



Raza Zamorano-Leonesa

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. VARIACIÓN GENÉTICA

Resultados

Todos los microsatélites equinos amplificaron exitosamente en los asnos españoles, excepto el *locus* ASB2 que no amplificó. Los que amplificaron fueron polimórficos, excepto el HMS1, que resultó ser monomórfico originando un fragmento de 165 pb en todas las razas asnales. El número de alelos por *locus* varió de 3, en el *locus* HMS5, a 15 en el AHT4 (Tabla 7), con diferencias muy pequeñas entre razas. La diversidad genética promedio sobre todo los *loci*, H_r , fue 0.683 ± 0.170 , mientras que de forma individual el rango osciló entre 0.278 en el HMS5 a 0.907 en el marcador AHT5.

La heterocigosidad promedio esperada (H_s) en el total de las razas fue 0.658 ± 0.147 y osciló entre 0.336 (HMS5) y 0.852 (AHT5). El coeficiente de diferenciación genético promedio (G_{ST}) sobre los 13 *loci* fue 0.036 ± 0.023 ($P < 0.001$). EL valor G_{ST} para cada *locus* osciló entre 0.014 para el HTG15 hasta 0.109 para el HMS5. Los valores de PIC y de probabilidad de exclusión (PE) se muestran en la Tabla 7. La PE combinada fue de 0.999, tanto para todas las razas en conjunto como para cada raza individualmente.

En la población de asnos españoles el número medio de alelos por *locus* osciló desde 7.0 en la raza Andaluza hasta 7.5 en la raza Mallorquina (Tabla. 8). La heterocigosidad media observada (H_o) mostró un rango de valores desde 0.528 en la raza Catalana hasta 0.570 en la raza Mallorquina. Mientras que la heterocigosidad esperada (H_E) osciló entre 0.637 en la raza Mallorquina y 0.684 en la raza Zamorano-Leonesa, no presentándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($P > 0.05$).

Tabla 7. Número total y rango de los alelos observados, heterocigosidad promedio H_S y H_T , coeficiente de diferenciación génica G_{ST} , PIC y PE en las razas asnales españolas.

Microsatélite	No. A ¹	Rango (pb) ²	H_T	H_S	G_{ST}	PIC ³	PE ⁴
AHT4	15	126-160	0.773	0.753	0.031***	0.71	0.55
AHT5	14	126-156	0.907	0.852	0.037***	0.85	0.74
ASB2	-	-	-	-	-	-	-
HMS1 ^A	1	165	-	-	-	-	-
HMS2	10	229-247	0.709	0.714	0.016***	0.65	0.47
HMS3	7	152-170	0.618	0.603	0.044***	0.51	0.32
HMS5	3	105-109	0.278	0.336	0.109***	0.20	0.10
HMS6	6	151-167	0.649	0.613	0.041***	0.54	0.33
HMS7	7	165-177	0.626	0.601	0.031***	0.53	0.33
HTG4	5	167-175	0.495	0.439	0.048***	0.40	0.21
HTG6	11	76-102	0.817	0.714	0.053***	0.73	0.55
HTG7	13	134-164	0.843	0.800	0.030***	0.80	0.65
HTG10	12	85-107	0.837	0.790	0.035***	0.78	0.63
HTG15	7	116-136	0.751	0.746	0.014***	0.70	0.51
VHL20	4	75-99	0.579	0.597	0.035***	0.50	0.31
Total			0.683 (± 0.170)	0.658 (± 0.147)	0.036*** (± 0.023)		0.999

1 Número total de alelos observados. – No amplificó.

2 Rango de tamaño de alelos observado en pares de bases.

3.- Contenido de información polimórfica.

4.- Probabilidad de exclusión.

A.- Monomórfico.

*** P < 0.001

El número de alelos privados varió entre las cinco razas, estando presente sólo uno en la raza Andaluza (HMS6: alelo con 151 pb), 4 en la raza de las Encartaciones (uno en HTG4: con 175 pb; AHT4: con 146 pb; y dos en el *locus* HTG6: de 98 y 100 pb), se encontraron 2 en la raza Mallorquina (uno en el HMS3: de 160 pb y uno en el HTG15 correspondiendo al alelo de 136 pb) y uno en la raza Zamorano-Leonesa (HTG4: con 173 pb). Cabe destacar que sólo uno de los alelos privados encontrados mostró una frecuencia superior al 5% (HTG6; alelo de 100 pb y con una frecuencia de 10.8%, en la raza Asno de las Encartaciones).

Con respecto al PIC, todos los *loci* pueden ser considerados elevadamente polimórficos, excepto los microsatélites HMS5 y HTG4, en los cuáles el valor de PIC estuvo por debajo del valor límite de 0.5. Apartando estos casos particulares, el rango estimado de PIC osciló entre 0,50 (VHL20) y 0,85 (AHT5), estando esta elevada diversidad génica en concordancia con otros trabajos, en los cuáles al igual que en éste, se han utilizado microsatélites para determinar la variabilidad genética de las poblaciones (Kantanen *y col.*, 2000; Arranz *y col.*, 2001).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) fue testado para todas las razas y todos los marcadores. De los 65 contrastes o combinaciones raza-*locus*, sólo 48 tests dieron desviaciones significativas del equilibrio HWE, mostrando todas ellas un déficit significativo de heterocigotos. Solamente 17 de los tests mostraron equilibrio Hardy-Weinberg, correspondiendo a las razas Andaluza, Encartaciones y Mallorquina para cuatro microsatélites cada una de ellas (HMS3, HMS5, HTG6 y VHL20; HMS3, HMS5, HTG10 y VHL20; y AHT4, HMS3, HMS5 y HMS6, respectivamente), la raza Zamorano-Leonesa para tres microsatélites (HMS5, HTG10 y VHL20) y la raza Catalana tan solo para dos microsatélites (el HMS5 y el HTG15). Solo el microsatélite HMS5 mostró equilibrio H-W en todas las 5 razas.

Tabla 8. Tamaño muestral, número de alelos por locus y heterocigosidades medias (\pm error estándar) a partir del análisis de 13 loci microsatélites en las razas asnales españolas.

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

* Estimador insesgado (Nei, 1978).

El análisis de la identificación de alelos reveló poca o nula diferencia entre las cinco razas asnales analizadas (Figura 11). A pesar de que se presentaron algunos alelos en una sola de las razas estudiadas, estos siempre estuvieron a frecuencias bajas, indicándonos que posiblemente sea más producto del número de individuos muestreados, que de alelos marcadores de raza.

Discusión

El número de alelos promedio, así como la heterocigosidad esperada (H_E) y demás indicadores de variabilidad genética fueron similares en todas las razas, indicando que no existen diferencias apreciables en las 5 razas de asnos españolas a nivel de variabilidad genética. Estos valores son además similares a reportes previos en la raza asnal Catalana (Jordana y col., 2001) y el asno francés Baudet du Poitou (Bellone y col., 1998).

La diferenciación genética promedio (G_{ST}) entre razas fue del 3.6%, relativamente baja pero significativa ($P < 0.001$), contribuyendo todos los *loci* a esa diferenciación.

La PE global fue de 99.9% para cada raza, lo que hace extremadamente improbable que una falsa paternidad no pueda ser reconocida con este sistema de marcadores. Así, con esta combinación de marcadores, podemos contar con una herramienta efectiva para la verificación de paternidades en asnos.

Así mismo, podemos cerrar este capítulo indicando que los análisis con marcadores genéticos del tipo microsatélite son muy útiles y valiosos para el estudio de la variabilidad genética en la población de asnos y de esta manera ayudar a contribuir al pronto establecimiento de un plan o programa de conservación en esta especie.

ASNOS (<i>Equus asinus</i>)						
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
AHT4	126	0,011				0,005
	128	0,053	0,025	0,007	0,014	0,125
	130		0,004		0,005	
	132	0,011	0,004			0,005
	134			0,014	0,010	
	136	0,057	0,014	0,047	0,024	0,019
	138	0,080	0,050	0,074	0,192	0,046
	144			0,007	0,010	
	146			0,020		
	148	0,450	0,479	0,453	0,404	0,245
	150	0,023	0,021	0,027		0,116
	152	0,034	0,064	0,054	0,120	0,065
	154	0,103	0,200	0,250	0,082	0,315
	156	0,109	0,118	0,047	0,130	0,046
	160	0,069	0,021		0,010	0,014
	PIC	0,737	0,678	0,685	0,732	0,778
	PE	0,584	0,504	0,511	0,565	0,624
He	0,762	0,711	0,723	0,765	0,806	
Ho	0,655	0,664	0,622	0,788	0,731	
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
AHT5	126	0,046	0,054	0,155	0,101	0,240
	128	0,115	0,061	0,061	0,067	0,042
	130		0,029	0,081	0,029	0,014
	132	0,080	0,182	0,061	0,255	0,056
	134	0,080	0,061	0,068	0,096	0,042
	136	0,201	0,046	0,074	0,014	0,102
	138	0,103		0,054	0,005	0,014
	140	0,046	0,050	0,074	0,005	0,162
	142	0,011	0,011		0,010	0,028
	144	0,069	0,021	0,122	0,086	0,042
	146	0,087	0,071	0,114	0,226	0,185
	148	0,069	0,104	0,034	0,010	0,037
	152	0,086	0,261	0,088	0,087	0,028
	156	0,006	0,050	0,014	0,010	0,009
	PIC	0,885	0,851	0,900	0,826	0,845
	PE	0,786	0,737	0,810	0,695	0,725
	He	0,899	0,867	0,912	0,848	0,863
Ho	0,839	0,686	0,824	0,740	0,648	
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS2	229	0,006	0,007	0,041		
	231	0,052	0,032	0,007		0,014
	233	0,069	0,025	0,034	0,091	0,037
	235	0,270	0,196	0,263	0,101	0,227
	237	0,402	0,550	0,432	0,510	0,440
	239	0,098	0,125	0,088	0,207	0,204
	241	0,011		0,014	0,029	0,005
	243	0,052	0,054	0,108	0,019	0,060
	245	0,023	0,011	0,014	0,034	0,009
	247	0,017			0,010	0,005
	PIC	0,711	0,601	0,684	0,641	0,665
	PE	0,538	0,418	0,505	0,461	0,476
	He	0,749	0,641	0,726	0,680	0,712
Ho	0,575	0,586	0,686	0,558	0,583	

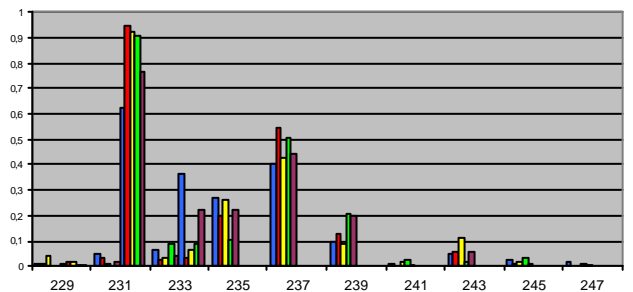
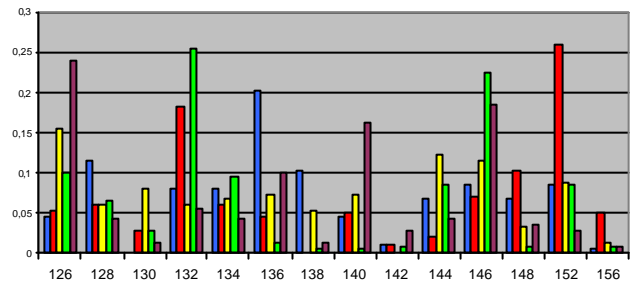
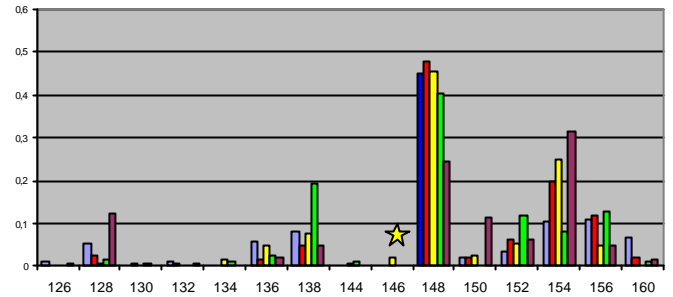


Figura 11. Frecuencias alélicas y su distribución en las poblaciones asnales.

LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS3	160				0,029	
	162	0,006	0,096	0,054	0,106	0,083
	164	0,023	0,011	0,061	0,005	0,028
	166	0,165	0,134	0,082	0,139	0,191
	168	0,335	0,273	0,168	0,284	0,388
	170	0,448	0,371	0,635	0,409	0,310
	172	0,023	0,114		0,029	
	PIC	0,596	0,709	0,521	0,676	0,658
	PE	0,392	0,525	0,342	0,489	0,459
	He	0,551	0,676	0,531	0,644	0,564
	Ho	0,494	0,607	0,527	0,692	0,574
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS5	105	0,006	0,018	0,014	0,005	0,005
	107	0,626	0,946	0,926	0,909	0,769
	109	0,368	0,036	0,061	0,087	0,227
	PIC	0,366	0,101	0,132	0,154	0,296
	PE	0,186	0,052	0,069	0,079	0,151
	He	0,475	0,103	0,140	0,168	0,360
	Ho	0,517	0,107	0,122	0,183	0,352
	LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL
HMS6	151	0,017				
	153	0,385	0,104	0,203	0,203	0,213
	155	0,402	0,493	0,453	0,453	0,370
	157	0,167	0,386	0,304	0,304	0,380
	165		0,018			0,032
	167	0,029		0,041	0,041	0,005
	PIC	0,595	0,516	0,596	0,596	0,607
	PE	0,389	0,314	0,389	0,389	0,396
	H	0,665	0,599	0,664	0,528	0,675
	Ho	0,356	0,429	0,581	0,519	0,472
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS7	165		0,054	0,047	0,043	0,028
	167	0,511	0,321	0,338	0,279	0,417
	169	0,299	0,539	0,561	0,563	0,417
	171	0,155	0,071	0,041	0,058	0,083
	173		0,014		0,014	0,032
	175	0,029			0,034	0,023
	177	0,006		0,014	0,010	
	PIC	0,560	0,532	0,492	0,544	0,576
	PE	0,357	0,336	0,299	0,356	0,378
	H	0,628	0,600	0,571	0,602	0,646
Ho	0,218	0,371	0,282	0,404	0,259	
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HTG4	167	0,230	0,493	0,149	0,269	0,306
	169	0,615	0,493	0,764	0,688	0,667
	171	0,155	0,014	0,074	0,043	0,019
	173					0,009
	175			0,014		
	PIC	0,484	0,395	0,356	0,381	0,377
	PE	0,290	0,205	0,206	0,209	0,203
	H	0,548	0,516	0,392	0,455	0,464
Ho	0,172	0,100	0,162	0,106	0,037	

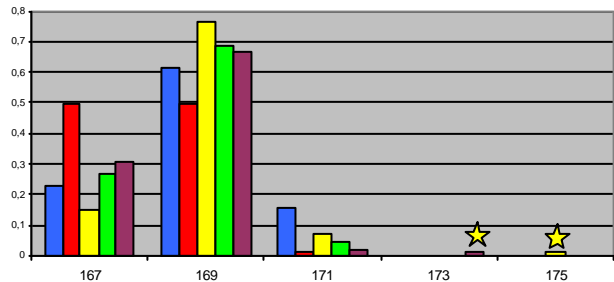
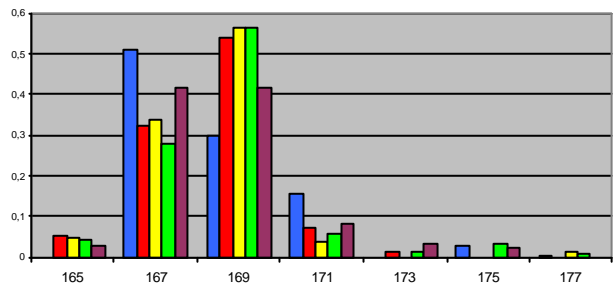
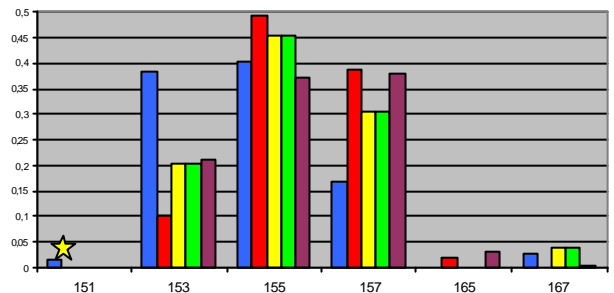
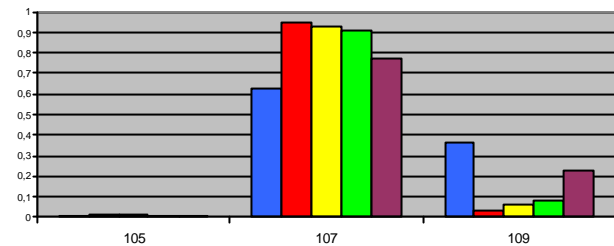
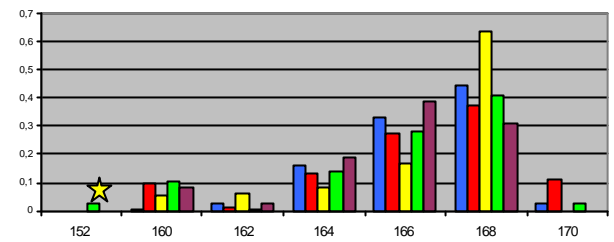


Figura 11. (Continuación)

LOCUS	ALELO	AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HTG6	76		0,214		0,058	0,042
	78	0,230	0,171	0,142	0,375	0,116
	80	0,126	0,039	0,182	0,163	0,319
	82	0,368	0,118	0,182	0,313	0,292
	84	0,276	0,254	0,236	0,058	0,185
	86			0,007	0,005	
	88			0,061	0,014	0,005
	90		0,050	0,007	0,010	0,009
	92		0,154	0,041		0,032
	98			0,034		
	100			0,108		
	PIC	0,668	0,794	0,820	0,684	0,725
	PE	0,466	0,639	0,680	0,492	0,545
	H	0,724	0,822	0,845	0,732	0,766
Ho	0,609	0,536	0,730	0,692	0,630	
LOCUS	ALELO	AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HTG7	134		0,011	0,007		
	136	0,098	0,064	0,034	0,072	0,106
	138	0,333	0,346	0,412	0,245	0,148
	140	0,023	0,021	0,061		0,042
	142		0,004		0,005	0,005
	146	0,006	0,050	0,054	0,087	0,042
	148	0,115	0,032	0,074	0,058	0,051
	150	0,242	0,265	0,095	0,240	0,097
	154	0,057	0,021	0,034	0,067	0,051
	156	0,034	0,018	0,007	0,029	0,139
	158	0,023	0,014	0,027	0,034	0,171
	160	0,057	0,064	0,122	0,163	0,125
	164	0,011	0,089	0,074		0,023
	PIC	0,774	0,764	0,769	0,813	0,873
	PE	0,620	0,610	0,624	0,672	0,765
	H	0,803	0,792	0,791	0,837	0,888
Ho	0,644	0,729	0,730	0,798	0,685	
LOCUS	ALELO	AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HTG10	85	0,023	0,004	0,014	0,014	0,051
	87	0,023	0,054	0,047	0,106	0,042
	89	0,006				0,014
	91	0,086	0,100	0,108	0,019	0,037
	93	0,011	0,121	0,041	0,024	0,019
	95	0,075	0,014	0,047	0,149	0,093
	97	0,040	0,064	0,101	0,232	0,184
	99	0,494	0,189	0,243	0,212	0,305
	101	0,201	0,289	0,284	0,139	0,116
	103	0,034	0,072	0,088	0,072	0,056
	105	0,006	0,046	0,020	0,029	0,065
	107		0,046	0,007	0,005	0,019
	PIC	0,669	0,822	0,803	0,822	0,821
	PE	0,495	0,689	0,660	0,685	0,690
	H	0,702	0,842	0,829	0,846	0,840
Ho	0,621	0,750	0,838	0,779	0,741	

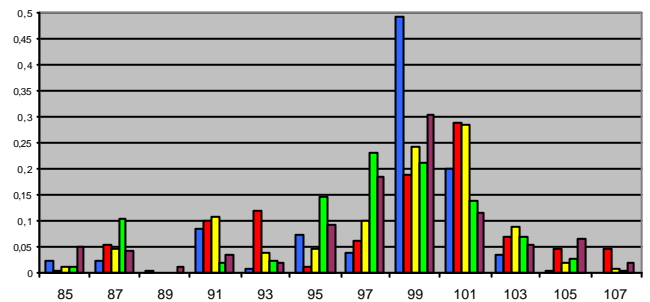
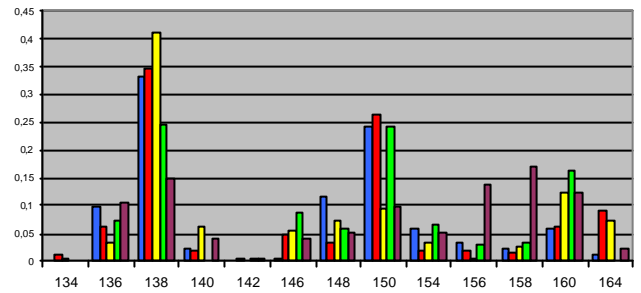
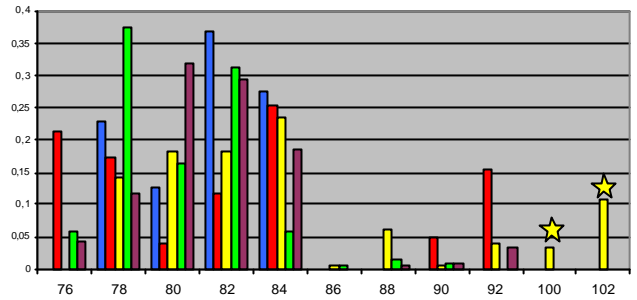


Figura 11. (Continuación)

LOCUS	ALELO	AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HTG15	116	0,011		0,007		
	126	0,299	0,354	0,297	0,298	0,306
	128	0,322	0,221	0,324	0,409	0,394
	130	0,144	0,071	0,115	0,130	0,093
	132	0,086	0,143	0,176	0,043	0,134
	134	0,138	0,211	0,081	0,091	0,074
	136				0,029	
	PIC	0,721	0,717	0,716	0,672	0,673
	PE	0,539	0,531	0,532	0,483	0,483
	He	0,764	0,759	0,761	0,720	0,723
	Ho	0,655	0,764	0,689	0,683	0,657
LOCUS	ALELO	AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
VHL20	75	0,609	0,418	0,655	0,707	0,574
	77	0,006	0,229	0,007	0,024	
	89	0,190	0,079	0,135	0,101	0,181
	91	0,195	0,275	0,203	0,168	0,245
	PIC	0,497	0,635	0,459	0,422	0,513
	PE	0,302	0,430	0,275	0,253	0,311
	He	0,588	0,694	0,515	0,464	0,580
	Ho	0,563	0,536	0,541	0,462	0,639

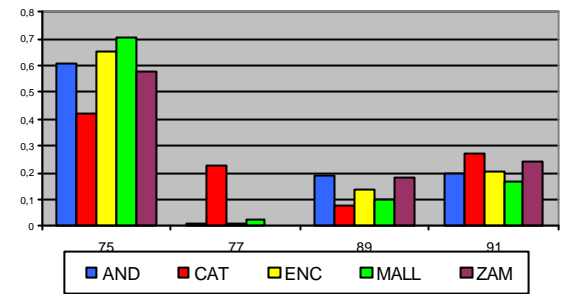
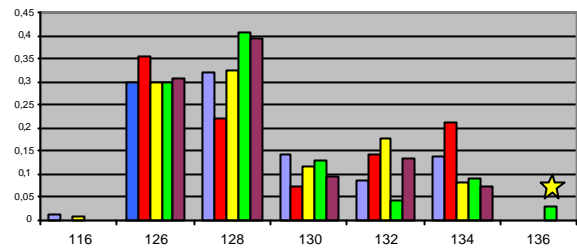


Figura 11. (Continuación)

★ Alelos privados

4. 2 ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

Resultados

Para el estudio de la estructuración poblacional en las diferentes razas se realizaron dos tipos de análisis; en primer lugar se evaluó la estructura global tomando las razas como unidades taxonómicas operativas (OTU's), y en segundo lugar se realizó un estudio a un nivel inferior, realizando para ello una subdivisión de las razas en subpoblaciones. La distribución "a priori" de las subpoblaciones y su localización geográfica se puede apreciar en la Tabla 4 y la Figura 6, respectivamente.

Los valores de F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} calculados sobre todas las razas y *loci* se muestran en la Tabla 9. A nivel global se encontró una aparente diferenciación racial que resultó ser considerable, mostrando el análisis F_{ST} *multiocus* que un 4.1% del total de la variación genética podría ser atribuida a diferencias entre razas; mientras que el remanente 95.9 % correspondería a diferencias entre individuos.

La diferenciación genética entre razas fue además altamente significativa para todos los *loci* polimórficos ($P < 0.001$). Como promedio se puede indicar que las razas presentan un 17.8% ($P < 0.001$) de déficit de heterocigotos, mientras que la población como un total mostró un 21.1 % ($P < 0.001$) de déficit de heterocigotos.

Los valores de los *F-estadísticos* en las razas asnales españolas, a todos los niveles jerárquicos, se presentan en la Tabla 10. El grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones fue altamente significativo para todas las razas y osciló entre el 1.3% para la raza Asno de las Encartaciones hasta 5.8% para la raza Andaluza ($P < 0.001$), indicando la existencia de una cierta subestructuración reproductiva dentro de todas ellas.

Tabla 9. Análisis de los F -estadísticos para cada uno (\dagger) de los 13 microsatélites polimórficos en cinco razas de asnos españoles y (\ddagger) media estimada para estas razas.

Locus \dagger	F_{IS} $\bullet f$	F_{IT} $\bullet F$	F_{ST} $\bullet q$
AHT4	0.074 (0.030)***	0.107 (0.032)***	0.036 (0.020)***
AHT5	0.163 (0.034)***	0.201 (0.040)***	0.045 (0.010)***
HMS2	0.147 (0.032)***	0.159 (0.032)***	0.014 (0.006)***
HMS3	0.031 (0.042)	0.069 (0.045)**	0.039 (0.030)***
HMS5	-0.032 (0.038)	0.105 (0.098)**	0.136 (0.071)***
HMS6	0.254 (0.067)***	0.286 (0.074)***	0.042 (0.029)***
HMS7	0.481 (0.065)***	0.496 (0.069)***	0.028 (0.022)***
HTG4	0.777 (0.046)***	0.791 (0.044)***	0.062 (0.044)***
HTG6	0.201 (0.064)***	0.258 (0.073)***	0.070 (0.020)***
HTG7	0.126 (0.039)***	0.155 (0.049)***	0.033 (0.0169)***
HTG10	0.090 (0.019)***	0.126 (0.026)***	0.039 (0.013)***
HTG15	0.063 (0.030)***	0.078 (0.019)***	0.017 (0.012)***
VHL20	0.060 (0.090)	0.116 (0.123)***	0.057 (0.038)***
Media estimada \ddagger	0.178 (0.047)***	0.211 (0.046)***	0.041 (0.005)***

F_{IS} , estimador de la consanguinidad dentro de la población; F_{IT} , consanguinidad estimada en el total de la población; F_{ST} , medida de diferenciación genética entre las poblaciones.

Desviaciones estándar entre paréntesis; \dagger Locus: estimado a partir de jackknife sobre poblaciones.

\ddagger Media: estimado a partir de jackknife sobre loci.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, a partir de tests permutacionales del programa FSTAT.

El análisis jerárquico de las razas se muestra en la Tabla 11, revelando, como era de esperar que la mayor diferenciación se presenta entre razas con respecto a la población total, más que entre subpoblaciones dentro de raza y dentro de las subpoblaciones, 6.4% vs

3.5% y 3.0%, respectivamente. La diferenciación entre razas a nivel jerárquico fue del 6.4%, mayor que la obtenida en el análisis no jerárquico, que fue tan solo del 4.1% (Tabla 2).

La Tabla 12 muestra el total de consanguinidad estimada por raza ($F \equiv F_{IT}$), evaluada a partir del análisis jerárquico. En la misma se puede apreciar que la mayoría de los *loci* mostraron valores significativamente diferentes de cero, al igual que el valor medio estimado ($P < 0.001$). Los F_{IT} promedios, obtenidos a partir de las replicaciones jackknifing sobre todos los *loci*, oscilaron entre 0.112 ± 0.049 y 0.232 ± 0.058 para la raza Mallorquina y Andaluza, respectivamente.

Tabla 10. Estructura genética de las razas asnales españolas a través del análisis de sus subpoblaciones.

Raza	F_{IS}^f	F_{IT}^F	F_{ST}^q
Andaluza	0.184 (0.058)*** † (0.084-0.306)	0.232 (0.058)*** (0.132-0.352)	0.058 (0.009)*** (0.040-0.075)
Catalana	0.189 (0.053)*** (0.102-0.303)	0.214 (0.052)*** (0.127-0.324)	0.031 (0.007)*** (0.018-0.044)
Mallorquina	0.091 (0.045)*** (0.016-0.193)	0.112 (0.049)*** (0.032-0.221)	0.022 (0.007)*** (0.010-0.038)
Encartaciones	0.118 (0.040)*** (0.053-0.210)	0.130 (0.041)*** (0.062-0.224)	0.013 (0.006)*** (0.003-0.026)
Zamorano-Leonesa	0.193 (0.053)*** (0.099-0.307)	0.223 (0.061)*** (0.116-0.353)	0.037 (0.014)*** (0.014-0.068)

f, estima de la consanguinidad dentro de la población; F, consanguinidad estimada total; θ , medida de diferenciación genética intra-raza .

Desviación estándar entre paréntesis estimada sobre replicaciones jackknife sobre *loci*.

*** $P < 0.001$, a partir de tests permutacionales del programa FSTAT.

† 95% Intervalo de confianza.

En la Tabla 13 se muestran los valores estimados de F_{ST} (tomados como distancias genéticas) debajo de la diagonal, y el flujo de genes entre pares de razas de asnos españoles (N_{em}) arriba de la diagonal. Después de 1.000 permutaciones, realizadas con el programa FSTAT, todos los valores de F_{ST} calculados por combinaciones de pares de razas fueron significativamente diferentes de cero ($P < 0.001$). Las menores diferencias se detectaron para el par Andaluza - Zamorano-Leonesa, coincidiendo también dicho valor para el par Encartaciones - Mallorquina ($F_{ST}=0.031$); mientras que los valores más divergentes se encontraron para el par de las razas Andaluza - Catalana ($F_{ST}=0.058$).

Tabla 11 Análisis de los *F*-estadísticos a nivel jerárquico y componentes de varianza a dos niveles de subdivisión en la razas asnales españolas.

Fuentes de Variación	Componente de varianza	Porcentaje de la variación	Índice de fijación
Entre razas	0.133	2.96	$F_{ST}= 0.064$
Entre subpoblaciones dentro de razas	0.153	3.41	$F_{SC}= 0.035$
Dentro de subpoblación	4.208	93.63	$F_{CT}= 0.030$

N_{em} representa el número efectivo de migrantes que se intercambian por generación. Los valores de N_{em} para los pares de razas oscilaron entre 4.16 y 7.88 para el par AND-CAT y el par MALL-ENC, respectivamente.

Discusión

En la Tabla 9 se aprecia la existencia de cierta diferenciación genética entre las razas de asnos españoles, contribuyendo todos los *loci* a esa diferenciación; siendo los valores moderadamente bajos y muy

similares para todos los sistemas estudiados pero muy significativos ($P < 0.001$), indicando un relativamente elevado flujo génico entre ellas.

Tabla 12. Consanguinidad global estimada (F_{ST}), mediante análisis jerárquico, en las razas asnales españolas.

Locus	Andaluza	Catalana	Mallorquina	Encartaciones	Zam.-Leonesa
AHT4	0.147 ***	0.129**	-0.038	0.146 **	0.151 **
AHT5	0.080 **	0.220 ***	0.138 ***	0.098*	0.253 ***
HMS2	0.250 ***	0.106 *	0.195 ***	0.065	0.223 ***
HMS3	0.144 **	0.117 *	-0.085	0.017	-0.030
HMS5	-0.095	-0.037	-0.105	0.133	-0.015
HMS6	0.479 ***	0.271 ***	0.033	0.141 *	0.315 ***
HMS7	0.661 ***	0.357 ***	0.336 ***	0.478 ***	0.577 ***
HTG4	0.695 ***	0.823 ***	0.782 ***	0.604 ***	0.944 ***
HTG6	0.177 ***	0.364 ***	0.052	0.153 ***	0.206 ***
HTG7	0.224 ***	0.067 **	0.048	0.082	0.246 ***
HTG10	0.144***	0.125 ***	0.076 **	-0.013	0.139 ***
HTG15	0.138***	-0.000	0.036	0.093	0.111 *
VHL20	-0.015	0.193 ***	0.031	-0.061	-0.105
Media	0.232*** (0.058)	0.214*** (0.052)	0.112*** (0.049)	0.130*** (0.041)	0.223*** (0.058)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ a partir de tests permutacionales mediante el programa FSTAT.

Sin embargo, está claro que la mayor parte de la variación genética corresponde a diferencias entre individuos (95.9%) y menos del cinco por ciento se debe a diferencias entre las razas. Estos valores de

F_{ST} son similares a los encontrados en otras especies domésticas, como por ejemplo a los citados en razas de búfalos de agua ($F_{ST}=0.038$, Barker *y col.*, 1997), y en razas equinas españolas ($F_{ST}=0.078$, Cañón *y col.*, 2000); aunque resultaron ser ligeramente inferiores a los encontrados en razas equinas de Noruega ($F_{ST}=0.12$, Bjørnstad *y col.*, 2000), en razas bovinas europeas ($F_{ST}=0.11$, MacHugh *y col.*, 1998; Kantanen *y col.*, 2000) y entre razas caninas españolas ($F_{ST}=0.099$, Jordana *y col.*, 1992).

Los resultados del análisis jerárquico muestran además que las poblaciones de asnos españoles están subestructuradas a diferentes niveles (Tabla 11). La diferenciación dentro de razas fue solamente la mitad de la existente entre razas ($F_{SC}=0.035$ y $F_{CT}=0.064$, respectivamente).

El grado de diferenciación genética entre subpoblaciones dentro de razas (F_{SC}) fue del 3.5% y el promedio de diferenciación entre individuos dentro de la misma subpoblación fue del 3.0% (F_{CT}). Este valor de F_{SC} fue similar al reportado para otros organismos, p.e. perros españoles (Jordana *y col.*, 1992), perros de las praderas o “black-tailed dogs” (Chesser, 1983) y ratón doméstico (Selander *y Kaufman*, 1975).

La consanguinidad estimada por raza ($F \cong F_{IT}$) se muestra en la Tabla 12. En la misma se puede apreciar la existencia de un cierto déficit significativo de heterocigotos para todas las razas ($P<0.001$). La consanguinidad, la cual es producto del apareamiento entre individuos emparentados, puede causar una pérdida de heterocigotos, pero en este caso, dicho déficit cursa o afecta de forma similar a todos o la gran mayoría de *loci*. Las razas AND, CAT y ZAM, que muestran entre 10 y 11 *loci* de un total de 13, con déficit significativo de heterocigotos, podrían ser un claro ejemplo de déficit debido a este fenómeno (Tabla 5).

Tabla 13. Estimaciones F_{ST} (debajo de la diagonal), como medida de distancia genética entre las poblaciones de asnos españoles, y número efectivo de migrantes por generación ($N_e m$) (arriba de la diagonal).

Raza	Andaluza	Catalana	Mallorquina	Encartaciones	Zam.-Leonesa
Andaluza		4.167	4.762	6.532	7.797
Catalana	0.058		6.134	6.585	4.842
Mallorquina	0.051	0.040		7.883	7.118
Encartaciones	0.037	0.037	0.031		7.235
Zamorano-Leonesa	0.031	0.050	0.034	0.034	

Sin embargo, cabe destacar que en estas razas se han apreciado valores altamente significativos de F_{ST} intrarracial (Tabla 10; 0.058, 0.031 y 0.037, respectivamente), sugiriendo que existe también una significativa subestructuración reproductiva (efecto “Wahlund”) en estas poblaciones. Por otro lado, las razas MALL y ENC, las cuáles mostraron sólo déficit en 5 y 6 *loci*, respectivamente, no se le podría atribuir, esencialmente, dicho déficit en estos casos a la consanguinidad.

Debemos recordar que existen otros factores, distintos a la consanguinidad, que también provocan déficit de heterocigotos (Nei, 1987). Entre ellos podemos citar, en primer lugar, a que el *locus* este bajo selección (efecto “autoestopista” o “efecto de arrastre”), ligado a algún carácter morfológico o productivo de interés selectivo; en segundo lugar se cita la ocurrencia de alelos “nulos”, alelos estos que no logran amplificar por alguna modificación en una de las cadena del ADN donde deberían hibridar (mutación) y por lo tanto son erróneamente leídos como un exceso de homocigotos (al leerse solo uno de los alelos); y tercero, la presencia de una subestructuración reproductiva de la población dentro de la raza (efecto Wahlund) .

Esta subestructuración reproductiva dentro de las razas, en unidades aisladas, podría ser una factible explicación para entender este gran déficit de heterocigotos que se observa en la población asnal española. No obstante, existen dos *loci*, concretamente el HTG4 y el HMS7, que muestran un déficit altamente significativo de heterocigotos en todas las razas ($P < 0.001$). La explicación más coherente para explicar este déficit en estos dos marcadores, es que dichos *loci* podrían estar próximos a algún carácter de interés que esté bajo selección (efecto autoestopista), o la posible presencia, no detectada, de alelos nulos en estas poblaciones. Reportes previos han indicado la ocurrencia de alelos nulos en el *locus* HMS7 en caballos “Quarter horse” (Bozzini y col., 1997). Por lo que la posibilidad de la existencia de alelos nulos en el *locus* HMS7 en los asnos españoles no debería ser descartada como otra posible causa de déficit de heterocigotos.

En el contexto de la conservación y el mantenimiento de la variabilidad genética animal, los valores de migración ($N_e m$) pueden ser interpretados como el límite superior de intercambio por generación que permitiría mantener la diferenciación genética observada entre las razas (Cañón y col., 2000). Por ejemplo, una tasa de introgresión de 8 individuos por generación entre las razas ENC y MALL podrían mantener el nivel estimado de diferenciación genética entre esas razas. De igual forma, cuando comparamos las razas CAT y AND, un flujo de genes entre ellas superior a 4 individuos por generación podría suponer un real amenaza para ambas razas.

Para finalizar este capítulo, podemos indicar que el estudio contribuye al mejor conocimiento de la estructura genética y a la caracterización molecular de estas razas minoritarias y en peligro de extinción. Así mismo, se demuestra que los microsatélites pueden ser usados eficazmente para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones de asnos y ayudar así a establecer los planes para su

conservación (Jordana y Folch, 1997; Jordana *y col.*, 2001). La información generada puede ser integrada en el Banco global de la diversidad de los animales domésticos de la FAO (FAO Global Data Bank on Domestic Animal Diversity (DAD-IS)), para su conocimiento y divulgación.

**4. 3 RELACIONES FILOGENÉTICAS y
ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A RAZA.**

Las relaciones filogenéticas entre las poblaciones se evalúan principalmente a través de las distancias genéticas y los árboles generados a partir de éstas. Otras metodologías menos frecuentes son el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de diversidad de Weitzman y el análisis de los alelos compartidos (allele shared). En este capítulo evaluamos las relaciones genéticas de las razas asnales españolas mediante estas diferentes metodologías; así como, la asignación de individuos a raza, mediante la utilización de metodologías basadas en probabilidades y en distancias genéticas.

Distancia D_A de Nei

La distancia D_A , usando los 13 microsatélites polimórficos, osciló entre 0.057 y 0.093 para las razas asnales españolas (Tabla 14). Utilizando dicha distancia se construyó un árbol con el método NJ y la robustez o confiabilidad del árbol obtenido se evaluó mediante 1.000 replicaciones bootstrap (Figura 12). La mayor consistencia se encontró en el grupo formado por las razas Catalana - Mallorquina, con un soporte del 70%, y el grupo formado por las cuatro razas de capa negra (CAT, ENC, MALL y ZAM), todas ellas del norte de España, con un 77% de consistencia.

Las relaciones entre las poblaciones parecen corresponderse con la distribución geográfica de las razas estudiadas. El dendrograma (Fig. 12) agrupó a todos los asnos españoles en un solo clúster, aunque con tan solo un 59% de soporte.

Los bajos valores de distancia genética entre las razas asnales españolas indican una estrecha relación entre estas poblaciones. Para la construcción del dendrograma se utilizó a la raza de caballos Merens

como población “outgroup” y al Asno de Marruecos como población de referencia para las razas españolas.

Tabla 14. Matriz de distancia genética D_A entre las cinco razas de asnos españoles, el Asno de Marruecos y la raza equina Merens.

Raza	AND	CAT	MALL	ENC	ZAM	Merens
Marruecos	0.119	0.197	0.154	0.136	0.123	0.685
Andaluza		0.093	0.078	0.063	0.057	0.629
Catalana			0.069	0.071	0.079	0.665
Mallorquina				0.067	0.062	0.649
Encartaciones					0.059	0.640
Zamorano-Leonesa						0.644

Dentro de las razas españolas, las cuatro razas de capa negra (CAT, ENC, MALL y ZAM) formaron un grupo sólido con un 77% de confianza, apoyando la hipótesis de un posible ancestro común que podría corresponder al *E. a. europeus*. De ellas, las razas Catalana y Mallorquina resultaron ser las más próximas, soportando también las evidencias, tanto históricas como arqueológicas, que indican que poseen un origen ancestral común (Romagosa, 1959; Payeras y Falconer, 1998).

La mayoría de autores son coincidentes en indicar que la raza asnal Andaluza descende del primitivo asno del norte de África (*E. a. africanus*), el cuál habría sido introducido en el sur de la Península Ibérica a través del Estrecho de Gibraltar (Aparicio, 1960; Epstein, 1984; Sotillo y Serrano, 1985; Clutton-Brock, 1987). Sin embargo, a partir de nuestros datos no podemos confirmar dicha hipótesis, ya que

la raza Andaluza ocupa una posición intermedia entre el grupo de razas de capa negra del Norte de España (*E. a. europeus*) y el asno de Marruecos (*E. a. africanus*). La baja fiabilidad (59% de confianza) del punto de bifurcación hace necesario otros estudios para confirmar estas evidencias.

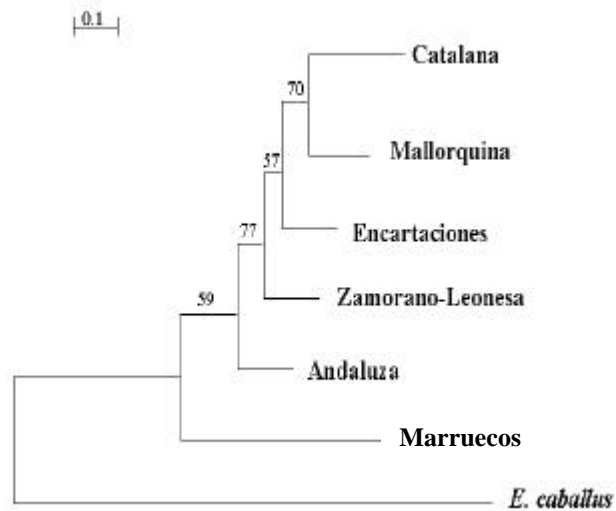


Figura 12. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y la raza equina Merens (outgroup), utilizando la distancia D_A y el algoritmo NJ. Los valores indican el porcentaje de repeticiones bootstrap entre los grupos.

Distancia de Reynolds

La Figura 13 muestra un árbol basado en la distancia genética de Reynolds y el algoritmo NJ, donde se relacionan a las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y los caballos de la raza Merens, los cuáles fueron utilizados como “outgroup”. Los números en las bifurcaciones del dendrograma representan los valores bootstrapping después de 1000 réplicas sobre los 13 *loci* genotipados.

Las relaciones en el dendrograma de la Figura 13 son muy similares a las obtenidas utilizando la distancia genética D_A y el algoritmo NJ. En este caso, como en el anterior, las cuatro razas asnales de capa negra del Norte de España (CAT, ENC, MALL y ZAM) forman un grupo sólido con el 64% de confianza, soportando la hipótesis de un antecesor común, posiblemente a partir del *E. asinus europeus*.

Con la utilización de esta distancia, a diferencia de la anterior, el posible origen africano de la raza Andaluza se clarifica un poco más, ya que esta raza forma un grupo con el asno de Marruecos, soportando entonces la tesis, apuntada previamente por varios autores, acerca del posible origen de la raza Andaluza a partir del asno Africano (Aparicio, 1960; Epstein, 1984; Sotillo y Serrano, 1985). Sin embargo, nuevamente, el bajo valor del bootstrap para este grupo (43%) continúa reflejando la inestabilidad de la topología.

111

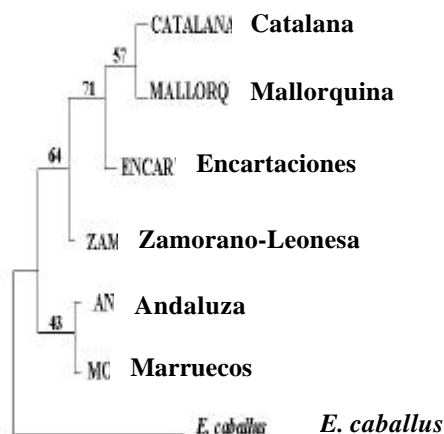


Figura 13. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y el *E. caballus* usado como outgroup, utilizando la distancia de Reynolds y el algoritmo NJ. Los números en los nodos corresponden a los porcentajes de 1000 replicaciones bootstrap.

Futuras investigaciones que involucraran más poblaciones asnales europeas y africanas, así como, el análisis de la variabilidad genética del ADN mitocondrial (mtDNA), podrían ayudarnos a explicar la posible introgresión de ciertos haplotipos mitocondriales de origen africano en estas poblaciones europeas, que sin embargo no se reflejan en el genoma nuclear. Estas aportaciones podrían ser útiles para clarificar este punto, de forma similar a como fueron dilucidados los orígenes de la oveja doméstica (Hiendleder *y col.*, 1998), de los bovinos japoneses (Mannen *y col.*, 1998), o del cerdo doméstico (Guiffra *y col.*, 2000), por citar sólo algunos ejemplos.

Otros métodos para el análisis de las relaciones filogenéticas

En este apartado se evalúan las relaciones filogenéticas de la población de asnos españoles a través de tres métodos de estudio: la diversidad de Weitzman, el análisis de componentes principales y el análisis de alelos compartidos (allele shared). Nosotros esperamos que esta información, conjuntamente con la reportada previamente en los capítulos anteriores, pueda contribuir significativamente al establecimiento de una estrategia sensible en la preservación de estas razas.

El análisis de la diversidad de Weitzman se realizó a partir de la información proveniente de las distancias genéticas de Reynolds y estándar de Nei. La Tabla 15 muestra dichas distancias, pudiéndose apreciar que los valores más pequeños de distancia se corresponden con los pares de las razas AND-ZAM y MALL-ENC para la distancia de Reynolds y Nei, respectivamente; mientras que las mayores distancias, fueron las obtenidas entre las razas AND-CAT en ambas distancias estudiadas.

Una representación del análisis de Weitzman, basada en la distancia estándar de Nei, se presenta en la Figura 14. La longitud de rama para cada raza puede ser interpretada como la medida relativa de su contribución a la función de diversidad. Se observa una clara discriminación entre dos grupos: un primer grupo constituido únicamente por la raza Andaluza (del sur de España) y un segundo grupo formado por todas las razas de capa negra y que se ubican en el norte de España, correspondiéndose con las razas Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa. Estas relaciones coinciden con la distribución expresada y citada en los capítulos previos, dónde se utilizaron otras distancias y otros algoritmos.

Tabla 15. Distancias genéticas de Reynolds (arriba de la diagonal) y estándar de Nei (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas.

<i>Razas</i>	<i>Andaluza</i>	<i>Catalana</i>	<i>Mallorquina</i>	<i>Encartaciones</i>	<i>Zam.-Leonesa</i>
Andaluza	-----	0.1324	0.1074	0.0797	0.0737
Catalana	0.0618	-----	0.0801	0.0767	0.1140
Mallorquina	0.0561	0.0441	-----	<i>0.0597</i>	0.0702
Encartaciones	0.0452	0.0413	0.0379	-----	0.0723
Zamorano-Leonesa	<i>0.0372</i>	0.0537	0.0393	0.0407	-----

(distancias más grandes en negrita; distancias más pequeñas en itálica).

Basada en las dos distancias consideradas, la pérdida marginal de diversidad anexa en cada una de las razas, y que puede ser tomada como una medida de su “singularidad”, se muestra en la Tabla 16. Podemos indicar que como promedio, las mayores y menores pérdidas de diversidad pueden darse en caso de pérdida o extinción de la raza Catalana y de las Encartaciones, respectivamente.

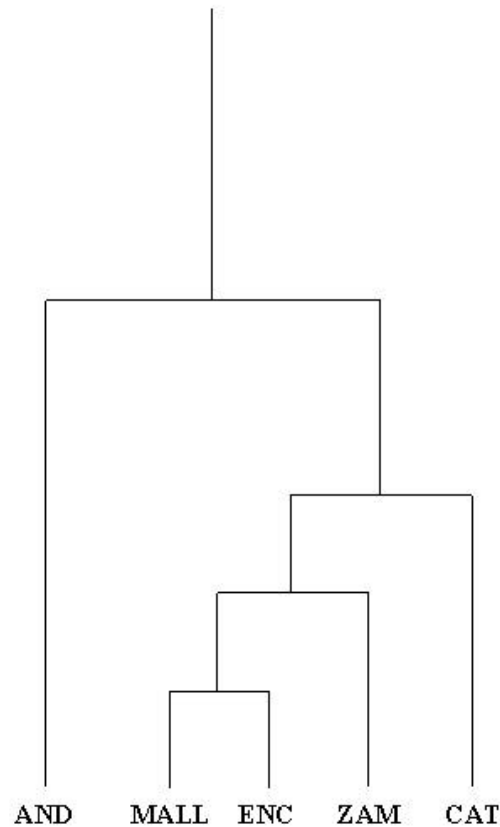


Figura 14. Dendrograma de las relaciones establecidas por el método de Weitzman, utilizando la distancia estándar de Nei, entre las cinco razas asnales españolas.

En la Tabla 16 se puede apreciar además claramente que la pérdida conjunta de las razas Andaluza + Catalana + Encartaciones, induciría a una marcada pérdida, mucho mayor que la suma correspondiente a su nivel de pérdida en forma individual.

Por otro lado, en la figura 15 se presentan los tres principales factores del análisis de los componentes principales (PC). El primer PC representó el 52.0% de la variación, mientras que el segundo PC condensó el 15.0% y el tercero sólo el 13.8% de la variación presente en estas poblaciones.

Tabla 16. Análisis de Weitzman en las razas asnales españolas.

Pérdida de la raza (Q)	Distancia de Reynolds			Distancia estándar de Nei			Promedio $\Delta V/V$ (%)
	Diversidad V(S\Q)	Pérdida absoluta ΔV	Pérdida relativa $\Delta V/V$ (%)	Diversidad V(S\Q)	Pérdida absoluta ΔV	Pérdida relativa $\Delta V/V$ (%)	
Ninguna (0)	1810	0	0.00	3424	0	0.00	0.00
Andaluza (1)	1323	487	26.91	2460	934	28.15	27.53
Catalana (2)	1312	498	27.51	2373	1051	30.70	29.11
Mallorquina (3)	1403	407	22.49	2814	610	17.82	20.16
Encartaciones (4)	1431	379	20.94	2827	597	17.44	19.19
Zamorano-Leonesa (5)	1438	372	20.55	2722	702	20.50	20.53
(1) + (2)	786	1024	56.57	1320	2104	61.45	59.01
(2) + (4)	824	986	54.48	1520	1904	55.61	55.05
(1) + (4)	944	866	47.85	1863	1561	45.59	46.72
(1) + (2) + (4)	407	1403	77.51	723	2701	78.88	78.20
(2) + (3) + (5)	452	1358	75.03	797	2627	76.72	75.88

(S\Q) = diversidad después de descartar a Q a partir S; $\Delta V = V(S) - V(S\Q) =$ valor absoluto.

$\Delta V/V =$ valor relativo (distancia multiplicada por 10000).

El primer componente, el cuál explica más de la mitad de la variación existente, separa claramente las razas asnales españolas de la población de asnos de Marruecos y dentro de las españolas, agrupa estrechamente a las razas Catalana y Mallorquina, de forma similar a lo obtenido previamente (D_A).

La Figura 16 muestra un árbol filogenético con NJ, construido a partir de la distancia de los alelos compartidos, conformada por 109 individuos. De ellos, 20 pertenecen a cada una de las razas asnales españolas y 9 al asno de Marruecos.

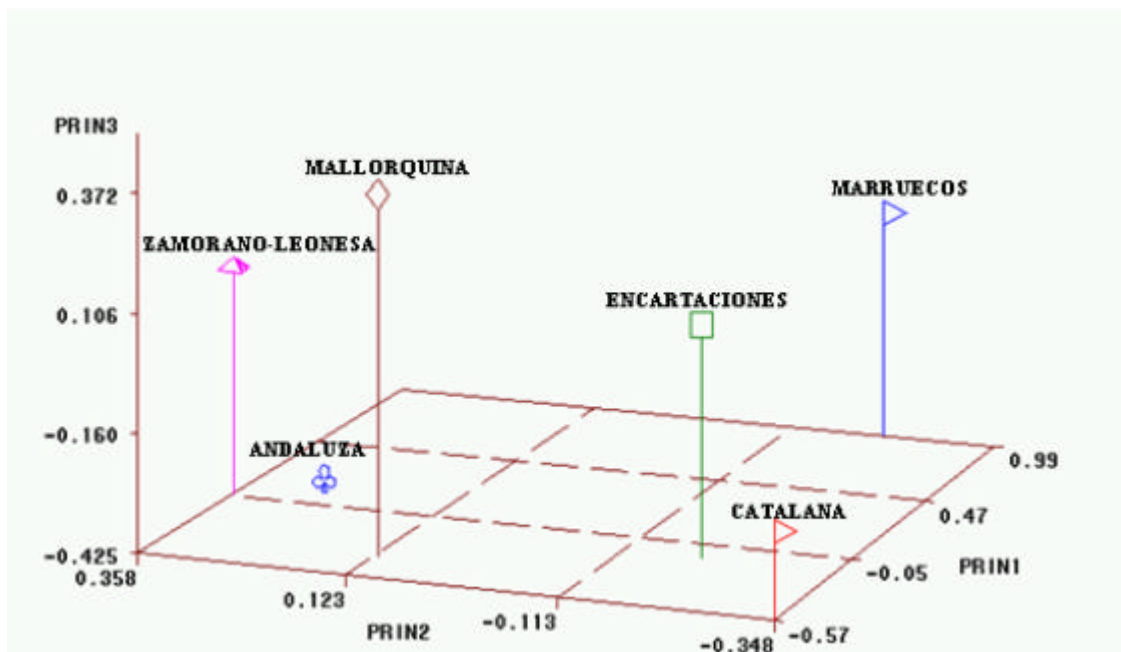


Figura 15. Análisis de los componentes principales a partir de las frecuencias de los 13 microsatélites en las cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. El primer PC explica el 52.0% de la variación, el segundo el 15.0% y el tercero el 13.8% de la variación total.

De los 100 asnos españoles representados en el árbol, solamente 11 no se agruparon con animales de su misma raza. Así mismo, se puede apreciar que algunas de las razas formaron un grupo sólido, compuesto por todos los animales pertenecientes a ella. Por ejemplo,

todos los individuos de la raza AND y ENC formaron un grupo discreto. Las otras razas mostraron un alto nivel de agrupamiento, en especial la CAT y MALL. Los individuos de las razas ZAM y asno de Marruecos mostraron un patrón de agrupamiento más fragmentado, con algunos individuos de estas dos poblaciones esparcidos por el árbol.

Asignación de individuos a raza

La Tabla 17 muestra los resultados del análisis de la asignación de individuos a raza de acuerdo a la metodología utilizada. En la misma se puede observar que la exactitud de la asignación fue moderadamente aceptable en casi todos los métodos utilizados. Los resultados obtenidos evidencian un elevado grado de precisión en la asignación individuo-raza. El método Bayesiano se mostró como el más eficiente, con una precisión del 90.6%, seguido del de frecuencias con un 87.93%; mientras que, el menos eficiente correspondió al asignado por la distancia de Goldstein y col. ($\delta\mu^2$), con tan solo un 33.14% de asignaciones correctas.

Tabla 17. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza a partir de 13 microsatélites, estimados mediante distintas metodologías.

Método	% Asignación Correcta
Bayesiano	90.64
Frecuencias	87.93
D_A Nei <i>et al</i>	82.65
D_C Cavalli-Sforza y Edwards	78.95
D_{AS} Chakraborty y Jin	73.10
D_S Nei	72.71
D_M Nei	71.93
($\delta\mu$)² Goldstein <i>et al</i>	33.14

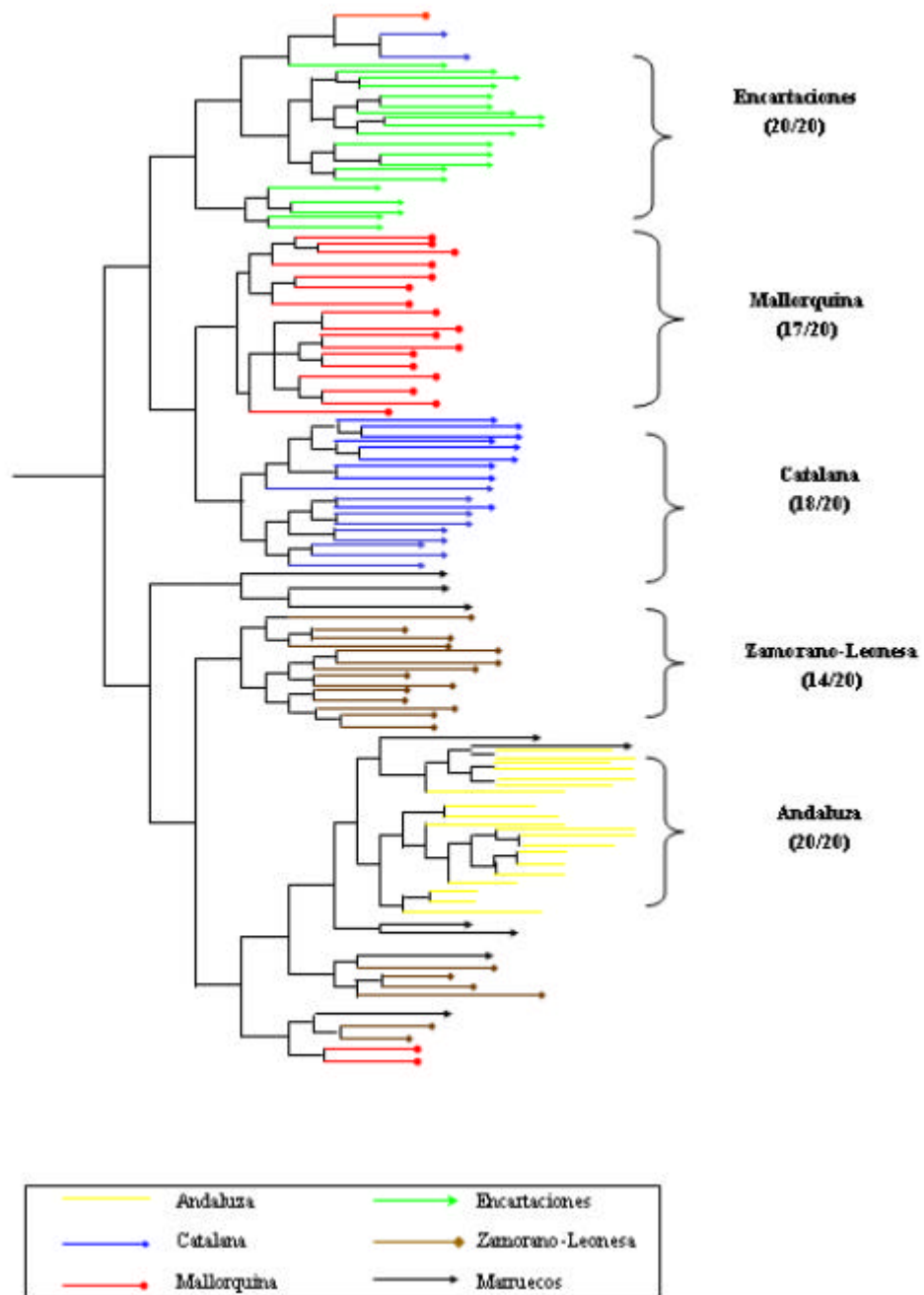


Figura 16. Dendrograma NJ construido a partir de la distancia de los alelos compartidos entre 109 individuos de las cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. Los números a la derecha indican la fracción de individuos de la raza.

El análisis por *locus*, de forma individual, para la asignación de individuos a raza, mediante el método Bayesiano, mostró valores que

oscilaron entre el 22.81% para el marcador HMS5 y el 51.85% para el AHT5 (Tabla 18).

Discusión

Se han mostrado tres diferentes métodos de estudio de la variabilidad genética de las razas y su representación gráfica: el método de Weitzman, el análisis de componentes principales (PCA) y un árbol NJ con alelos compartidos, así como la asignación de individuos a raza.

La diversidad de Weitzman define la diversidad esperada después de un período dado de tiempo, basada en la probabilidad de extinción de cada elemento de un conjunto considerado. Si n elementos son considerados en peligro de extinción, pueden darse, con una determinada probabilidad, 2^n patrones de supervivencia - extinción y para cada uno de ellos se pueden calcular los resultados de diversidad (Thaon d' Arnoldi y col., 1998).

Tabla 18. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza, estimadas para cada uno de los microsatélites utilizando el método Bayesiano.

Marcador	% Asignación Correcta	Marcador	% Asignación Correcta
AHT4	42.69	HTG10	43.08
AHT5	51.85	HTG15	34.89
HMS2	32.75	HTG4	31.58
HMS3	31.97	HTG6	47.76
HMS5	22.81	HTG7	41.91
HMS6	36.06	VHL20	34.31
HMS7	26.90		

Conociendo las distancias entre cada una de las razas y el estatus de riesgo de un conjunto de ellas, expresado a través de sus respectivas probabilidades de extinción, se podría establecer un orden de prioridad para planificar la conservación. Es así que, con este estudio damos la oportunidad para evaluar la diversidad genética global de un grupo de razas, utilizando la aproximación de Weitzman (1992, 1993).

La Tabla 16 muestra claramente el amplio rango de contribuciones genéticas de cada una de las razas estudiadas, oscilando entre 19.19% (asno de las Encartaciones) a 29.11% (raza Catalana). Basándose en estas distancias (Reynolds y Nei), las razas AND, CAT y ENC suman cerca del 80% de la diversidad total, lo cuál es indicador del potencial valor de estas tres razas locales para ser preservadas y contribuir así al mantenimiento de la biodiversidad.

La pérdida de diversidad causada por la extinción de un conjunto de razas puede predecirse por el sumatorio de los valores ordinales en los nodos que podrían desaparecer a partir del árbol si las razas fuesen excluidas, sin ningún otro cambio. De este modo, podemos apreciar en la tabla 16, y es obvio, que la pérdida de la raza Catalana podría causar una disminución tres ó cuatro veces superior a la producida por la pérdida de las razas Mallorquina o el asno de Encartaciones.

No obstante, los resultados y las decisiones de conservación que se pudieran tomar del análisis de diversidad de Weitzman basadas en distancias genéticas, deben ser tomadas con precaución, ya que recientes estudios parecen indicar que estos métodos podrían ser inapropiadas para la conservación de razas intra-especie, ya que ignoran la variabilidad intra-raza (Caballero y Toro, 2002).

El análisis multivariante de las frecuencias alélicas de los microsatélites (PCA), se ha mostrado como una poderosa herramienta

para revelar la historia evolutiva y la mezcla entre poblaciones filogenéticamente distantes (Schmid *y col.*, 1999; Stahlberger-Saitbekova *y col.*, 2001). Sin embargo, su uso como técnica para discernir las relaciones entre poblaciones filogenéticamente cercanas es más cuestionable (MacHugh *y col.*, 1998).

A pesar que los microsatélites utilizados no mostraron ningún alelo específico de raza que permitiera la simple identificación de la misma y la asignación de cada uno de los individuos a su raza de origen, el árbol NJ de los individuos (Figura 3) mostró muy buena armonía con la estructura genética de la población, dando indicios de que estos marcadores proveen una excelente vía para este tipo de estudios.

En el análisis de los alelos compartidos, de los 100 asnos españoles analizados 89 (89.0%) formaron un grupo discreto y coincidente con la raza de origen de las muestras. La posición de once individuos (11.0%) no está claramente definida en el árbol, así como, el asno de Marruecos, que mostró un importante patrón de desfragmentación. Similares resultados fueron encontrados por Bowcock *y col.* (1994) trabajando con poblaciones humanas. Dentro de cada una de las razas los individuos tienden a formar subgrupos, correspondiéndose en un elevado grado a su fuente de origen subpoblacional (datos no mostrados). Estudios filogenéticos previos, utilizando la distancia de los alelos compartidos entre organismos individuales, revelaron un nivel similar de agrupamiento entre poblaciones a la observada en la Figura 15 (Estoup *y col.*, 1995; MacHugh *y col.*, 1998; Laval *y col.*, 2000).

Más precisamente, utilizando el análisis de asignación de individuos a raza, para calcular la probabilidad de que un animal perteneciera a un raza dada, mostró valores que oscilaron entre 87.93%

y 90.64%, dependiendo si la metodología utilizada fue a partir de simples frecuencias alélicas (Paetkau *y col.*, 1995) o mediante análisis Bayesianos (Rannala y Mountain, 1997), respectivamente (Tabla 17).

Dentro de un programa de conservación, la aparente distintividad o particularidad taxonómica de una raza podría no ser necesariamente el medio de identificación de genes únicos y adaptativos, ya que otras fuerzas, como la selección, podrían estar operando. Por ejemplo, la deriva podría afectar las distancias genéticas entre poblaciones. Por ello, cuando estamos seleccionando razas para ser conservadas debería ser también importante, además de considerar la distintividad taxonómica o la variación entre poblaciones, tener en cuenta otras medidas de variabilidad genética dentro de poblaciones (Blott *y col.*, 1998; Caballero y Toro, 2002). Tales medidas podrían incluirse en un índice de conservación y la población a ser conservada se seleccionaría mediante este índice (Weitzman, 1993).

Para concluir este capítulo, debemos indicar la gran utilidad que tiene la evaluación global de la diversidad (dentro y entre razas) mediante el uso de los marcadores moleculares, ya que esta información es sumamente útil y debería ser tomada en cuenta a la hora de tomar decisiones para poner en práctica planes de conservación.

4. 4 ANÁLISIS MITOCONDRIAL

Antecedentes

En los capítulos anteriores se han presentado los resultados de los análisis del ADN nuclear mediante la utilización de microsatélites en las razas asnales españolas. Las relaciones entre las razas utilizando las distancias genéticas D_A (Nei y col., 1983) y la de Reynolds (Reynolds y col., 1983) mostraron que las cuatro razas asnales de capa negra del Norte de España (Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa) formaban un grupo más o menos sólido, mientras que, la raza Andaluza permanecía en una posición intermedia entre las razas del Norte de España y la del asno de Marruecos (Figura 12), o bien se juntaba con los animales de esta última raza (Figura 13), soportando entonces la hipótesis de sus orígenes a partir de un ancestro común (*E. a. africanus*), aunque con valores bootstrap relativamente bajos, reflejando así una cierta inestabilidad de la agrupación.

Bajo esta incertidumbre se procedió a realizar análisis del ADN mitocondrial de dos regiones conocidas; específicamente, una porción del gen citocromo b y otra del D-loop. Teóricamente, con la utilización de la primera, esperamos encontrar regiones bastante conservadas, mientras que con la región control que comprende el D-loop se espera conseguir suficiente polimorfismo que nos permita discriminar sobre el origen evolutivo de las razas asnales españolas. Para ello, además de las cinco razas asnales previamente descritas (Andaluza, Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa) y la raza Africana (asno de Marruecos), se adicionó al análisis una sexta raza asnal española, oriunda del archipiélago Canario, la raza “Majorera” (MAJ), y otra raza asnal africana de Zimbabwe (ZIM), con el único objetivo de ayudarnos a aclarar aún más las relaciones filogenéticas de estas razas.

Resultados

Citocromo b:

Las 79 secuencias, de 251 pares de bases (pb), de la porción del citocromo b revelaron solamente seis haplotipos en las razas asnales estudiadas (Tabla 19).

Tabla 19. Poblaciones y número de animales secuenciados para el D-loop y el citocromo b, y la frecuencia de haplotipos del citocromo b.

Raza	No. de animales		Frecuencias de los haplotipos del Cit b					
	D-loop	Cit b	SPAN1	SPAN2	SPAN3	SPAN4	SPAN5	SPAN6
Andaluza	20	18	6	10	2			
Catalana	10	12		12				
Encartaciones	11	7		6		1		
Mallorquina	10	7		2		2	2	1
Zamorano-Leonesa	10	7		7				
Majorera	10	10		6	4			
Marruecos	9	7		6		1		
Zimbabwe	11	11		11				
Total	91	79	6	60	6	4	2	1

Se encontraron un total de 19 diferencias nucleotídicas al comparar nuestras secuencias con las del caballo, utilizada esta última como secuencia de referencia (Genbank acceso No. X93337). Dentro de las razas asnales sólo cuatro sitios resultaron ser polimórficos (Tabla 20). De estas posiciones variables el 75% (3/4) correspondieron a mutaciones puntuales del tipo de transiciones y fueron silentes, es

decir, no acarreaban cambios en la composición aminoacídica; confirmando esta vía como la más común de evolución mitocondrial en mamíferos (Vigilant *y col.*, 1991). Solamente dos de los haplotipos (SPAN-4 y SPAN-5) incluyeron sustituciones del tipo de transversiones, afectando ambos en la posición nucleotídica 14592. Así mismo, no se presentó ninguna delección y/o inserción nucleotídica en esta región.

De los haplotipos observados, cabe destacar que el SPAN1 estuvo presente sólo en la raza Andaluza; al igual que SPAN5 y SPAN6 que se presentaron solamente en dos y un individuo de la raza Mallorquina, respectivamente (Tabla 19). El haplotipo SPAN2 fue similar al haplotipo reportado por Xu *y col.* (1996), siendo además este haplotipo el más frecuente en estas poblaciones, seguido del haplotipo SPAN4, que estuvo presente en las razas Encartaciones, Mallorquina y asno de Marruecos.

Tabla 20. Sitios nucleotídicos polimórficos en el citocromo b (haplotipos) observados en 79 asnos españoles y africanos.

Haplotipos	Posición																		
	14418	14421	14448	14457	14469	14472	14481	14496	14502	14517	14535	14553	14559	14571	14592	14604	14616	14622	14629
SPAN1	C	C	C	C	T	C	G	T	C	A	T	A	C	A	A	C	G	T	C
SPAN2*	.	T
SPAN3	.	T	G
SPAN4	.	T	C
SPAN5	.	T	.	.	C	C
SPAN6	C
<i>EQUUS</i> ¹	T	.	A	T	.	T	A	C	T	G	C	T	T	G	C	T	A	C	G

* concordancia con la secuencia de asnos Genbank no. X79547 (*E. asinus*).

¹ Secuencia de caballo extraída del Genbank no. X93337

A partir de los 6 haplotipos del citocromo b se confeccionó un dendrograma NJ. En el mismo se puede apreciar una clara separación de los haplotipos SPAN5 y SPAN6 los cuáles forman un grupo sólido con un 54% de confianza, respecto al resto de los haplotipos, que se van agregando al árbol en ramas únicas (Figura 17).

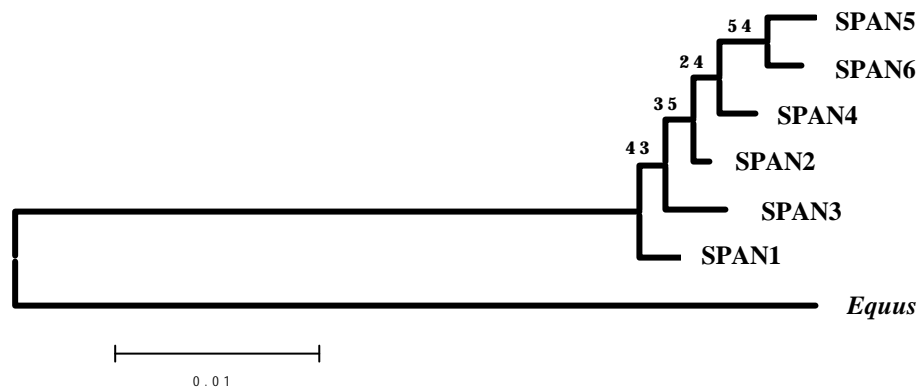


Figura 17. Dendrograma N-J para los 6 haplotipos del citocromo b en cinco razas de asnos españoles, dos africanas y la secuencia de caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones corresponden a los porcentajes sobre 1.000 replicaciones bootstrap.

La Figura 18 muestra la representación grafica de las relaciones evolutivas de los seis haplotipos del citocromo b. Según estos resultados los haplotipos actuales derivarían del haplotipo SPAN1, el cuál, al parecer, sería el más próximo al haplotipo del caballo. La elevada frecuencia y amplia distribución de SPAN2 en todas las razas analizadas, confieren asimismo, una gran ancestralidad a este haplotipo.

Los 79 individuos analizados para el citocromo b se agruparon en tan solo 6 haplotipos diferentes. Como consecuencia de estos pocos haplotipos presentes en estas poblaciones, la diversidad haplotípica osciló entre 0.857 para la raza Mallorquina, que mostró 4 haplotipos en solamente 7 individuos analizados, y 0.000 para las razas Catalana,

Zamorano-Leonesa y Zimbabwe, con un único haplotipo presente en todos los individuos analizados (Tabla 21).

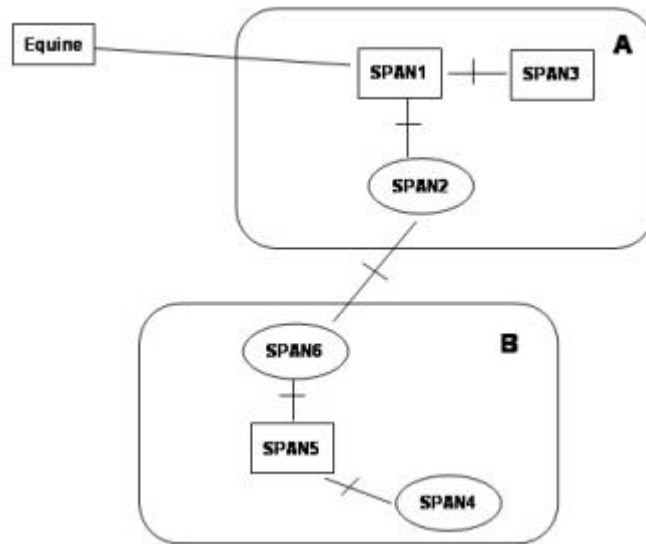


Figura 18. *Minimum spanning tree mostrando los network de interrelación entre los 6 haplotipos del citocromo b en las razas analizadas. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo.*

De la misma forma, los valores de diversidad nucleotídica oscilaron entre 0.005 y 0.000, coincidiendo con el mismo orden de las razas antes descritas, respectivamente. Siendo los valores promedios para la diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (p) de 0.320 y 0.001, respectivamente (Tabla 21).

El valor promedio estimado de divergencia nucleotídica (d_A) entre poblaciones fue de 0.0006 y dichos valores oscilaron entre 0.0023, para el par Mallorquina - Majorera y 0.0000 para los pares Encartaciones - Marruecos y Marruecos - Zimbabwe (Tabla 22). Por otra parte, el valor promedio de divergencia nucleotídica (d_A) entre asnos y caballos fue de 0.0700, unas 100 veces mayor que los valores de divergencia presentes entre las razas asnales.

Tabla 21. Diversidad haplotípica (*h*) y diversidad nucleotídica (*p*) estimada a partir del fragmento de 251 pb del mtDNA (citocromo *b*) para cada una de las razas asnales de origen español y africano.

Razas asnales / Origen	Número de individuos analizados	Número de Haplotipos	Diversidad Haplotípica (<i>h</i> ± DE)	Diversidad Nucleotídica (<i>p</i>)
Españolas				
Andaluza	18	3	0.601 ± 0.080	0.003
Catalana	12	1	0.000 ± 0.000	0.000
Encartaciones	7	2	0.286 ± 0.200	0.001
Mallorquina	7	4	0.857 ± 0.102	0.005
Zamorano-Leonesa	7	1	0.000 ± 0.000	0.000
Majorera	10	2	0.533 ± 0.095	0.002
Africanas				
Marruecos	7	2	0.286 ± 0.200	0.001
Zimbabwe	11	1	0.000 ± 0.000	0.000
Total	79	6	0.320 ± 0.013	0.001 ± 0.000

D-loop:

El análisis de la secuencia de la región D-loop reveló una relativa mayor diversidad genética entre las razas asnales (Tabla 23). Basándonos en el análisis de las 91 secuencias del fragmento del D-loop, se han podido describir 7 haplotipos en las razas asnales españolas y africanas. Al realizar la comparación de estos siete haplotipos con la secuencia del caballo (Ishida y col., 1994) se encontraron un total de 40 sitios variables en un total de 383 nucleótidos secuenciados. Sin embargo, dentro de las muestras de asnos, sólo 13 sitios fueron polimórficos, mientras que 27 sitios adicionales, incluyendo una inserción en el sitio 15540 pb (asignada como 15540b) diferían con la del caballo (Tabla 23).

Tabla 22. Matriz de distancias d_A (divergencia nucleotídica del Citocromo b) entre seis razas asnales españolas y dos africanas.

Razas	Españolas				Africanas		
	CAT	ENC	MALL	ZAM	MAJ	MOR	ZIM
AND	0.0004	0.0004	0.0021	0.0004	0.0006	0.0004	0.0004
CAT		0.0016	0.0004	0.0006	0.0005	0.0017	0.0018
ENC			0.0011	0.0003	0.0006	0.0002	0.0007
MALL				0.0017	0.0023	0.0011	0.0017
ZAM					0.0005	0.0001	0.0002
MAJ						0.0006	0.0006
MOR							0.0000

Cabe destacar que las 13 posiciones variables representaban sustituciones en un simple par de bases, correspondiendo en todos los casos, a mutaciones del tipo de transiciones y al igual que en el citocromo b fueron silentes y sin cambios en la composición de los aminoácidos.

Las frecuencias de los haplotipos en cada una de las poblaciones estudiadas, así como para el total de estas razas, se presentan en la Tabla 24. Cabe destacar que 4 de los 7 haplotipos estuvieron presentes únicamente en una o dos razas y ninguno de los haplotipos se presentó en todas las razas a la vez. Los haplotipos más frecuentes, tanto en las razas españolas como africanas, resultaron ser el ATI1 y ATI3, presentes en 7 y 5 de las 8 poblaciones totales, respectivamente.

Las relaciones entre estos 7 haplotipos (Fig. 19) muestran dos grandes grupos. Uno formado por los haplotipos ATI2, ATI4, ATI6 y

ATI7, presentes sólo en las razas asnales españolas y otro segundo grupo por los haplotipos restantes; este segundo grupo incluyó haplotipos presentes sólo en las razas españolas y haplotipos presentes en ambas poblaciones asnales (españolas y africanas). Se muestra una clara separación de estos grupos dado el elevado valor de bootstrap (82%). La secuencia del caballo fue utilizada como outgroup y permitió darle una orientación evolutiva al árbol. El segundo clúster (ATI1, ATI3 y ATI5) reflejó mucha más amplitud polimórfica que el primer grupo, atribuyéndose esta mayor dispersión a que dichos haplotipos pudieran ser los más ancestrales de la especie asnal (Nei, 1987).

Tabla 23. Sitios nucleotídicos polimórficos en el D-loop y sus respectivos haplotipos presentes en los 91 asnos españoles y africanos analizados.

Posición	Nucleótido							
	Posición							
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111
	55555	55555	55555	55555	55555	55555	55555	55555
	44444	45555	55555	55555	55555	55555	56666	66667
	16889	90111	22334	44444	45566	66789	92344	56690
	19480	23468	18130	13467	83901	59008	91043	22784
	(b)							
Haplotipo								
ATI-1	TCGTC	TTTAA	CGCT?	TAGTC	AACTC	TACAC	GATGA	CAACC
ATI-2	. . A . T	. C G . GT	. G . A .	TG . T .
ATI-3	A
ATI-4	. . A . T	. C G . GT	. . . A .	TG . T .
ATI-5 T .
ATI-6	. . A . T	. C GT	. G . A .	TG . T .
ATI-7	C . A . T	. C GT	. G . A .	TG . T .
Caballo	. T A C .	C . CGT	TATGC	CCACT	GGTCT	GGGGT	. . CAG	T . GTT

^b inserción nucleotídica presente solamente en el Caballo.

Las diversidades haplotípicas y nucleotídicas se muestran en la Tabla 25. La diversidad haplotípica intra-poblacional fue más elevada en las razas Andaluza y Majorera, con valores de 0.737 y 0.689, respectivamente. Los valores más bajos se dieron en las poblaciones de Zimbabwe y Catalana, con valores medios de 0.182 y 0.200, respectivamente; y esto fue debido a que más del 90% de la población mostró únicamente el haplotipo ATI1. Las diversidades haplotípicas y nucleotídicas medias fueron 0.421 y 0.007, respectivamente.

Tabla 24. Frecuencia de los 7 haplotipos del D-loop mitocondrial en las 6 poblaciones de asnos españoles y las dos razas africanas.

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

* Número de animales analizados en cada población.

El *minimum spanning tree* (Figura 20) describe las relaciones evolutivas de los siete haplotipos del D-loop, mostrando un singular patrón de descendencia ancestral. Según esta distribución todos los haplotipos asnales actuales derivarían del haplotipo ATI1, el cuál, al parecer, sería el más próximo al haplotipo del caballo. Más tarde, este haplotipo evolucionaría producto de una sola mutación puntual en los sitios nucleotídicos 15580 y 15698, para dar origen a los nuevos haplotipos ATI3 y ATI5, respectivamente. Un segundo grupo, formado

por los haplotipos ATI4, ATI2, ATI6 y ATI7, emergería más recientemente, después de más de nueve procesos mutacionales que tuvieron lugar en el transcurso del tiempo. En este grupo encontramos a más del 90% de los individuos de la raza Asno de las Encartaciones, de más reciente formación, y algunas posibles líneas maternas de las razas Andaluza, Majorera y Zamorano-Leonesa.

Tabla 25. Diversidad haplotípica (*h*) y diversidad nucleotídica (*p*) estimada a partir del mtDNA D-loop, para cada una de las razas asnales españolas y africanas.

Raza / Origen	Número de individuos	Número de haplotipos	Diversidad Haplotípica (<i>h</i> ± DE)	Diversidad Nucleotídica (<i>p</i>)
<u>Españolas</u>				
Andaluza	20	4	0.737 ± 0.055	0.0169 ± 0.0092
Catalana	10	2	0.200 ± 0.154	0.0006 ± 0.0009
Encartaciones	11	3	0.345 ± 0.172	0.0069 ± 0.0045
Mallorquina	10	2	0.467 ± 0.132	0.0014 ± 0.0015
Zamorano-Leonesa	10	2	0.356 ± 0.159	0.0124 ± 0.0074
Majorera	10	3	0.689 ± 0.104	0.0159 ± 0.0092
<u>Africanas</u>				
Marruecos	9	2	0.384 ± 0.164	0.0012 ± 0.0013
Zimbabwe	11	2	0.182 ± 0.144	0.0007 ± 0.0008
Total	91	7	0.421 ± 0.005	0.0070 ± 0.000

Estimando el tiempo de divergencia:

La distancia d_A promedio entre asnos y caballos fue de 0.5375. Utilizando una tasa evolutiva media, estimada para la región mitocondrial del D-loop en el género *Equus*, de $2-4 \times 10^{-8}$ sustituciones por sitio y año (Ishida y col., 1995), el tiempo de divergencia estimado

entre estas dos especies correspondería a \cong 9 millones de años; sin embargo, para ello debemos considerar que la tasa de evolución es similar para asnos y caballos.

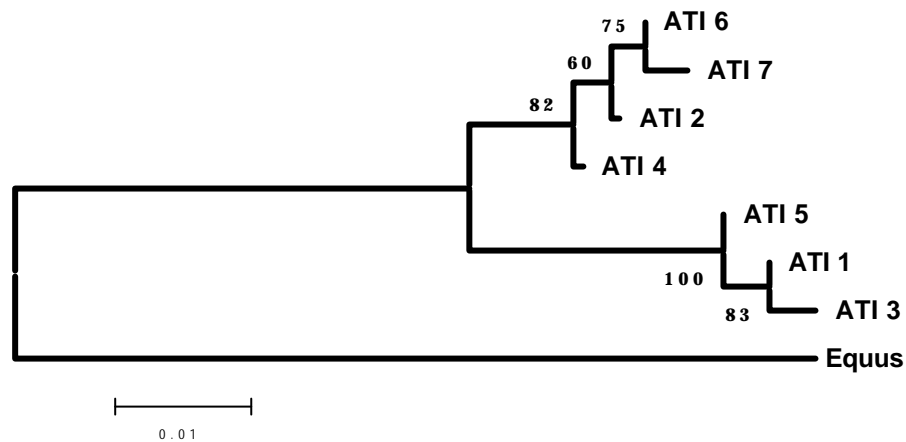


Figura 19. Dendrograma N-J para los 7 haplotipos del D-loop en seis razas de asnos españolas, dos africanas y la secuencia de caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan el porcentaje de 1.000 replicas bootstrap

Las estimaciones de divergencia nucleotídica (d_A) entre las razas asnales (Tabla 26) y el árbol NJ derivado de ésta (Figura 21), muestra que las razas se agrupan en dos clusters: uno formado por el Asno de las Encartaciones y otro por el resto de las razas. Una distribución similar de estas razas se aprecia en el árbol derivado de la sustitución nucleotídica (d_{xy}) entre poblaciones (Figura 22). Estas distribuciones son totalmente incongruentes con la distribución geográfica de las razas. La clusterización de la raza Asno de las Encartaciones es claramente excepcional. De forma similar, la agrupación de las dos razas africanas con las razas CAT y MALL también es bastante incongruente, al menos desde el punto de vista geográfico. La Tabla 26 muestra los valores de diferenciación poblacional (θ_{ST}), en la que cabe destacar que 18 de las 28 combinaciones (64.28%) presentaron valores de significación estadística (P valor) menores al 5%.

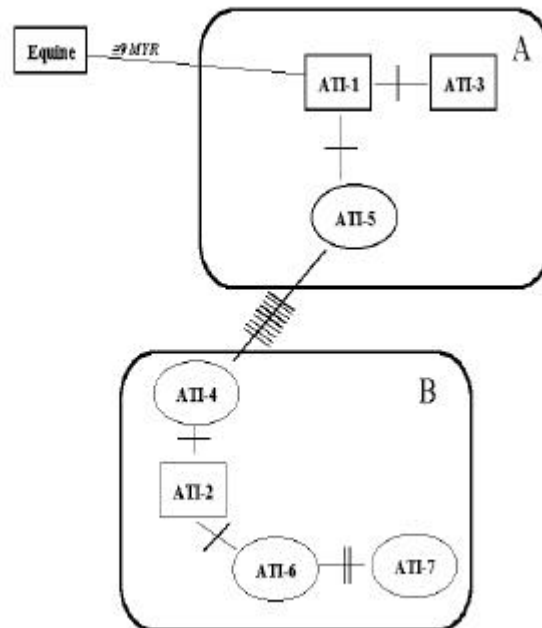


Figura 20. Minimum spanning tree mostrando los network de interrelación entre los 7 haplotipos del D-loop en las razas analizadas. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo.

DISCUSIÓN

En este estudio presentamos las secuencias del mtDNA del citocromo b y del D-loop de asnos españoles, lo que representa un primer reporte de este tipo de datos, analizándose además en conjunción con las secuencias de dos razas asnales africanas (Marruecos y Zimbabwe). A grandes rasgos las secuencias, tanto del citocromo b como del D-loop, no son tan distintas en las seis razas asnales españolas y las dos africanas.

Las relaciones filogenéticas de los seis haplotipos del citocromo b, encontradas en las razas asnales españolas (Fig. 17), no nos definen un patrón claro de relaciones, producto de un bajo valor de soporte de los nodos (bootstrap). Sin embargo, los haplotipos SPAN1 y SPAN2 parecen ser claramente los más ancestrales, el primero por ser el más próximo

al caballo (Figura 18) y el segundo por estar presente en todas las razas evaluadas tanto españolas como africanas (Tabla 19).

Tabla 26. Matriz de distancias d_A (divergencia nucleotídica del D-loop entre poblaciones, arriba de la diagonal) y diferenciación poblacional F_{ST} (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas y africanas.

<i>Razas</i>	<i>Españolas</i>					<i>Africanas</i>		
<i>Origen</i>	<i>AND</i>	<i>CAT</i>	<i>ENC</i>	<i>MALL</i>	<i>ZAM</i>	<i>MAJ</i>	<i>MOR</i>	<i>ZIM</i>
AND	-----	.0065	.0076	.0067	.0013	-.0009	.0065	.0064
CAT	.3744***	-----	.0260	-.0000	.0008	.0041	.0000	.0000
ENC	.4281***	.7218***	-----	.0260	.0152	.0099	.0260	.0260
MALL	.2788*	.0000	.5847***	-----	.0010	.0043	.0012	.0000
ZAM	.2672*	.0080	.6497***	.0657	-----	.0000	.0009	.0008
MAJ	.0000	.4578***	.4881***	.3282**	.3305**	-----	.0042	.0041
MOR	.2992*	.0000	.6270***	.0000	.0153	.3568**	-----	-.0003
ZIM	.3889***	.0000	.7342***	.0408***	.0181	.4772***	.0000	-----

Media d_A Asno-Caballos = 0.5375;

*** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05

En conjunto tanto la filogenia a partir del citocromo b, como la del D-loop, así como, las relaciones genéticas entre las razas basadas en las divergencias (d_A) y substituciones (d_{XY}) nucleotídicas resultaron ser bastante concidentes, aunque no presentan demasiada concordancia con las relaciones derivadas de los estudios previos con microsatélites. Posiblemente, las explicaciones más coherentes para estos hallazgos estén relacionadas con la posible mezcla de haplotipos entre estas razas, producto de las migraciones génicas (intercambio de reproductores) que han ocurrido entre estas poblaciones durante

muchos años. Los efectos del tipo “cuellos de botella” o “efectos fundadores” serían la explicación más plausible para comprender la inesperada y marcada separación existente entre la raza ENC con respecto a las demás razas españolas. El reducido número de individuos analizados podría ser otra causa que explicara estas discrepancias, tal y como ha sido reportado por Lau y col. (1998) en similares trabajos en poblaciones de búfalos.

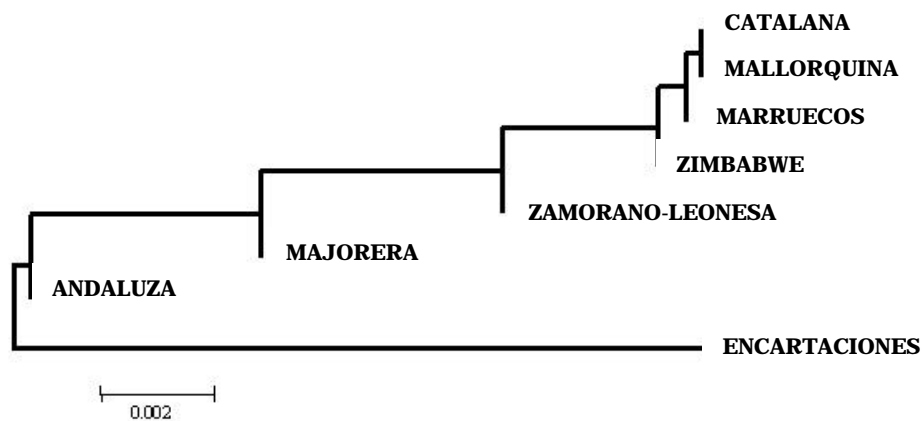


Figura 21. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en la divergencia nucleotídica (d_A) entre las poblaciones.

La inesperada agrupación de las razas africanas (Marruecos y Zimbabwe) con la CAT y MALL se debe principalmente a la elevada frecuencia en estas razas del haplotipo ATI1, tal como lo habíamos comentado con anterioridad (Tabla 24), y es probablemente una función del reducido tamaño de muestra estudiado; de las migraciones génicas que hayan podido tener lugar (principalmente con el asno de Marruecos), y el reducido número de secuencias mitocondriales analizadas (citocromo b y D-loop), por lo que nosotros consideramos que el árbol basado en la distancia con la información de los microsatélites nos da una representación más aproximada a las verdaderas relaciones genéticas entre estas razas.

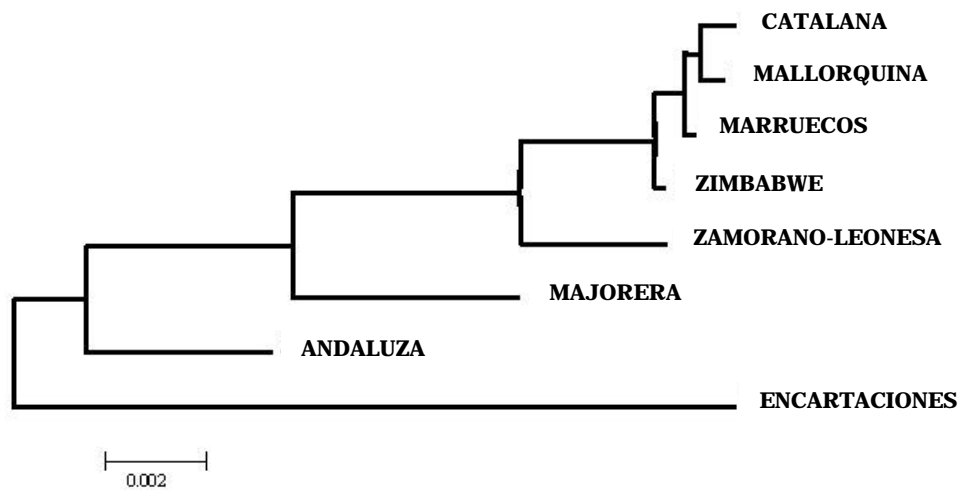


Figura 22. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en el número medio de sustituciones nucleotídicas entre poblaciones (d_{XY}).

La pérdida de una sólida estructura filogeográfica (producto por ejemplo de un elevado flujo genético entre las poblaciones) entre las razas españolas y africanas, puede estar influenciada por la historia de estas poblaciones, sobre todo si nos centramos y recordamos los constantes movimientos poblacionales tanto humanos como de animales que han caracterizado estas regiones, así como el intercambio comercial que se ha vivido entre ellas (Romagosa, 1959).

Si nos centráramos única y exclusivamente en las teorías difiléticas (citadas por varios autores) esperaríamos haber obtenido haplotipos privados o únicos en las razas europeas y que no estuviesen presentes en las razas africanas, y viceversa, que fueran capaces de indicarnos un claro doble origen de los asnos domésticos actuales, cosa que no pudimos detectar a partir de estos fragmentos de ADN mitocondrial tal y como lo hicieron en otras especies domésticas mediante estudios similares al nuestro: Hiendleder *y col.* (1998) en el origen de la oveja doméstica; Mannen *y col.* (1998) en el bovino japonés y Guiffra *y col.* (2000) con el cerdo doméstico.

Por tanto, e interpretando única y exclusivamente los resultados obtenidos en nuestro análisis de mtDNA, estos tenderían a apoyar la teoría monofilética acerca del origen de los asnos, sobre todo la de Darwin (citado por Salvans y Torrens, 1959), quién postula un origen único a partir de un tronco común Africano.

Otro hallazgo importante de estos análisis, es la estrecha similitud o relación que presentan las razas AND y MAJ. Ambas razas comparten la gran mayoría de haplotipos, tanto de citocromo b como de D-loop, y poseen dos haplotipos privados, (SPAN3 y ATI5) presentes únicamente en estas dos razas. Estos resultados nos sugieren un posible origen ancestral común o un gran intercambio de reproductores entre ellas.

A pesar que se ha reportado que raramente existen haplotipos únicos y exclusivos de una raza, de forma similar a lo que ocurre con los microsatélites, los cuáles muestran que aunque las razas no presenten alelos únicos si que pueden, sin embargo, ser claramente diferenciadas por las frecuencias alélicas o haplotípicas presentes (Vila *et al.*, 1999), si que encontramos haplotipos únicos en las razas Mallorquina (haplotipos SPAN5 y SPAN6, con una frecuencia superior al 40%) y Encartaciones (haplotipos ATI6 y ATI7, con una frecuencia superior al 90%). La explicación más coherente a estos hallazgos puede estar relacionada, en primer lugar, a su particular hábitat, lo que se expresa básicamente como un aislamiento reproductivo y geográfico, y en segundo lugar, a posibles efectos de “cuellos de botella”, que ha hecho que ciertos haplotipos raros en estas poblaciones hayan adquirido una elevada frecuencia en la población a partir de muy pocos reproductores.

El tiempo de divergencia evolutiva entre los asnos y los caballos se ha estimado en al menos unos 9 millones de años, siendo este valor

similar al citado por Xu y col. (1996) y mucho mayor que el reportado a partir de estudios paleontológicos (Lindsay y col., 1980) o a través de RFLPs (Goerge y Ryder, 1986) que lo cifran de 3 a 5 millones de años y más aún de los 1.5 millones de años a partir de mtDNA reportado por Kim y col. (1999). Este rango de variación, presente en las estimaciones de los tiempos de divergencia, se debe probablemente a las diferentes tasas de evolución de los genes o regiones estudiadas, así como a la propia secuencia utilizada (Takahata y Nei, 1985). Sin embargo, cabe destacar que todas las secuencias de los asnos mostraron una distancia similar con respecto a la del caballo (0.521 – 0.552), indicándonos una constante tasa interna; algo similar a lo reportado entre la divergencia de caballos y asnos (Kim y col., 1999) y entre razas bovinas con respecto a su divergencia con el bisón (Loftus y col., 1994).

A modo de conclusión nuestros resultados soportan las siguientes hipótesis: en primer lugar, que el actual estado de las razas asnales españolas parece corresponder al producto de una mezcla de líneas maternas debido posiblemente a un elevado flujo de genes entre las mismas; y en segundo lugar, que el origen evolutivo del asno español podría derivarse de un único y común tronco ancestral con las razas africanas estudiadas.

Estudios adicionales de la variación del mtDNA de otros genes o regiones mitocondriales, además de estudios de huesos fósiles, así como de otras razas africanas y mediterráneas, podrían ayudar a un mayor y mejor entendimiento acerca de las relaciones evolutivas de los asnos españoles.

Para finalizar, y a manera de resumen sobre este particular, podemos indicar que con este capítulo proveemos la primera evidencia molecular que soporta las relaciones filogenéticas y el posible origen de las razas asnales españolas.