia intra e interracial. A continuación sólo presentamos los valores obtenidos utilizando el índice no sesgado de Nei (1978), ya que la existencia de abundante literatura en la que este índice ha sido utilizado, le confiere ventajas a efectos comparativos.

En la Tabla IV.25 se muestran los valores de identidad y distancia genética de Nei (1978) para el conjunto de las veinticuatro subpoblaciones de las diferentes razas caninas. El valor de distancia promedio intersubpoblacional es de 0,0206 \pm 0,0149 y la distancia media entre subpoblaciones pertenecientes a una misma raza toma un valor de 0,0068 \pm 0,0087.

**Tabla IV.25.- Valores de identidad y distancia genética
(Nei, 1978) para el conjunto de las 24
subpoblaciones estudiadas de las diferentes
razas caninas españolas**

SUBP.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 GA1	*****	0,997	0,986	0,961	0,983	0,987	0,985	0,997	0,976	0,983	0,990	1,000	0,980
2 GA2	0,003	*****	0,990	0,974	0,995	0,989	0,982	0,996	0,988	0,991	0,992	0,998	0,981
3 MP1	0,014	0,010	*****	0,960	0,993	0,988	0,972	0,985	0,970	0,973	0,975	0,990	0,991
4 MP2	0,040	0,027	0,041	*****	0,980	0,947	0,941	0,963	0,957	0,941	0,989	0,977	0,965
5 MP3	0,017	0,005	0,007	0,020	*****	0,981	0,969	0,982	0,979	0,978	0,982	0,983	0,987
6 ME1	0,013	0,011	0,012	0,054	0,020	*****	0,998	1,000	0,976	0,985	0,979	0,992	0,969
7 ME2	0,016	0,018	0,028	0,061	0,031	0,002	*****	1,000	0,970	0,985	0,978	0,986	0,957
8 ME3	0,003	0,004	0,015	0,038	0,018	0,000	0,000	*****	0,979	0,987	0,993	1,000	0,975
9 PB1	0,024	0,012	0,031	0,044	0,021	0,024	0,030	0,021	*****	0,998	0,975	0,976	0,939
10 PB2	0,017	0,009	0,027	0,060	0,022	0,015	0,015	0,013	0,002	*****	0,971	0,978	0,946
11 GE1	0,010	0,008	0,025	0,011	0,018	0,021	0,022	0,007	0,025	0,029	*****	1,000	0,972
12 GE2	0,000	0,002	0,010	0,023	0,017	0,008	0,014	0,000	0,024	0,022	0,000	*****	0,983
13 SE1	0,020	0,020	0,009	0,035	0,013	0,031	0,044	0,025	0,063	0,056	0,028	0,017	*****
14 SE2	0,003	0,001	0,013	0,023	0,006	0,012	0,017	0,001	0,019	0,017	0,006	0,000	0,019
15 CB1	0,034	0,031	0,050	0,046	0,029	0,052	0,059	0,047	0,023	0,035	0,036	0,034	0,073
16 CB2	0,045	0,042	0,055	0,047	0,034	0,053	0,057	0,053	0,040	0,049	0,037	0,036	0,076
17 CB3	0,029	0,025	0,045	0,038	0,016	0,054	0,054	0,044	0,028	0,035	0,034	0,034	0,055
18 PE1	0,002	0,004	0,024	0,036	0,022	0,013	0,009	0,000	0,026	0,016	0,008	0,002	0,028
19 PE2	0,027	0,034	0,066	0,075	0,066	0,036	0,018	0,013	0,040	0,031	0,028	0,025	0,083
20 PC1	0,023	0,014	0,041	0,057	0,042	0,016	0,025	0,015	0,004	0,005	0,025	0,020	0,074
21 PC2	0,015	0,003	0,024	0,045	0,018	0,012	0,018	0,011	0,000	0,000	0,023	0,018	0,050
22 PI1	0,000	0,005	0,018	0,037	0,013	0,016	0,011	0,002	0,023	0,017	0,009	0,000	0,024
23 PI2	0,000	0,000	0,010	0,035	0,013	0,011	0,017	0,001	0,015	0,011	0,011	0,001	0,019
24 PI3	0,000	0,000	0,006	0,027	0,000	0,008	0,014	0,000	0,007	0,004	0,004	0,000	0,015

Bajo la diagonal: Distancia Genética de Nei (1978)

Sobre la diagonal: Identidad Genética de Nei (1978)

Tabla IV.25.- Continuación

SUBP.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 GA1	0,997	0,966	0,956	0,971	0,998	0,974	0,977	0,985	1,000	1,000	1,000
2 GA2	0,999	0,970	0,959	0,975	0,996	0,967	0,986	0,997	0,995	1,000	1,000
3 MP1	0,987	0,951	0,947	0,956	0,977	0,936	0,960	0,977	0,982	0,990	0,994
4 MP2	0,977	0,955	0,954	0,963	0,965	0,928	0,944	0,956	0,964	0,966	0,974
5 MP3	0,994	0,971	0,966	0,984	0,978	0,936	0,958	0,982	0,987	0,987	1,000
6 ME1	0,988	0,949	0,949	0,948	0,987	0,965	0,984	0,988	0,984	0,989	0,992
7 ME2	0,983	0,943	0,945	0,948	0,991	0,982	0,975	0,982	0,989	0,983	0,986
8 ME3	0,999	0,954	0,948	0,957	1,000	0,987	0,985	0,989	0,998	0,999	1,000
9 PB1	0,981	0,978	0,961	0,972	0,975	0,961	0,996	1,000	0,977	0,985	0,993
10 PB2	0,983	0,966	0,952	0,965	0,984	0,969	0,995	1,000	0,983	0,989	0,996
11 GE1	0,994	0,964	0,964	0,967	0,992	0,972	0,976	0,977	0,991	0,990	0,996
12 GE2	1,000	0,967	0,964	0,966	0,998	0,976	0,981	0,983	1,000	0,999	1,000
13 SE1	0,981	0,930	0,927	0,947	0,973	0,920	0,929	0,951	0,976	0,982	0,985
14 SE2	*****	0,969	0,958	0,974	0,997	0,975	0,977	0,987	0,998	1,000	1,000
15 CB1	0,032	*****	0,995	0,999	0,958	0,932	0,961	0,972	0,975	0,962	0,976
16 CB2	0,043	0,005	*****	0,991	0,951	0,922	0,944	0,956	0,970	0,946	0,961
17 CBS	0,027	0,001	~0,009	*****	0,965	0,931	0,950	0,970	0,982	0,966	0,981
18 PE1	0,003	0,043	0,050	0,036	*****	0,985	0,979	0,987	0,998	0,998	1,000
19 PE2	0,026	0,071	0,081	0,072	0,015	*****	0,973	0,967	0,980	0,974	0,976
20 PC1	0,023	0,040	0,057	0,052	0,021	0,028	*****	1,000	0,972	0,984	0,986
21 PC2	0,013	0,029	0,045	0,030	0,013	0,034	0,000	*****	0,982	0,993	0,998
22 PI1	0,002	0,026	0,030	0,018	0,002	0,020	0,028	0,018	*****	0,996	1,000
23 PI2	0,000	0,039	0,056	0,034	0,002	0,026	0,016	0,007	0,004	*****	1,000
24 PI3	0,000	0,025	0,039	0,019	0,000	0,024	0,015	0,002	0,000	0,000	*****

Bajo la diagonal: Distancia Genética de Nei (1978)

Sobre la diagonal: Identidad Genética de Nei (1978)

Los valores medios de distancia genética entre subpoblaciones de la misma raza y entre subpoblaciones de razas distintas, se aprecian mejor en la Tabla IV.26.

Observamos que las distancias genéticas intrarraciales, adquieren una magnitud relativa considerable en tres de las razas; la distancia media entre las subpoblaciones de Mastín del Pirineo toma un valor de 0,023 con unos valores extremos de 0,007 y 0,041; Sabueso Español toma un valor de 0,019 y Podenco Ibicenco de 0,015. Las distancias intrarraciales en las demás razas poseen valores cercanos a cero (0,000 - 0,005) indicándonos que la diferenciación genética existente entre subpoblaciones de la misma raza es nula o casi nula.

Si ahora comparamos las distintas subpoblaciones que forman el tronco ancestral del C.F.Inostranzewi (formado por las razas Mastín del Pirineo y Mastín Español), comprobamos que las mayores diferencias existentes se deben a la subpoblación MP2.Benabarre, oscilando entre unos valores de distancia de 0,038 y 0,061; mientras que MP1.Zaragoza y MP3.Resto con respecto a las subpoblaciones de Mastín Español oscilan entre un rango de 0,012 y 0,031.

Igualmente, si se comparan las dos subpoblaciones de Sabueso Español con las dos de Perdiguero de Burgos, que en conjunto forman el tronco ancestral del C.F.Intermedius, se puede observar que los valores máximos de distancia entre subpoblaciones corresponden al SE1.Catalunya ($D = 0,056-0,063$), mientras que SE2.Asturias oscila entre unos valores de 0,017 y 0,019.

En cuanto al Podenco Ibicenco, al compararlo con las subpoblaciones que integran el tronco ancestral del C.F.Leineri, es decir las del Podenco Canario (2), Podenco Ibérico (3) y Galgo Español (2), vemos que las mayores diferencias entre ellas corresponden al PE2.Baleares, cuyos

Tabla IV.26.- Valores medios de distancia genética (Nei, 1978) entre subpoblaciones de la misma raza (sobre la diagonal) y entre subpoblaciones de razas distintas (bajo la diagonal)

RAZAS	No. SUB	1	2	3	4	5	6
1 GA	4	0,003 (0,003-0,003)					
2 MP	3	0,019 (0,005-0,040)	0,023 (0,007-0,041)				
3 ME	3	0,011 (0,003-0,018)	0,031 (0,012-0,061)	0,001 (0,000-0,002)			
4 PB	2	0,015 (0,009-0,024)	0,034 (0,021-0,060)	0,020 (0,013-0,030)	0,002 (0,002-0,002)		
5 SE	2	0,011 (0,001-0,020)	0,017 (0,006-0,035)	0,022 (0,001-0,044)	0,039 (0,017-0,063)	0,019 (0,019-0,019)	
6 GE	2	0,005 (0,000-0,010)	0,017 (0,010-0,025)	0,012 (0,000-0,022)	0,025 (0,022-0,029)	0,013 (0,000-0,028)	0,000 (0,000-0,000)
7 PE	2	0,017 (0,002-0,034)	0,048 (0,022-0,075)	0,015 (0,000-0,036)	0,028 (0,016-0,040)	0,035 (0,003-0,083)	0,016 (0,002-0,028)
8 PC	2	0,014 (0,003-0,023)	0,038 (0,018-0,057)	0,016 (0,011-0,025)	0,002 (0,000-0,005)	0,040 (0,013-0,074)	0,021 (0,018-0,025)
9 PI	3	0,001 (0,000-0,005)	0,017 (0,000-0,037)	0,009 (0,000-0,017)	0,013 (0,004-0,023)	0,010 (0,000-0,024)	0,004 (0,000-0,011)
10 CB	3	0,034 (0,025-0,045)	0,040 (0,016-0,055)	0,052 (0,044-0,059)	0,035 (0,023-0,049)	0,051 (0,027-0,076)	0,035 (0,034-0,037)

RAZAS	No. SUB	7	8	9	10
7 PE	2	0,015 (0,015-0,015)			
8 PC	2	0,024 (0,013-0,034)	0,000 (0,000-0,000)		
9 PI	3	0,012 (0,000-0,026)	0,014 (0,002-0,028)	0,001 (0,000-0,004)	
10 CB	3	0,059 (0,036-0,081)	0,042 (0,029-0,057)	0,032 (0,018-0,056)	0,005 (0,001-0,009)

valores de (D) oscilan entre 0,020 y 0,034 mientras que la subpoblación PE1.Catalunya toma valores comprendidos entre 0,000 y 0,021. Estos resultados se ajustan a los obtenidos mediante otros tipos de análisis.

Por otra parte, aunque la Tabla IV.26 nos da los valores de distancia medios existentes entre razas, se ha creído más oportuno calcular ésta tomando como Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) las propias razas, en lugar de tomar como OTUs las subpoblaciones, ya que al ser el número de individuos muestreados en alguna de las subpoblaciones muy pequeño, el error debido al efecto de muestreo nos puede distorsionar los verdaderos valores de distancia. Sin embargo, se ha de reseñar, que si el tamaño de las subpoblaciones hubiera sido grande, es decir, de 30 a 40 individuos por subpoblación para un total de 21 loci analizados, habría sido más correcto calcular la distancia entre razas tomando como OTUs a las subpoblaciones, ya que el efecto que puedan tener alelos raros o con bajas frecuencias en alguna de las subpoblaciones, no se ve diluido, tal como sucede al tomar un OTU de rango taxonómico superior.

Los valores de identidad y distancia genética interracial, tomando a las razas como OTUs, quedan reflejados en la Tabla IV.27. Asimismo se dan los valores de error estándar (SE) asociados a las distancias.

Los valores de distancia entre razas varían en un rango comprendido entre $D = 0,000$ para el par Gos d'Atura - Podenco Ibérico y $D = 0,051$ para el par Mastín Español - Ca de Bestiar. La raza Ca de Bestiar muestra, en general, valores de distancia muy superiores a la media de las comparaciones interraciales, lo cual será discutido posteriormente.

Los errores estándar de las distancias también muestran valores de una magnitud considerable, en la mayoría de los

**Tabla IV.27.- Valores de identidad y distancia genética
(Nei, 1978) para las razas caninas españolas**

RAZAS	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
GA	*****	0,990	0,989	0,985	0,994	0,995	0,969	0,990	0,985	1,000
MP	0,010 (0,022)	*****	0,981	0,975	0,988	0,997	0,966	0,967	0,971	0,991
ME	0,011 (0,023)	0,020 (0,030)	*****	0,981	0,986	0,983	0,950	0,989	0,983	0,989
PB	0,015 (0,027)	0,025 (0,035)	0,020 (0,030)	*****	0,975	0,968	0,969	0,978	0,999	0,987
GE	0,006 (0,017)	0,012 (0,024)	0,014 (0,026)	0,025 (0,035)	*****	0,991	0,965	0,988	0,977	0,994
SE	0,005 (0,015)	0,003 (0,012)	0,017 (0,029)	0,032 (0,040)	0,009 (0,021)	*****	0,958	0,978	0,967	0,995
CB	0,031 (0,039)	0,034 (0,041)	0,051 (0,050)	0,031 (0,039)	0,035 (0,042)	0,043 (0,046)	*****	0,951	0,962	0,968
PE	0,010 (0,022)	0,033 (0,040)	0,011 (0,023)	0,023 (0,033)	0,012 (0,024)	0,023 (0,033)	0,050 (0,049)	*****	0,980	0,992
PC	0,015 (0,027)	0,030 (0,038)	0,017 (0,029)	0,001 (0,007)	0,023 (0,033)	0,034 (0,040)	0,038 (0,043)	0,020 (0,031)	*****	0,985
PI	0,000 (0,000)	0,009 (0,021)	0,011 (0,023)	0,013 (0,025)	0,006 (0,017)	0,005 (0,015)	0,032 (0,040)	0,008 (0,020)	0,015 (0,027)	*****

Bajo la diagonal: Distancia Genética de Nei (1978)

Sobre la diagonal: Identidad Genética de Nei (1978)

Entre paréntesis, errores estándar asociados a las distancias

casos superiores al mismo valor de distancia. No obstante, hay que tener en cuenta que cuando los valores de identidad (I) son mayores de 0,9 para la mayoría de pares de poblaciones, la ecuación ($\sigma^2_D = (1-I)/I \cdot n$) puede dar una seria sobreestimación de la verdadera varianza, siendo el valor resultante el valor estimado máximo que puede darse (Nei y col. 1985). Además, si el promedio de heterocigosidad (H) para la mayoría de las poblaciones es alto (superior a 0,1), como es nuestro caso, también se produce una sobreestimación de esta varianza, que no podemos evitar, ya que las estimaciones de heterocigosidad varían muy poco a partir de 50 individuos analizados por muestra (Nei, 1978; Nei y col. 1985).

Debido a los inconvenientes que comporta, en cuanto a fiabilidad, calcular la distancia de Nei cuando nos movemos en un rango de valores inferiores a 0,1, se han estimado éstas y sus errores típicos asociados mediante el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982), obteniéndose los resultados de la Tabla IV.28.

Al aplicar este método para el cálculo de las distancias interraciales, se ha logrado una estimación un poco más precisa de las mismas y se ha evitado en parte la sobreestimación de las varianzas en que incurría el método de Nei. De este modo la distancia promedio entre razas toma un valor de $0,0259 \pm 0,0168$, ligeramente superior al obtenido con anterioridad.

Finalmente, si agrupamos las razas en sus hipotéticos troncos ancestrales y calculamos las distancias genéticas intertroncales, mediante un análisis jerárquico tomando las razas como OTUs, obtenemos los resultados que se detallan en la Tabla IV.29. Los valores de distancia entre troncos ancestrales varían en un rango comprendido entre 0,008 para el

Tabla IV.28.- Valores de distancia genética (Nei, 1972) y errores estándar asociados entre las razas caninas españolas, calculadas según el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982)

RAZAS	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
GA	*****	0,0089	0,0106	0,0097	0,0066	0,0039	0,0203	0,0103	0,0106	0,0008
MP	0,0121	*****	0,0169	0,0179	0,0131	0,0025	0,0247	0,0260	0,0210	0,0071
ME	0,0170	0,0298	*****	0,0154	0,0115	0,0136	0,0328	0,0058	0,0176	0,0091
PB	0,0192	0,0314	0,0275	*****	0,0161	0,0243	0,0272	0,0180	0,0031	0,0084
GE	0,0079	0,0171	0,0218	0,0334	*****	0,0085	0,0238	0,0085	0,0169	0,0056
SE	0,0072	0,0032	0,0270	0,0408	0,0123	*****	0,0292	0,0163	0,0245	0,0036
CB	0,0418	0,0453	0,0666	0,0387	0,0457	0,0580	*****	0,0314	0,0307	0,0231
PE	0,0157	0,0452	0,0131	0,0327	0,0166	0,0326	0,0663	*****	0,0168	0,0084
PC	0,0159	0,0364	0,0230	0,0008	0,0290	0,0412	0,0482	0,0276	*****	0,0094
PI	0,0000	0,0104	0,0145	0,0153	0,0066	0,0058	0,0411	0,0121	0,0145	*****

Bajo la diagonal: distancia genética de Nei (1978)

Sobre la diagonal: valores de error estándar (SE) asociados a las distancias

Tabla IV.29.- Valores de distancias genéticas de Nei (1978) intra e intertroncales, obtenidas mediante análisis jerárquico cuando se toman las razas como OTUs

TR.ANC.	POBL.	1	2	3	4	5
1 C.F.ME-DP	1	***** (*****-*****)				
2 C.F.INOST	2	0,011 (0,010-0,011)	0,020 (0,020-0,020)			
3 C.F.INTER	2	0,010 (0,005-0,015)	0,016 (0,003-0,025)	0,032 (0,032-0,032)		
4 C.F.LEINE	4	0,008 (0,000-0,015)	0,017 (0,009-0,033)	0,016 (0,001-0,034)	0,014 (0,006-0,023)	
5 CA DE BES	1	0,031 (0,031-0,031)	0,043 (0,034-0,051)	0,037 (0,031-0,043)	0,039 (0,032-0,050)	***** (*****-*****)

(*****) sólo una población analizada

Entre paréntesis valores máximos y mínimos

par C.F.Metris-optimae - C.F.Leineri y 0,043 para el par C.F.Inostranzewi - Ca de Bestiar.

IV.5.2.1.- VALORES DE DIVERGENCIA GENETICA A DISTINTOS NIVELES DE DIFERENCIACION TAXONOMICA

El presente trabajo se ha realizado con poblaciones que pertenecen a la misma Especie, el Canis familiaris. Por lo que, tomando como rango taxonómico claramente establecido la RAZA, se ha convenido, a efectos prácticos, un rango taxonómico superior, al cual definimos como TRONCO ANCESTRAL, que en un principio lo podríamos equiparar al rango taxonómico de Subespecie, punto éste que será discutido posteriormente.

Si hubiéramos realizado un análisis jerárquico completo, partiendo de las Subpoblaciones como Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), se hubiera podido definir un rango inferior a Raza al que hubiéramos denominado SUBPOBLACION, pero por las razones anteriormente expuestas, debido principalmente al pequeño tamaño de muestra de alguna de las subpoblaciones, ésto no ha sido posible.

Sin embargo, se ha creido oportuno realizar una comparación de las distancias promedio a los tres niveles, teniendo presente que en el nivel Subpoblación se han tomado como OTUs a las subpoblaciones y en los niveles Razas y Troncos Ancestrales los OTUs corresponden a las diferentes razas. Las distancias promedio obtenidas son las siguientes:

TRONCOS ANCESTRALES:	0,0228 ± 0,0133
RAZAS:	0,0197 ± 0,0128
SUBPOBLACIONES:	0,0206 ± 0,0149

A pesar del posible error cometido al no haber realizado un análisis jerárquico completo, podemos observar que los

valores de distancia no varían significativamente para los tres niveles hipotéticos de diferenciación taxonómica.

IV.6.- RELACIONES FILOGENETICAS

A partir de los datos morfológicos, tratados cualitativa y cuantitativamente, y de las matrices de distancia genética obtenidas a partir de las frecuencias génicas de los polimorfismos bioquímicos estudiados, se han inferido las posibles relaciones filogenéticas existentes entre las razas caninas españolas. Estas relaciones entre razas difieren, como veremos, según el tipo de datos utilizados.

IV.6.1.- CARACTERES MORFOLOGICOS

Los datos morfológicos se han analizado tanto cualitativa como cuantitativamente mediante una serie de programas que pertenecen al paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1986). Todos los árboles generados son "no rotados", por lo que para facilitar la comprensión y poder realizar una comparación de los mismos se ha tomado, arbitrariamente, la población de Galgo Español como punto de referencia para todas las demás razas. No obstante, el análisis cuantitativo de esos datos utilizando el programa KITSCH, que genera árboles "rotados", nos permite comparar filogenias obtenidas a partir de datos morfológicos con las obtenidas a partir de datos electroforéticos.

IV.6.1.1.- ANALISIS CUALITATIVO

Se ha utilizado el programa MIX para construir el dendrograma de las razas caninas españolas a partir de datos cualitativos de los caracteres morfológicos. Estos son

introducidos en codificación binaria (0,1) a partir de la matriz de semejanzas morfológicas (Tabla III.3).

Dos son los dendrogramas resultantes, obtenidos al aplicar el Método de Wagner (Farris, 1970) y el de Camin y Sokal (1965). La topología de los árboles con uno u otro método no varía según el orden de entrada en el programa de los diferentes OTUs.

El dendrograma obtenido mediante la aplicación del método de Wagner se presenta en la Figura IV.8, y el obtenido mediante el método de Camin y Sokal -que presupone el conocimiento del estado ancestral del carácter- aparece en la Figura IV.9.

Tanto en uno como en otro se reflejan en un principio dos grandes grupos, uno formado por las razas Mastín del Pirineo, Mastín Español, Sabueso Español y Perdiguero de Burgos y el otro integrado por Podenco Ibicenco, Podenco Canario, Podenco Ibérico y Galgo Español. En el dendrograma obtenido por el método de Wagner, las razas Ca de Bestiar y Gos d'Atura ocupan posiciones intermedias entre los dos grandes grupos, aunque el Gos d'Atura está más próximo al grupo de los lebreles y el Ca de Bestiar al otro grupo.

Esta aproximación de Gos d'Atura y de Ca de Bestiar a uno u otro grupo, se hace más patente cuando se aplica el método de Camin y Sokal, que los incluye claramente en sus grupos respectivos. Gos d'Atura se coloca en una posición intermedia entre los subgrupos formados por Podenco Ibicenco - Podenco Canario y el subgrupo Podenco Ibérico - Galgo Español. De forma semejante, Ca de Bestiar se relaciona más estrechamente con los Mastines que con el subgrupo formado por Sabueso Español y Perdiguero de Burgos. Las dos topologías son posibles, aunque el árbol resultante de aplicar el método de Wagner sólo ha necesitado 96 pasos para reordenar

Figura IV.8.- Dendrograma obtenido mediante la aplicación del método de Wagner a partir del análisis cualitativo de los datos morfológicos.

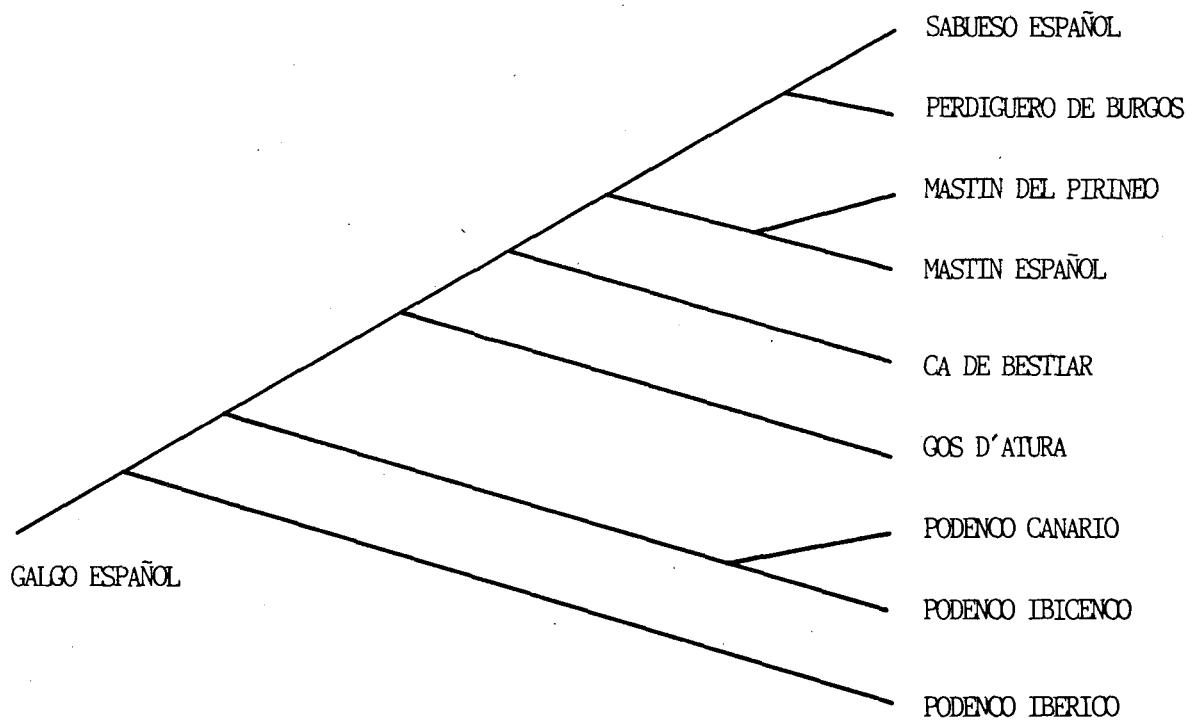
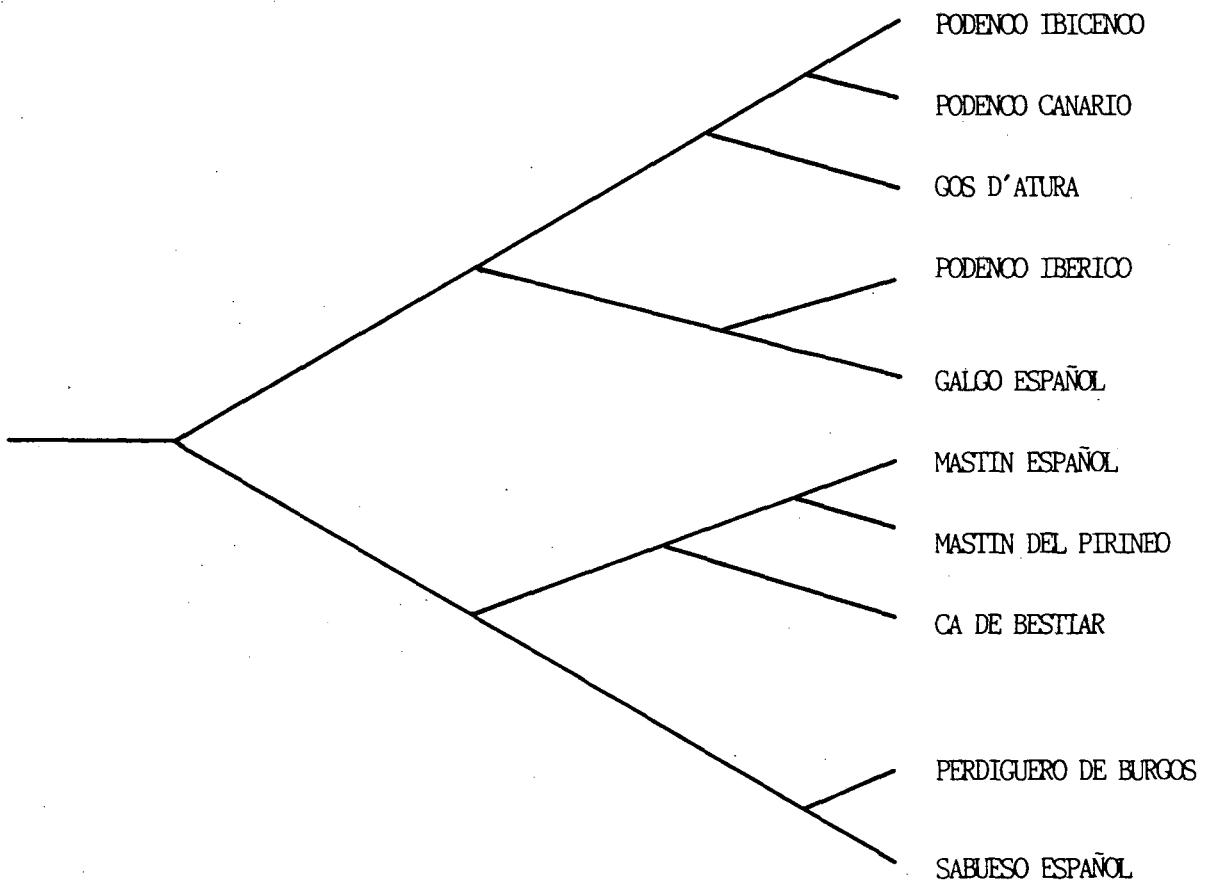


Figura IV.9.- Dendrograma obtenido mediante la aplicación del método de Camin y Sokal a partir del análisis cualitativo de los datos morfológicos.



los caracteres y lograr el árbol de máxima parsimonia, mientras que el árbol generado mediante el método de Camin y Sokal ha necesitado 101.

IV.6.1.2.- ANALISIS CUANTITATIVO

Se han utilizado los programas FITCH y KITSCH para la construcción de los dendrogramas a partir del análisis cuantitativo de los datos morfológicos. Estos han sido introducidos, como ya se ha comentado extensamente, en forma de una matriz de distancias, siendo el objetivo de los métodos encontrar el árbol que haga mínima la suma de cuadrados.

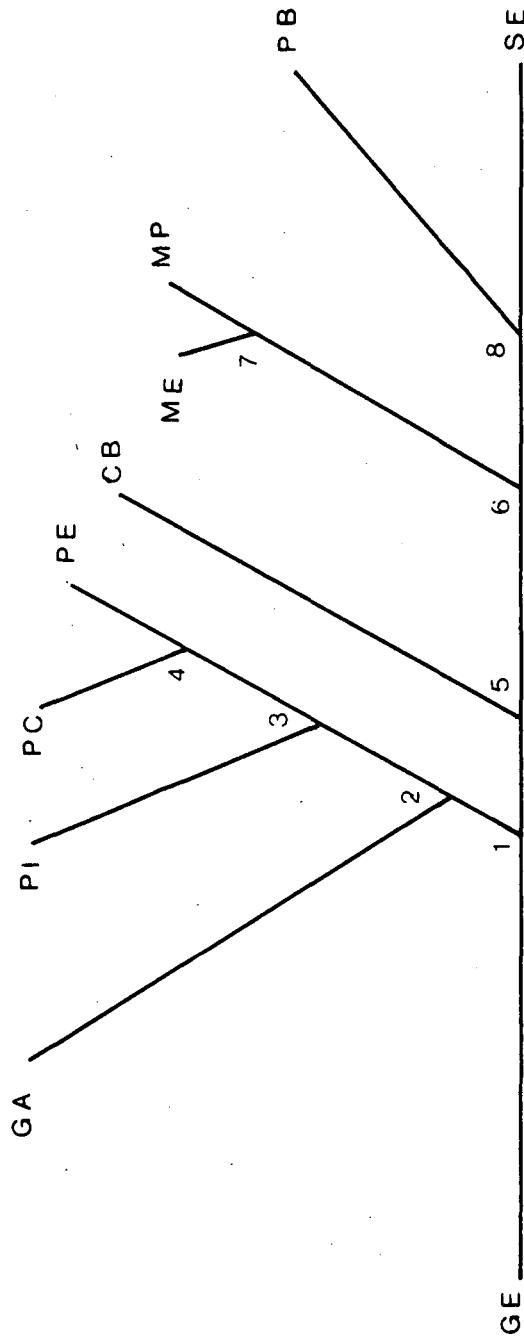
Los árboles obtenidos mediante el programa FITCH son "no rotados", por lo que se ha tomado a Galgo Español como punto de referencia. Los obtenidos mediante el programa KITSCH son "rotados", habiéndose utilizado el método del "midpoint rooting" o criterio del punto central para darle una dirección evolutiva.

También nos hemos servido del programa SHUFFLE del mismo paquete informático, para reordenar las matrices en el orden deseado. En ninguno de los métodos se han observado diferencias significativas, según cual fuera el orden de entrada de los OTUs, en los valores de suma de cuadrados, desviación estándar y longitud de las ramas, así como tampoco en la topología de los árboles.

El programa FITCH utiliza dos métodos ligeramente distintos para encontrar el árbol de máxima parsimonia. El Método de Fitch y Margoliash (F-M) (1967) y el Método de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) o Método de los mínimos cuadrados.

Las topologías resultantes son idénticas, por lo que en la Figura IV.10 sólo se ha representado un dendrograma,

Figura IV.10.- Dendrograma obtenido del análisis cuantitativo de los datos morfológicos, aplicando los métodos de Fitch y Margoliash (1967) y de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) o de los mínimos cuadrados.



Nota: Sólo se ha representado un dendrograma, ya que los dos resultantes son topológicamente idénticos variando mínimamente la longitud de las ramas, tal como indican los resultados de la Tabla IV.30 del Apéndice.

variando mínimamente la longitud de las ramas, tal como indican los valores de distancia de la Tabla IV.30 del Apéndice. Se forman los dos grandes grupos antes descritos, incluyendo a la raza Gos d'Atura en el cluster de los lebreles y quedando Ca de Bestiar en una posición intermedia entre los dos, aunque ligeramente inclinada hacia el grupo de los lebreles, tal como indican los valores de distancia. Tan sólo varía, aunque mínimamente, la longitud de las ramas y esto hace variar algo las relaciones existentes entre las diferentes razas cuando tomamos como punto de referencia al Galgo Español.

Mediante el método de (F-M) el programa ha examinado 200 posibles árboles, resultando el que muestra la Figura IV.10, el que mejor se ajusta a la matriz de datos introducidos, tomando un valor de 0,708 la suma de cuadrados y siendo del 8,97% el porcentaje de desviación estándar. Mediante el segundo método, el programa examinó un total de 222 posibles árboles siendo la suma de cuadrados igual a 0,274. Aunque este valor es inferior al obtenido mediante el primer método, no debemos olvidar que el método de (CS-E) está precisamente diseñado para minimizar este valor.

Las relaciones existentes, respecto a Galgo Español, quedarían de la siguiente forma según un método u otro:

F-M: GE → PE → PI → GA → PC → CB → ME → MP → SE → PB

CS-E: GE → PE → PC → CB → PI → GA → MP → ME → SE → PB

Aunque las diferencias son mínimas y tanto podría ser un orden como el otro, lo que parece estar claro es la división en dos grandes grupos. Uno formado por las razas Podenco Ibicenco, Podenco Ibérico, Podenco Canario, Gos d'Atura y Ca de Bestiar, siendo el rango de distancias, medidas como longitud de las ramas, respecto a Galgo Español de (0,51076 - 0,53112) según el método de (F-M) y de

(0,52454 - 0,53644) según el método de (CS-E). El otro lo integrarían las razas Mastín de los Pirineos, Mastín Español, Sabueso Español y Perdiguero de Burgos, oscilando las distancias entre (0,61716 - 0,65481) según (F-M) y entre (0,62529 - 0,64483) según (CS-E).

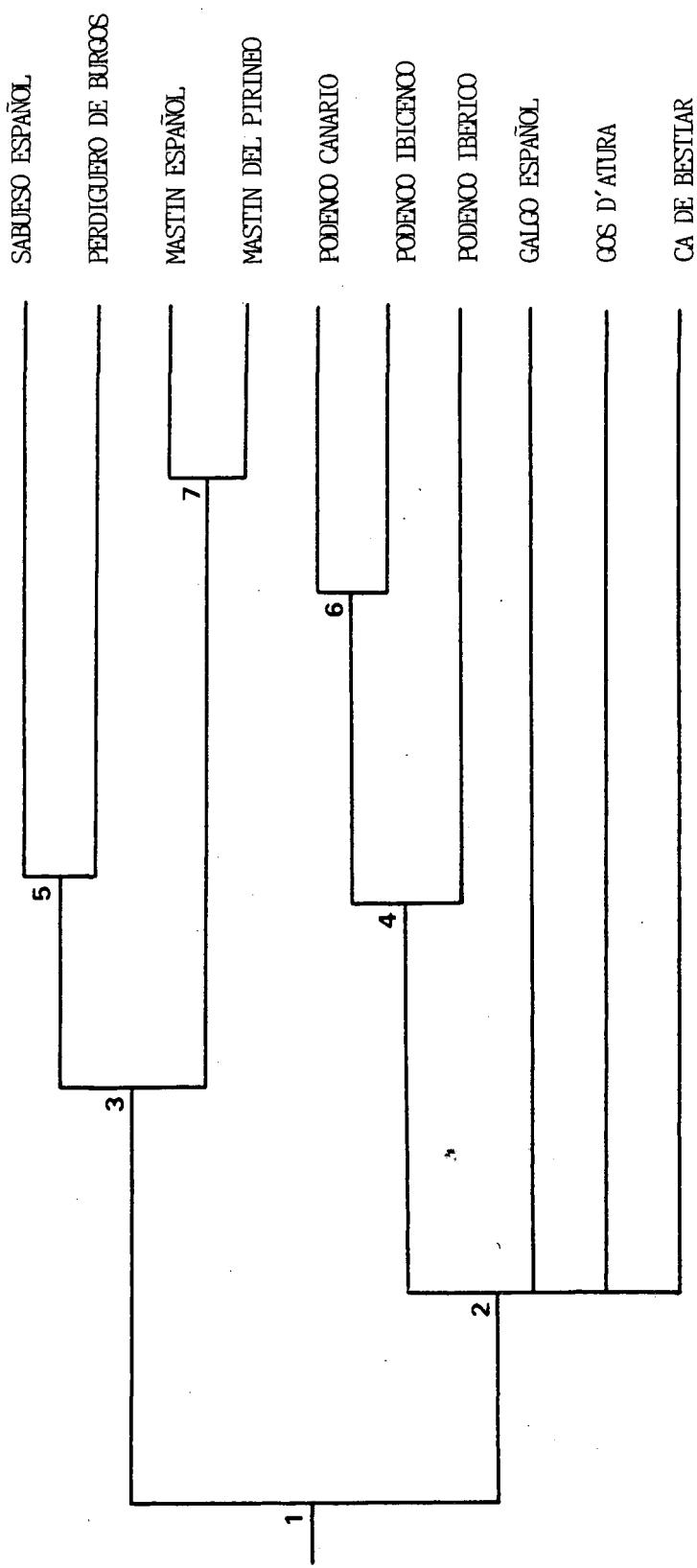
Cuando aplicamos el programa KITSCH y utilizamos los métodos de (F-M) y de los Mínimos cuadrados, los árboles resultantes pueden ser considerados como una estimación de la filogenia (Felsenstein, 1986), ya que como hemos dicho, asume que todos los OTUs son contemporáneos y que existe un reloj evolutivo.

Los dendrogramas resultantes son topológicamente idénticos, variando mínimamente las longitudes de las ramas, por lo que en la Figura IV.11 sólo se ha representado un dendrograma y siendo los valores de suma de cuadrados 1,011 y 0,351 para cada uno de los métodos, respectivamente. El porcentaje de desviación estándar para el método de (F-M) es del 10,72%. Las distancias "output" o distancias de rama entre los nodos y entre éstos y las razas se muestran en la Tabla IV.31 del Apéndice.

Se observa que de nuevo aparecen los dos grandes clusters, quedando Gos d'Atura y Ca de Bestiar incluidos en el grupo de los lebreles, aunque se nos presenta una tricotomía, no resuelta, entre las razas Galgo Español, Gos d'Atura y Ca de Bestiar.

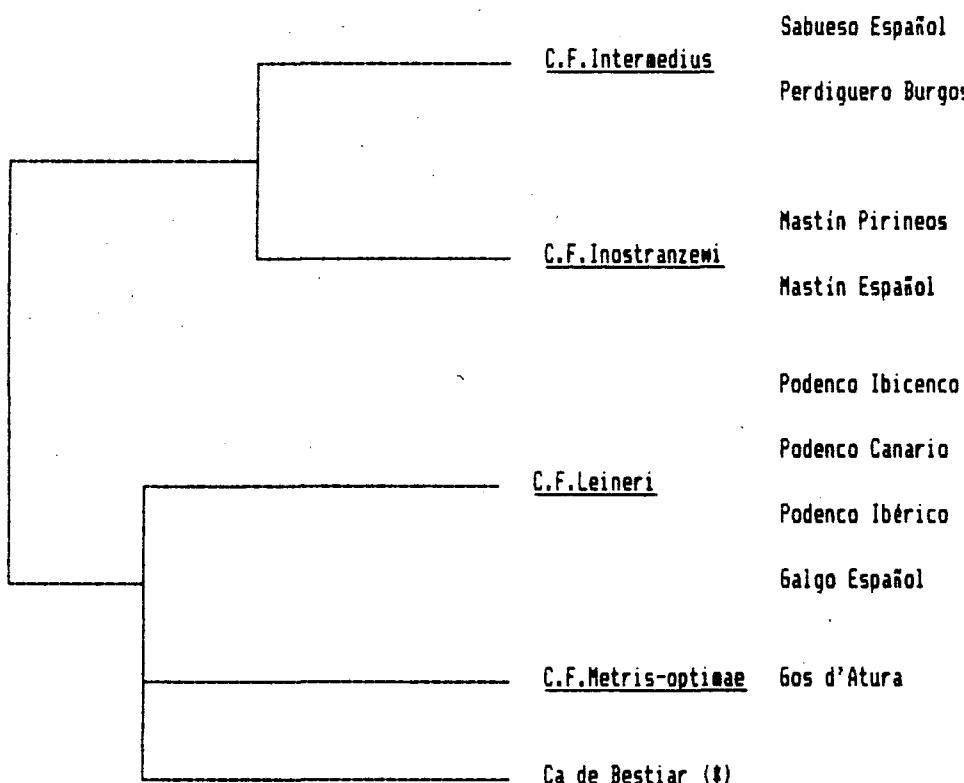
Repasando todas las topologías morfológicas obtenidas, se ha configurado un árbol consensuado que muestra un claro paralelismo con los hipotéticos troncos ancestrales (Figura IV.12). Las razas integrantes de los diferentes troncos, están en buena consonancia con su localización en los diversos dendrogramas obtenidos a partir del análisis cualitativo y cuantitativo de los datos morfológicos. Si nos fijamos en

Figura IV.11.- Dendrograma obtenido mediante el programa KITSCH a partir del análisis cuantitativo de los datos morfológicos, aplicando los métodos de Fitch y Margoliash (1967) y de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), asumiendo contemporaneidad de los OTUs.



Nota: Sólo se ha representado un dendrograma, ya que los dos resultantes son topológicamente idénticos variando mínimamente la longitud de las ramas, tal como indican los resultados de la Tabla IV.31 del Apéndice.

Figura IV.12.- Topología del árbol consensuado, a partir de datos morfológicos, a nivel de troncos ancestrales



(†) La raza Ca de Bestiar, debido a su peculiar formación, no ha sido asignada a ningún tronco ancestral concreto

el árbol de la Figura IV.11, podemos observar que el cluster formado por las razas Mastín del Pirineo y Mastín Español se correspondería con el tronco ancestral del C.F.Inostranzewi, el cluster que forman Sabueso Español y Perdiguero de Burgos con el C.F.Intermedius, estando ambos grupos relacionados y formando a su vez un nuevo cluster. Por otra parte, se observa una estrecha relación entre las tres razas de podencos que forman el tronco del C.F.Leineri. Galgo Español queda algo descolgado de este grupo, aunque si nos basamos en los árboles obtenidos mediante el análisis cualitativo -programa MIX- y cuantitativo -programa FITCH-, lo integraríamos, así mismo, en el tronco del C.F.Leineri. Gos d'Atura sería el único representante del C.F.Metris - optimae, y finalmente, quedaría aislada la raza Ca de Bestiar, que debido a su peculiar formación no ha sido asignada a ningún tronco ancestral concreto. Estos últimos formarían un nuevo cluster diferenciado del primero.

Dado que, según Felsenstein (1986), los árboles resultantes pueden ser considerados como una estimación de la filogenia, se puede aventurar que las razas Sabueso Español, Perdiguero de Burgos, Mastín de los Pirineos y Mastín Español están relacionadas y descienden de un hipotético antecesor común. Por el otro lado, Gos d'Atura (C.F.Metris - optimae) y Ca de Bestiar están más relacionados con los integrantes del C.F.Leineri habiendo tenido a su vez un antecesor común.

IV.6.2.- POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS

Como hemos comentado, el valor sistemático de los resultados electroforéticos permite su utilización para inferir las relaciones de divergencia genética existentes entre las distintas razas estudiadas. Para ello se han utilizado tres metodologías cuantitativas -método de Fitch y Margoliash, análisis de cluster y método de Wagner- a partir

de las distancias genéticas existentes entre las poblaciones analizadas.

IV.6.2.1.- METODO DE FITCH Y MARGOLIASH PARA VALORES F(ST)

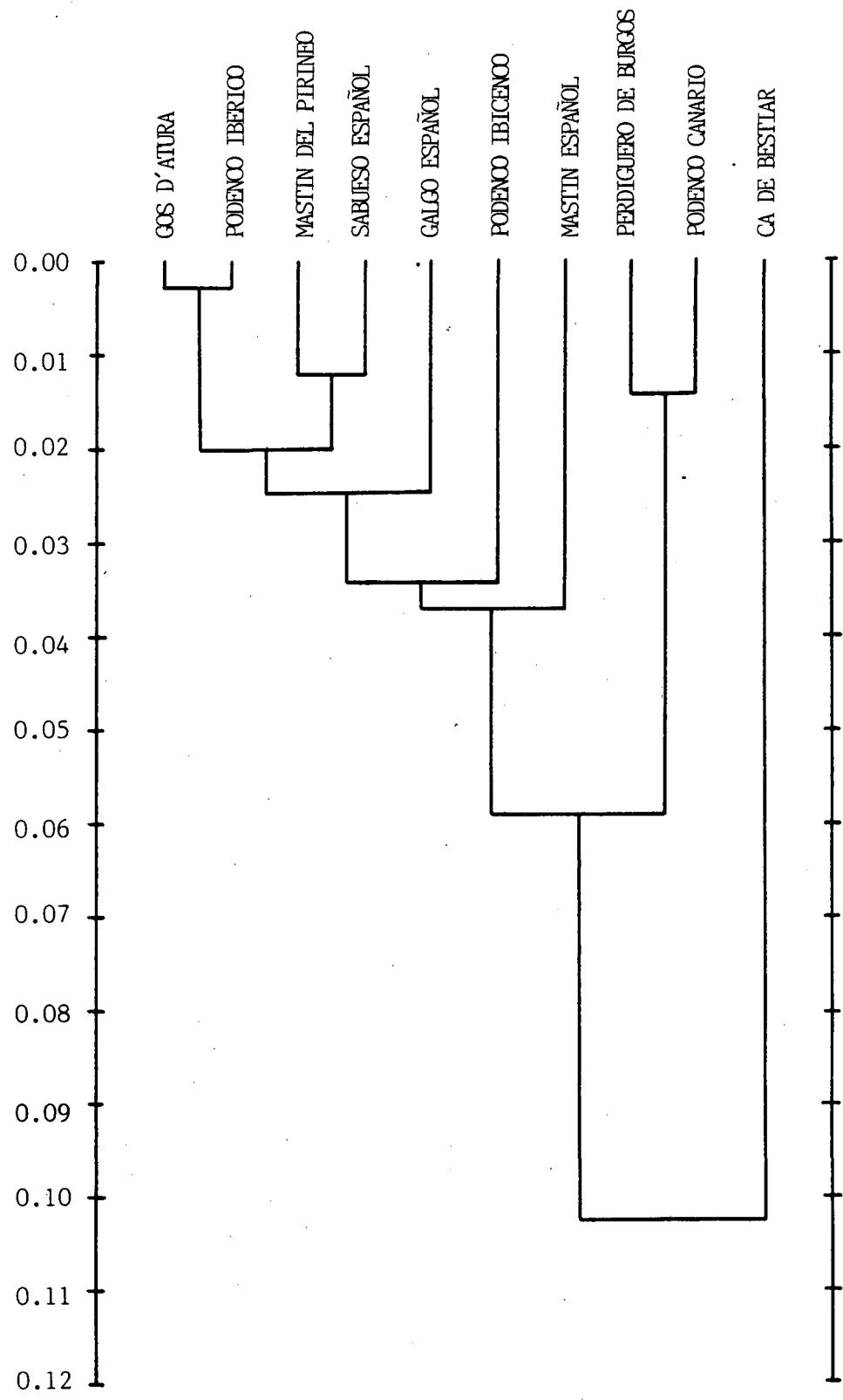
Se ha creido conveniente realizar este tipo de análisis ya que nos proporciona otra herramienta útil de comparación de los diversos dendrogramas obtenidos, pues los valores de distancia genética entre razas a partir de valores F(ST) reflejados en la Tabla IV.18, se han obtenido a partir de las heterocigosidades observadas y esperadas de las diferentes razas, en contraposición a todos los demás índices de distancia que utilizan como punto de partida las frecuencias génicas.

A estas distancias F(ST) se les ha aplicado el método de (F-M) utilizando el programa KITSCH del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1986). Además, como veremos en el siguiente apartado, referente al análisis de cluster, también se les ha aplicado el algoritmo UPGMA, teniendo así un punto de comparación de dos índices de distancia claramente distintos tratados con un mismo algoritmo.

El dendrograma resultante se muestra en la Figura IV.13, apreciándose una estrecha relación entre los pares Gos d'Atura - Podenco Ibérico, Mastín de los Pirineos - Sabueso Español y Perdiguero de Burgos - Podenco Canario. Ca de Bestiar aparece desligado del resto de las razas. Según la interpretación del dendrograma sería la población que primero se habría separado del hipotético antecesor común de los cánidos españoles.

El algoritmo ha revisado 176 posibles ordenaciones, encontrando que la mejor es la que muestra la figura, con

Figura IV.13.- Dendrograma obtenido mediante el programa KITSCH, aplicando el método de Fitch y Margoliash (1967) a los valores de distancia $F(ST)$.



unos valores de suma de cuadrados igual a 4,394 y un 22,34% de desviación estándar.

IV.6.2.2.- ANALISIS DE CLUSTER

Se ha aplicado el algoritmo UPGMA a las matrices de distancias de los valores F(ST) y a los índices de distancia genética de Nei (1978) y Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

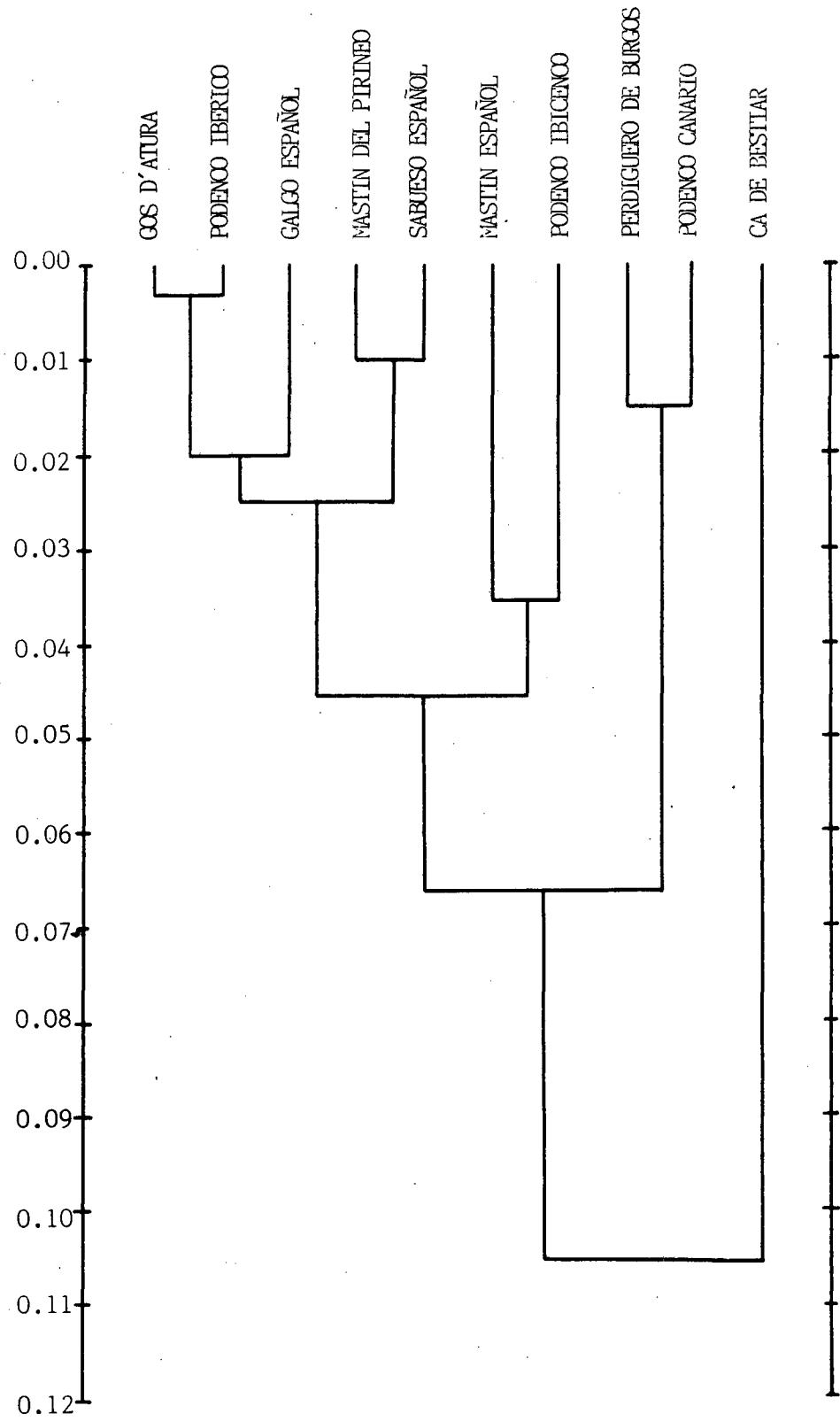
A partir de los valores F(ST) de la Tabla IV.19, se ha confeccionado el fenograma de la Figura IV.14, mediante la aplicación del algoritmo UPGMA. Se observa de nuevo la formación de dos grandes clusters. Por una parte, el formado por Perdiguero de Burgos y Podenco Canario y por otra, todas las demás razas, a excepción, al igual que en el método de (F-M), de la raza Ca de Bestiar que se separa muy pronto del hipotético tronco común.

Asimismo, dentro del primer grupo, Mastín Español y Podenco Ibicenco estarían más relacionados, diferenciándose perfectamente de los otros integrantes del cluster, formando éstos por su parte uno nuevo. Dentro de éste último se diferenciarían a su vez dos nuevos grupos, por una parte Mastín del Pirineo y Sabueso Español y el otro lo formarían Gos d'Atura, Podenco Ibérico y Galgo Español, estando los dos primeros más relacionados entre sí que con Galgo Español.

Como veremos seguidamente, este fenograma es idéntico en cuanto a topología y longitudes relativas de las ramas al obtenido aplicando el índice de distancia de Nei (1978).

En cuanto a los índices de distancia basados en los valores de las frecuencias génicas, se ha observado que la topología de los árboles obtenidos utilizando diversos índices -Rogers, distancia de arco de Cavalli-Sforza y Edwards, Prevosti, Edwards-, no mostraba diferencias significativas,

Figura IV.14.- Fenograma obtenido mediante el método UPGMA usando los valores de distancia F(ST).



por lo que sólo se presentan los fenogramas obtenidos con la distancia de Nei (1978) y con la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). La distancia de Nei es la que da la mejor estimación de la longitud de las ramas, es útil para obtener estimaciones aproximadas de los tiempos de divergencia, se pueden calcular las desviaciones estándar de los puntos de bifurcación de las ramas y es la más frecuentemente usada en este tipo de estudios, lo cual nos puede servir para realizar comparaciones (Nei y col. 1983; Hedges, 1986). Por su parte, la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards es la que da los mejores valores para los estadísticos de bondad de ajuste y, además, según Nei y col. (1983), es la que produce el diseño más preciso de las ramas.

Los fenogramas resultantes de ambas distancias se muestran en las Figuras IV.15 y IV.16. Las topologías son parecidas, variando la posición de Galgo Español pero manteniéndose en los dos fenogramas dentro del cluster formado por las razas Gos d'Atura, Podenco Ibérico, Mastín de los Pirineos y Sabueso Español. Las poblaciones de Mastín Español y Podenco Ibicenco se relacionan más intimamente cuando la distancia utilizada es la de Nei. Perdiguero de Burgos y Podenco Canario forman su propio cluster mientras que Ca de Bestiar continúa descolgado del resto de las razas.

Cuando el índice de distancia utilizado era el de Nei (1978), los estadísticos de bondad de ajuste del árbol elaborado mostraron unos valores de 0,88 para la correlación cofenética, 0,20 para la F de Farris (1972), 23,06 para la F de Prager y Wilson (1976) y un 34,61% de desviación estándar. Cuando se utilizó la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) los estadísticos de ajuste tomaron los siguientes valores: 0,91 para la correlación cofenética, 0,39 para la F de Farris (1972), 7,81 para la F de Prager y Wilson (1976) y un 9,94% de desviación estándar.

Figura IV.15.- Fenograma obtenido mediante el método UPGMA usando la distancia de Nei (1978)

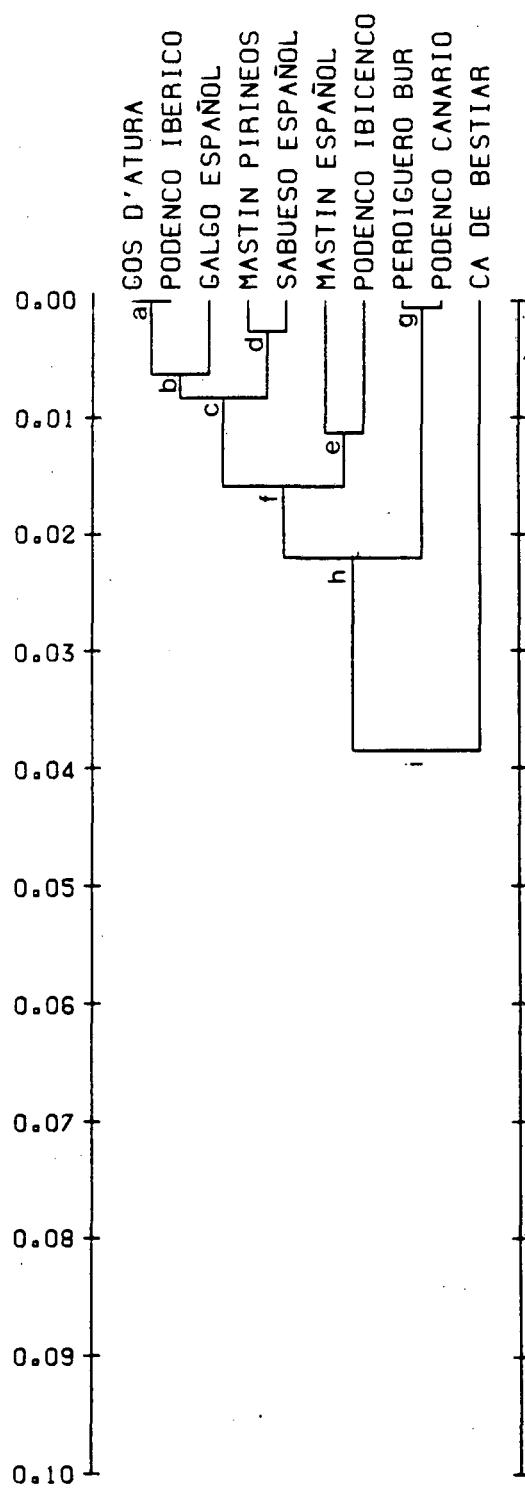
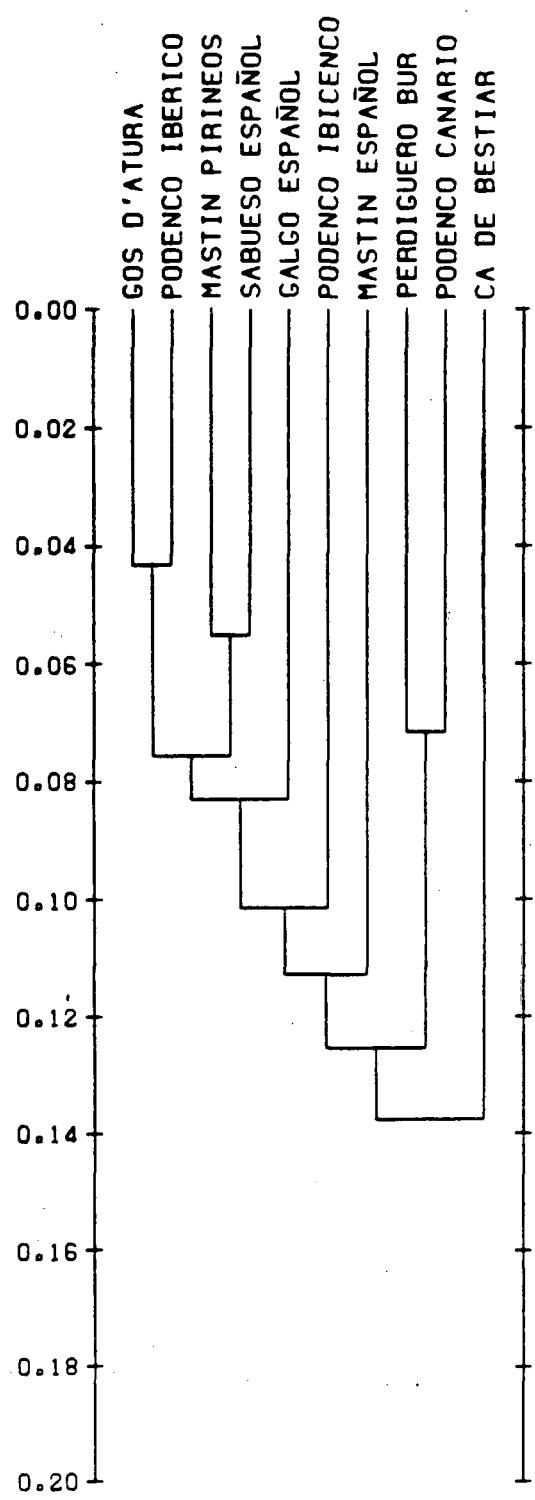


Figura IV.16.- Fenograma obtenido mediante el método UPGMA usando la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967)



Asimismo, se confeccionó un fenograma utilizando los valores de distancia de Nei obtenidos mediante el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982), siendo la topología del árbol y las longitudes relativas de sus ramas idénticos al obtenido mediante el método de Nei, tal como se refleja en la Figura IV.17.

La Figura IV.18 nos muestra el fenograma obtenido al realizar el análisis de cluster utilizando el algoritmo UPGMA para el conjunto de las 24 subpoblaciones. Sólo presentamos el fenograma resultante obtenido mediante la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), ya que es el que da unos valores para los estadísticos de bondad de ajuste más óptimos, siendo 0,81 la correlación cofenética, 4,42 el valor de la F de Farris, 11,93 la F de Prager y Wilson y el porcentaje de desviación estándar toma un valor del 15,41%; estos valores podemos considerarlos aceptables dado el alto número de poblaciones utilizadas en el estudio. El fenograma resultante al aplicar el índice de Nei (1978) no difiere sustancialmente del presentado en la Figura IV.18.

La topología de este fenograma se corresponde estrechamente con el diagrama obtenido mediante el análisis factorial de componentes principales, de la Figura IV.5, que nos mostraba las relaciones existentes entre subpoblaciones. También muestra correspondencia con el fenograma obtenido con anterioridad al utilizar las razas como OTUs (Figura IV.16), dandonos una buena medida de la estabilidad de las clasificaciones.

Tan sólo tres subpoblaciones (SE2. Asturias, MP2. Benabarre y PE2. Baleares), se apartan claramente de esa disposición, resultado lógico a tenor de los valores observados de distancia tanto intrarracial como intersubpoblacional. Como consecuencia de ello se produce un ligero cambio en la posición relativa de Podenco Ibicenco, pues deja de estar

Figura IV.17.- Fenograma generado mediante el método UPGMA utilizando los valores de distancia de Nei (1972), obtenidos mediante el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982).

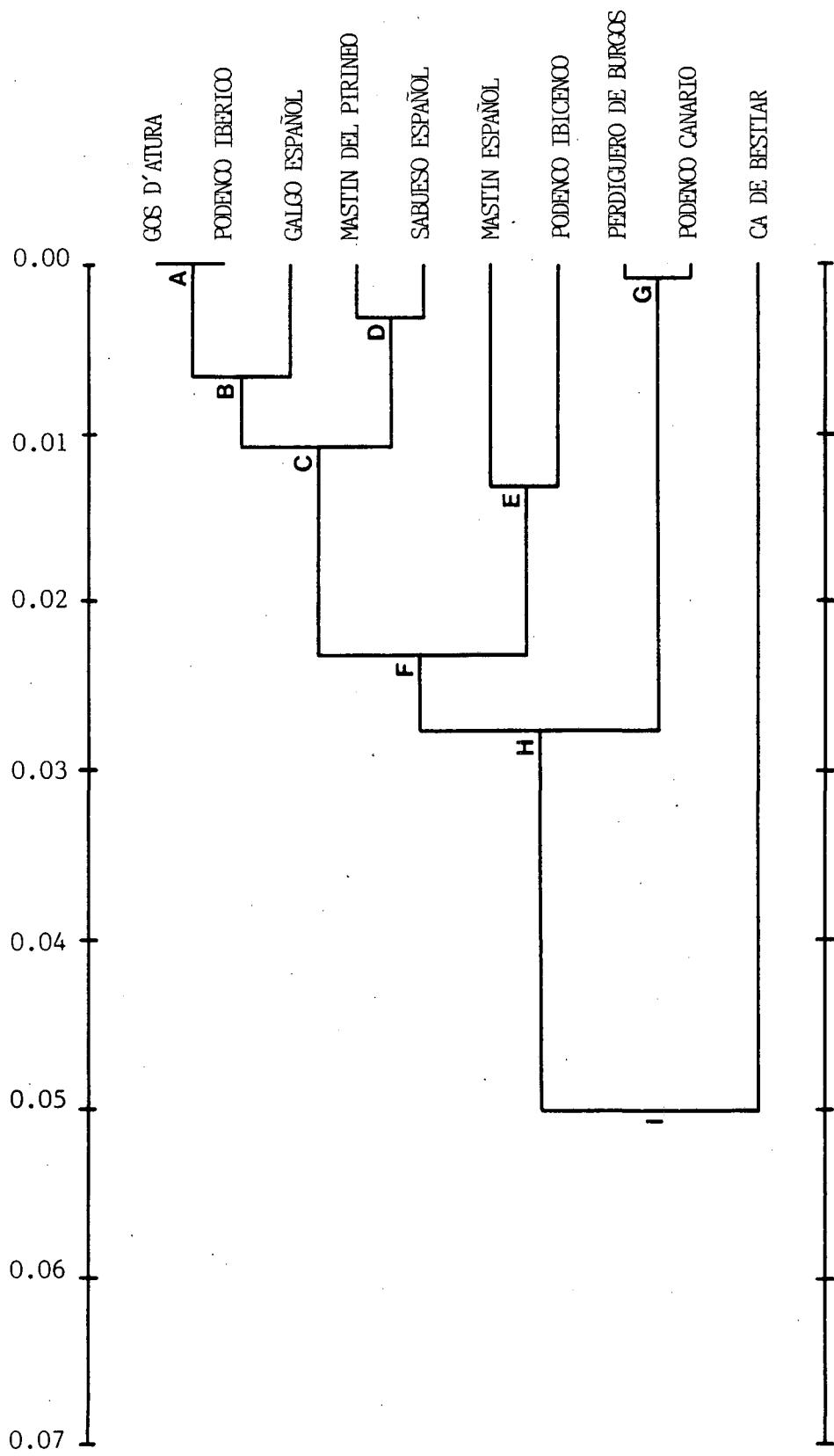
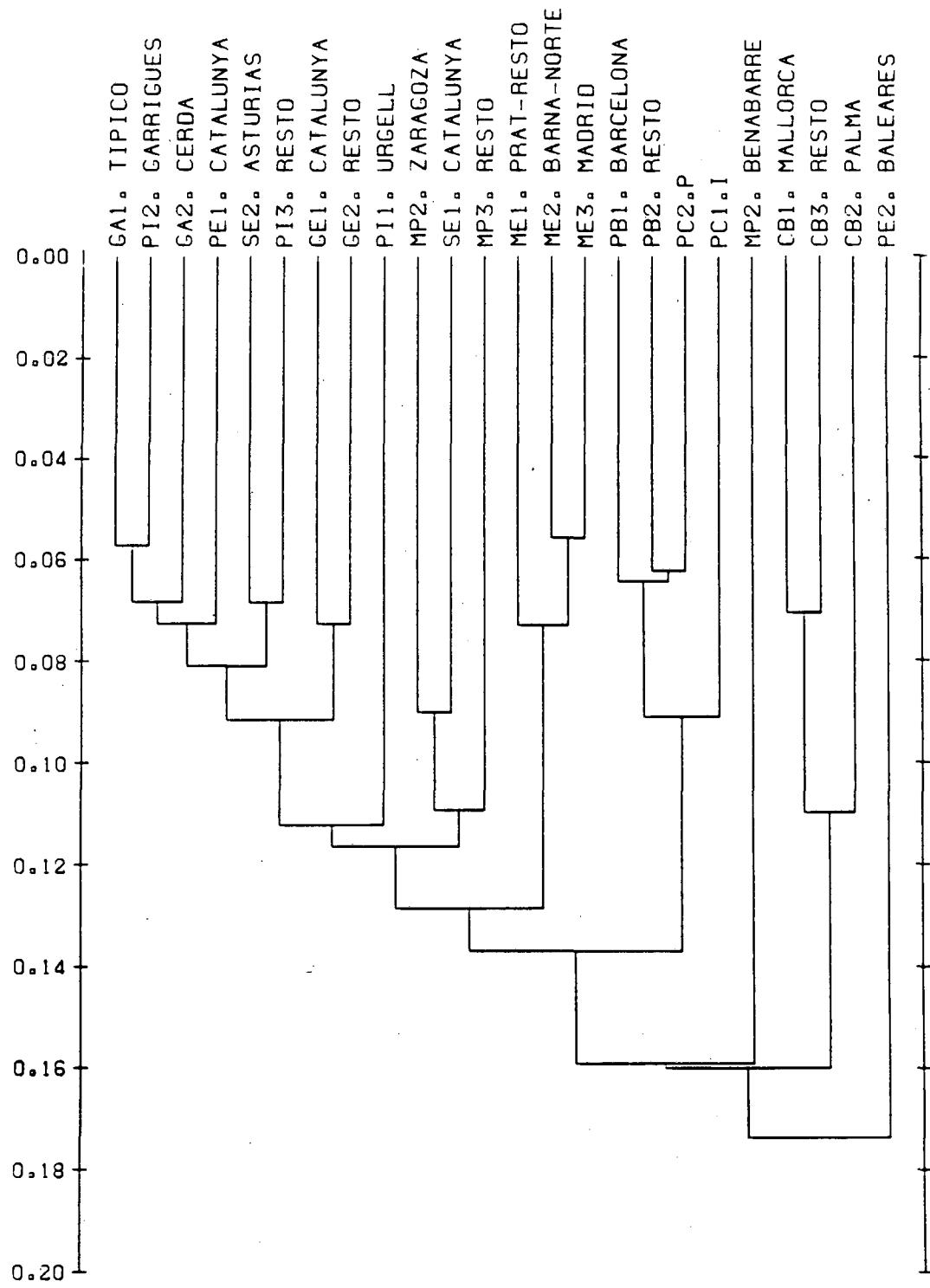


Figura IV.18.- Fenograma obtenido mediante el método UPGMA usando la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), para el conjunto de las 24 subpoblaciones en que se han dividido las razas caninas españolas



estrechamente relacionado con Mastín Español, para pasar la subpoblación PE1.Catalunya a relacionarse de manera más próxima con el grupo de lebreles -excepción hecha de Podenco Canario- y con la raza Gos d'Atura.

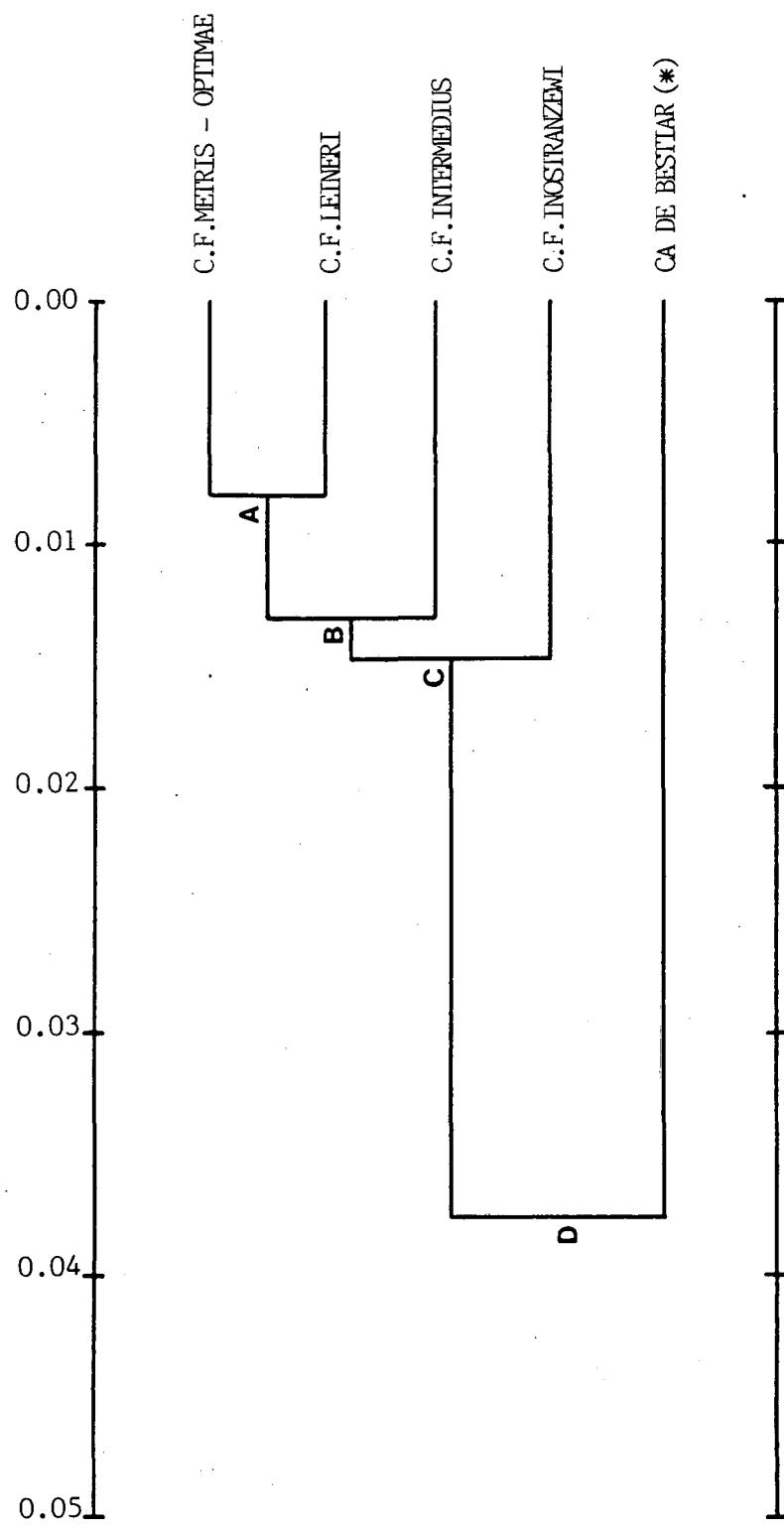
Cuando realizamos el análisis de cluster a nivel de troncos ancestrales, tomando como distancias entre troncos las resultantes de un análisis jerárquico, utilizando como Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) las diferentes razas, tal como refleja la Tabla IV.29, se obtiene el fenograma representado en la Figura IV.19. Se aprecia un cluster bien definido, el formado por C.F.Metris-optimae y C.F.Leineri, al que posteriormente se unen C.F.Intermedius y C.F.Inostranzewi formando a su vez un nuevo cluster, quedando la raza Ca de Bestiar claramente descolgada del mismo. Las relaciones existentes entre cualesquiera integrantes del cluster son más estrechas que las existentes con Ca de Bestiar, tal como lo demuestran los valores de distancia observados -matriz de distancias- y los esperados -longitudes de las ramas del árbol-.

También se confecció un fenograma tomando como OTUs los propios troncos ancestrales, a partir de las distancias de Nei intertroncales calculadas según el método Jackknife (Mueller y Ayala, 1982). La topología del árbol y las longitudes relativas de sus ramas son idénticas al fenograma construido anteriormente, razón por la cual no se ha representado.

IV.6.2.2.1.- Valores de Error Estándar en los puntos de bifurcación

Como ya se ha comentado (apartado III.4.2.1), una manera de evaluar la fiabilidad de los fenogramas construidos mediante el índice de Nei, es computar los errores estándar (SE) de cada punto de bifurcación de las ramas del árbol.

Figura IV.19.- Fenograma generado mediante el método UPGMA utilizando los valores de distancia de Nei (1978), obtenidos a partir del análisis jerárquico cuando se toman a las razas como OTUs.



(*) La raza Ca de Bestiar, debido a su peculiar formación no se la ha asignado a ningún tronco ancestral concreto

Esta evaluación es importante ya que cada punto de ramificación sugiere un suceso importante de división de la población (Nei y col., 1985).

A los árboles UPGMA de las Figuras IV.15 y IV.17, construidos utilizando la distancia hallada según el método de Nei y el método Jackknife respectivamente, se les ha calculado el (SE) para los valores de distancia de los puntos de bifurcación en el caso del método de Nei, y el (SE) de la diferencia (U) entre la distancia entregrupos (D_B) y la distancia intragrupos (D_W) en el caso del método Jackknife, obteniéndose los resultados que muestra la Tabla IV.32.

Los valores (SE) -método de Nei- de todos los puntos de bifurcación son considerablemente mayores que las longitudes de rama obtenidas a partir de datos electroforéticos. Los valores (U) -método Jackknife- no son significativamente mayores que cero, por lo que los grupos o clusters comparados en cada punto de bifurcación no son genéticamente más diferentes que los propios integrantes del mismo grupo. A modo de ejemplo podríamos decir que la bifurcación I (ver Figura IV.17) se podría encontrar en cualquier punto de un rango de distancia comprendido entre -0,009328 y 0,069877 ya que $U = D_B - D_W = 0,0302$, siendo el error estándar, SE(U), asociado a esta diferencia de 0,0202 y en un intervalo de confianza del 95% (U) puede tomar valores comprendidos entre -0,009328 y 0,069877 por lo que los dos grupos no son significativamente diferentes.

A nivel de troncos ancestrales los (SE) -método de Nei- de los puntos de bifurcación son también mayores que las propias longitudes de rama de los clusters en comparación (ver Figura IV.19), siendo los valores (SE) para cada uno de los puntos A = 0,0095; B = 0,0126; C = 0,0134 y D = 0,0215 por lo que no se han representado en el fenograma.

Tabla IV.32.- Valores de error estándar -método de Nei- de los puntos de bifurcación del fenograma representado en la Figura IV.15. Asimismo se expresan los valores obtenidos, según el método Jackknife, de la distancia genética promedio entre grupos (D_g), distancia genética promedio intra grupos (D_w), distancia hipotética del punto de bifurcación de los dos clusters en comparación (U) y error estándar asociado (SE) al valor (U), del fenograma representado en la Figura IV.17.

BIFURCACION	METODO DE NEI		METODO JACKKNIFE		
	(SE)	(D_w)	(D_g)	(U)	(SE)
A	0,0000	-	-	-	-
B	0,0085	0,0000	0,0072	0,0072	0,0051
C	0,0099	0,0044	0,0108	0,0064	0,0042
D	0,0060	-	-	-	-
E	0,0115	-	-	-	-
F	0,0138	0,0087	0,0232	0,0145	0,0077
G	0,0035	-	-	-	-
H	0,0162	0,0149	0,0277	0,0127	0,0095
I	0,0217	0,0199	0,0502	0,0302	0,0202

Utilizando el método de Jackknife tampoco se han hallado diferencias significativas entre clusters.

IV.6.2.3.- METODO DE WAGNER

Se ha utilizado la distancia de cuerda de Cavalli - Sforza y Edwards (1967) para obtener los cladogramas resultantes de aplicar el método de Wagner (Farris, 1972) a los resultados electroforéticos. El método requiere que la distancia utilizada sea métrica, por lo que no pudo aplicarse el índice de Nei (1978); además, según los trabajos de Nei y col. (1983) los árboles generados mediante el método de Wagner con la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) producen el diseño más preciso de las ramas. Como el número de OTUs en estudio es pequeño (10 poblaciones), se ha utilizado el algoritmo de adición múltiple (MAC) descrito por Swofford (1981), el cual solventa los inconvenientes de utilizar cualquiera de los tres criterios de adición por separado (Farris, 1972). La dirección de los árboles se determinó utilizando el criterio del punto medio o "midpoint rooting".

El análisis, mediante el método de Wagner, tomando las subpoblaciones como OTUs no se ha realizado, ya que Sokal (1985), comparando la estabilidad de las clasificaciones basadas en fenogramas, -análisis de cluster- y cladogramas -método de Wagner-, llegó a la conclusión de que tanto el número de caracteres como el de OTUs influyen en la misma. La sensibilidad de los dos métodos viene determinada por la expresión $n/(2t-3)$ siendo n el número de caracteres analizados y t el número de OTUs incluidos. Cuando el valor de este cociente es superior a 1, los cladogramas presentan más estabilidad que los fenogramas, y al contrario, cuando este valor es inferior a 1 las clasificaciones basadas en los fenogramas son más estables.