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

Programa de Doctorado de Producción Animal

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

Memoria presentada por

José Atilio Aranguren Méndez

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Bellaterra, Abril del 2002

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

DEDICATORIA

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN

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

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

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

ÍNDICE GENERAL

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

Porcentaje de *loci* polimórficos. 32
Número medio de alelos por *locus*. 33
Heterocigosidad. 33
Índice de contenido polimórfico (PIC). 34
Probabilidad de Exclusión (PE). 35
Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). 35
1.8 Análisis de la estructura de la población. 36
1.9 Diferenciación Genética. 38
Distancias genéticas. 38
Métodos de agrupamientos o algoritmos. 43
Análisis de remuestros. 44
Diversidad de Weitzman. 45
1.10 Asignación de individuos a raza. 46
1.11 Análisis del ADN mitocondrial. 49

2.- OBJETIVOS 52
Objetivo generales. 53
Objetivos específicos. 53

3.- MATERIALES Y MÉTODOS 55
3.1 Material biológico. 56
3.2 Extracción de ADN. 56
3.3 Marcadores microsatélites. 59
3.4 Condiciones de la PCR. 60
3.5 Análisis estadísticos. 62
Variabilidad genética. 62
Estructura de la población. 63
Distancias y relaciones filogenéticos. 64
Asignación de individuos a raza. 65
3.6 Análisis de ADN mitocondrial. 66
Individuos muestreados. 66

PCR y secuenciación de la región D-loop. 67
PCR y secuenciación de la región del citocromo b. 69
Análisis estadísticos 69
Diversidad molecular 69
Minimum spanning tree 73

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 74
4.1 Variación genética. 75
4.2 Estructura de la población. 85
4.3 Relaciones filogenéticas y asignación de individuos a raza. 95
4.4 Análisis mitocondrial. 111

5.- DISCUSIÓN GENERAL. 129

6.- CONCLUSIONES. 137

7.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA. 140

8.- ANEXOS. 157

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

TABLA 1. Número de razas de cada una de las 7 principales especies de animales domésticos que están registradas en la FAO (FAO Global Databank for Animal Genetic Resources) y las estimadas en peligro de extinción. 4

TABLA 2. Categorías de las poblaciones de animales domésticos. 6

TABLA 3. Principales tipos de marcadores de ADN. 21

TABLA 4. Descripción poblacional de las 5 razas de asnos españoles analizadas. 58

TABLA 5. Secuencias de los "*primer*" utilizados y su ubicación en el mapa equino 61

TABLA 6. Razas asnales, número de individuos analizados para la secuenciación de la región del D-loop y el citocromo b. 66

TABLA 7. Número total y rango de los alelos observados, heterocigosidad promedio H_S y H_T, coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}), PIC y PE en las razas asnales españolas. 77

TABLA 8. Tamaño muestral, número de alelos por *locus* y heterocigosidades media (± error estándar) a partir del análisis de 13 *loci* microsatélites en las razas asnales españolas. 79

TABLA 9. Análisis de los F-estadísticos para cada uno (†) de los 13 microsatélites polimórficos en cinco razas de asnos españoles y (‡) media estimada para estas razas. 87

TABLA 10. Estructura genética de las razas asnales españolas a través del análisis de sus subpoblaciones. 88

TABLA 11. Análisis de los F-estadísticos a nivel jerárquico y componentes de varianza a dos niveles de subdivisión en las razas asnales españolas 89

TABLA 12. Consanguinidad global estimada ($F \cong F_{IT}$) a nivel jerárquico, en las razas asnales españolas. 90

TABLA 13. Estimaciones F_{ST} (debajo de la diagonal), como medida de distancia genética entre las poblaciones de asnos españoles, el número efectivo de migrantes por generación (N_em) (arriba de la diagonal). 92

TABLA 14. Matriz de distancia genética D_A entre las cinco razas de asnos españoles, el asno de Marruecos y la raza equina Merens. 97

TABLA 15. Distancias genéticas de Reynolds (arriba de la diagonal) y estándar de Nei (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas. 101

TABLA 16. Análisis de Weitzman en las razas asnales españolas. 103

TABLA 17. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza a partir de 13 microsatélites, estimados mediante distintas metodologías. 105

TABLA 18. Porcentaje de correcta asignación de individuos a raza, estimado por cada uno de los microsatélites, utilizando el método Bayesiano. 107

TABLA 19. Poblaciones y número de animales secuenciados para el D-loop y el citocromo b, y la frecuencia de haplotipos del citocromo b. 113

TABLA 20. Sitios nucleotídicos polimórficos en el citocromo b (haplotipos) observados en 79 asnos españoles y africanos. 114

TABLA 21. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) estimada a partir del fragmento de 251 pb de mtDNA (citocromo b) para cada una de las razas asnales de origen español y africano. 117

TABLA 22. Matriz de distancia d_A (divergencia nucleotídica del citocromo b) entre seis razas asnales españolas y dos africanas. 118

TABLA 23. Sitios nucleotídicos polimórficos en el D-loop y sus respectivos haplotipos presentes en los 91 asnos españoles y africanos analizados. 119

TABLA 24. Frecuencia de los 7 haplotipos del D-loop mitocondrial en las 6 poblaciones de asnos españoles y las dos razas africanas. 120

TABLA 25. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) estimada a partir del mtDNA D-loop, para cada una de las razas asnales españolas y africanas. 121

TABLA 26. Matriz de distancias d_A (divergencia nucleotídica del D-loop entre poblaciones, arriba de la diagonal) y diferenciación poblacional θ_{ST} (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas y africanas. 124

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

FIGURA 1. Evolución del censo asnal y mular en España. 10

FIGURA 2. Principal distribución de las razas asnales españolas. 13

FIGURA 3. Microsatélites, un ejemplo de un di-nucleótido A-C(n). 22

FIGURA 4. ADN mitocondrial del asno doméstico. 50

FIGURA 5. Localización geográfica de las razas asnales españolas. 57

FIGURA 6. Localización geográfica de las subpoblaciones asnales españolas y su código de referencia. 59

FIGURA 7. Electroferograma de la leyenda de los microsatélites (ABI 310). 62

FIGURA 8. Región D-loop, entre los nucleótidos 15387 y el 15769, secuenciada en las razas asnales. 68

FIGURA 9. Región citocromo b, entre los nucleótidos 14391 y el 14703, secuenciada en las razas asnales. 70

FIGURA 10. Modelo de substitución nucleotídica de Tamura y Nei. 72

FIGURA 11. Frecuencias alélicas y su distribución en las poblaciones asnales. 81

FIGURA 12. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos, y la raza equina Merens (outgroup), utilizando la distancia D_A y el algoritmo NJ. Los valores indican el porcentaje de replicaciones bootstrap entre los grupos. 98

FIGURA 13. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y el *E. caballus* usado como outgroup, utilizando la distancia de Reynolds y el algoritmo NJ. Los números en los nodos corresponden a los Porcentajes de 1000 replicaciones bootstrap. 99

FIGURA 14. Dendrograma de las relaciones establecidas por el método de Weitzman, utilizando la distancia estándar de Nei, entre las cinco razas asnales españolas. 102

FIGURA 15. Análisis de los componentes principales a partir de las frecuencias de los 13 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. 104

FIGURA 16. Dendrograma NJ construido a partir de la distancia de los alelos compartidos entre 109 individuos de la cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. Los números a la derecha indican la fracción de individuos de la raza. 106

FIGURA 17. Dendrograma NJ para los 6 haplotipos del citocromo b en seis razas de asnos españoles, dos africanas y la secuencia del caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan a los porcentajes sobre 1000 replicaciones bootstrap. 115

FIGURA 18. *Minimum spanning tree* mostrando los network de interrelación entre los 6 haplotipos del citocromo b. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo. 116

FIGURA 19. Dendrograma NJ para los 7 haplotipos del D-loop en seis razas de asnos españolas, dos africanas y la secuencia del caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan el porcentaje 1.000 replicaciones bootstrap. 122

FIGURA 20. *Minimum spanning tree* mostrando los network de interrelación entre los 7 haplotipos del D-loop. Las líneas entre los haplotipos, entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo. 123

FIGURA 21. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas , basadas en la divergencia nucleotídica (d_A) entre las poblaciones. 125

FIGURA 22. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en el número medio de substituciones nucleotídicas entre poblaciones (d_{XY}). 126

ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Secuencias haplotípicas del citocromo b en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al *primer* CITB-F. 158

Anexo 2. Secuencias haplotípicas del D-loop en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al *primer* DONK-A. 159

Anexo 3. Distancias F_{ST} entre las subpoblaciones de los asnos Españoles (en negritas distancias dentro de razas). 160

Anexo 4. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. Manuscrito publicado en la Revista *Genetics., Selection and Evolution* 33 (2001) 433-442. 161

Anexo 5. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. Manuscrito enviado a publicar a la revista *Heredity*. 172

Anexo 6. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breed. Manuscrito enviado a publicar a la revista *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 194

Raza Catalana

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 EL PROBLEMA GENERAL DE LA CONSERVACIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

* Estimado a partir de las de razas con datos de tamaño de población. Fuente: Barker, 1999.

La disminución en el número mundial de razas está afectando de forma dramática a todas o casi todas las especies, surgiendo la controversia de si se tienen o no que conservar (Maijala *y col.*, 1984; Land, 1986), Al perderse las razas se pierden los genes que llevan, y el

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

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

1.2 ORIGEN DE LOS ASNOS

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

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

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

Tabla 2. Categorías de las poblaciones de animales domésticos.

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

Fuente: Anonymous, 1992 (FAO).

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 LAS RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS

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

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

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

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

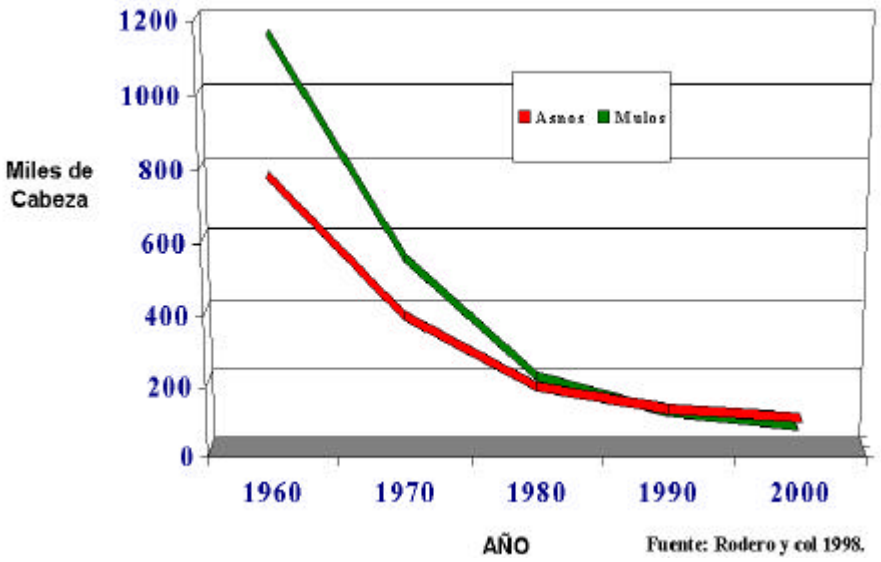


Fig. 1. Evolución del censo asnal y mular en España.

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

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

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

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

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

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

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

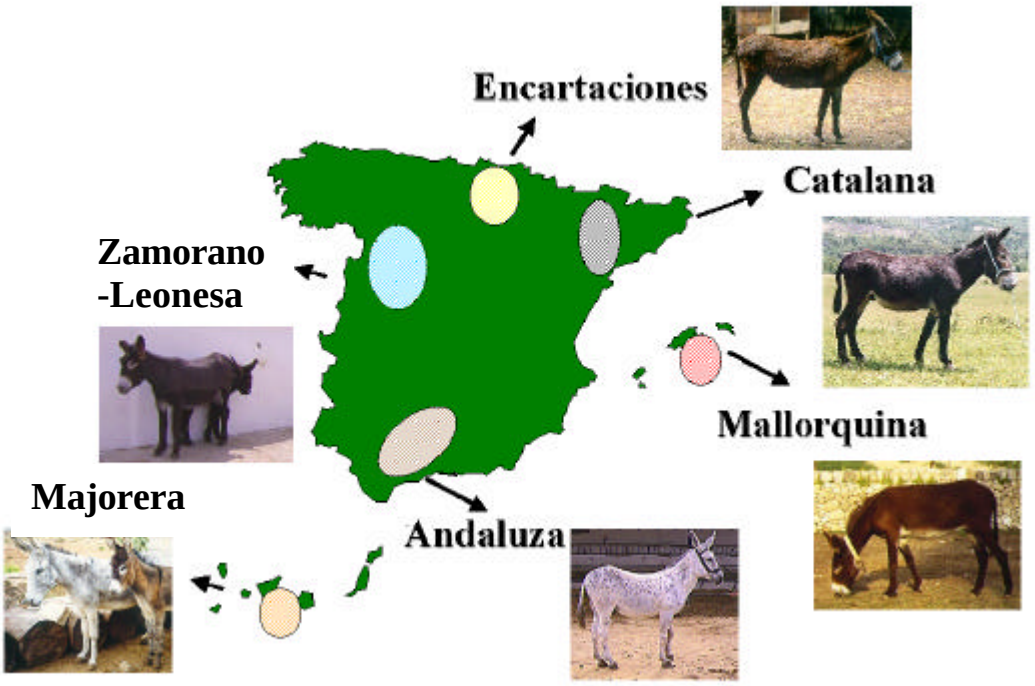


Figura 2. Principal distribución de las razas asnales españolas.

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

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

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

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

I.- Fase:

Descripción general de la población: esta fase comprende:

1.a. Recopilación de datos preliminares y de interés general.

i. Localización geográfica de las poblaciones

ii. Origen filogenético

iii. Evolución censal y situación actual

iv. Posibles causas de regresión racial y tendencia futura

v. Perspectivas futuras de la raza y razones válidas para la conservación (estudios socioeconómicos que resalten la importancia de esta (s) raza (s) en la zona

vi. Características raciales, productivas, reproductivas, ecológicas, etc., de interés

2.a. Inventario censal, registro e identificación individual electrónica

II. Fase:
Caracterización racial

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

2.b. Caracterización hematológica y bioquímica clínica

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

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

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

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

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

III. Fase:
Programa de conservación genética "i*n situ*"

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

IV. Fase:
Programa de conservación genética "e*x situ*"

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

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

V. Fase

Programa de mejora genética

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

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

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

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

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

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

1.5 VARIACIÓN GENÉTICA Y MÉTODOS DE DETECCIÓN

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

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

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

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

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

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)

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

RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*)

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

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

Tabla 3. Principales tipos de marcadores de ADN

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

Modificado de Dodgson *y col.*, 1997.

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

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

Microsatélites o STRs (*short tandem repeats*)

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

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

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

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

1.6 MARCADORES MICROSATÉLITES

1.6.1 APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES

Identificación individual y pruebas de paternidad

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

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

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

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

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

Mapas genéticos y genómica comparativa

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

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

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

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

Estudios de genética poblacional

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

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

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

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

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

1.6.2 MUTACIÓN, ALELOS NULOS Y HOMOPLASIA

Mutación

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

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

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

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

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

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

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

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

Alelos nulos

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

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

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

Homoplasia

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

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

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

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

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

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

1.7 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

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

Porcentaje de *loci* polimórficos:

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

Número medio de alelos por *locus*:

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

Heterocigosidad (H):

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

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

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

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

$$H_E = 1 - \Sigma\ pi^2$$

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

$$H_E = \Sigma\ pi\ (1 - pi)$$

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

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

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

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

Índice de contenido de polimórfico (PIC):

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

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^{n} pi^2) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i-1}^{n} 2\ pi^2\ pj^2$$

Donde pi ...pn son las frecuencias de los *n* alelos.

Probabilidad de exclusión (PE):

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

$$PE = pi - 2\ pi^2 + pi^3 + 2\ pi^4 - 3\ pi^5 - 2\ (pi^2)^2 + 3\ pi^2\ pi^3$$

ó

$$PE = pi\ (1-pi)^2 - (pi\ pj)^2 \times [4 - 3\ (pi + pj)];$$

donde i > j y pi ...pn son las frecuencias de los alelos.

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

Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W):

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

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

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

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

1.8 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

donde

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

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

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

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

1.9 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

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

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

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

Distancias genéticas:

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

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

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

$$D_S = -\ln [Jxy / \sqrt{Jx\ Jy}]$$

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

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

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

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

En este caso la esperanza de Dm es conocida como

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

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

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

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

4.- Distancia de Rogers' (1972):

$$D_R = (1/r) \sum_{j}^{r} \sqrt{ \left[\sum_{i}^{mj} (x_{ij} - y_{ij})^2 / 2 \right] }$$

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

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

$$Cp = \sum_{j}^{r} \sum_{i}^{m_j} | xij - yij | / (2r)$$

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

$$D_C = (2 \pi r) \sum_{j}^{r} \sqrt{} \; 2 (1 - \sum_{i}^{mj} \sqrt{} \; x_{ij} \, y_{ij})$$

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

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

$$D_A = (1 / r) \sum_{j}^{r} [\; 1 - \sum_{i}^{mj} \sqrt{} \; (x_{ij} \, y_{ij}) \;]$$

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

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

$$(\delta\mu)^2 = \sum_{j}^{r} (\mu x_j - \mu y_j)^2 / r;$$

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

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

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

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

Métodos de agrupamiento o algoritmos:

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

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

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

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

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

Análisis de remuestreos:

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

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

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

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

Diversidad de Weitzman

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

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

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

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

1.10 ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A RAZA

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

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

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

Métodos basados en probabilidades:

a.- Método de frecuencias:

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

La asignación por este método se realiza en tres etapas:

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

b.- Método Bayesiano:

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

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

ó

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

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

Métodos basados en distancias:

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

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

1.11 ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL

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

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

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

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

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

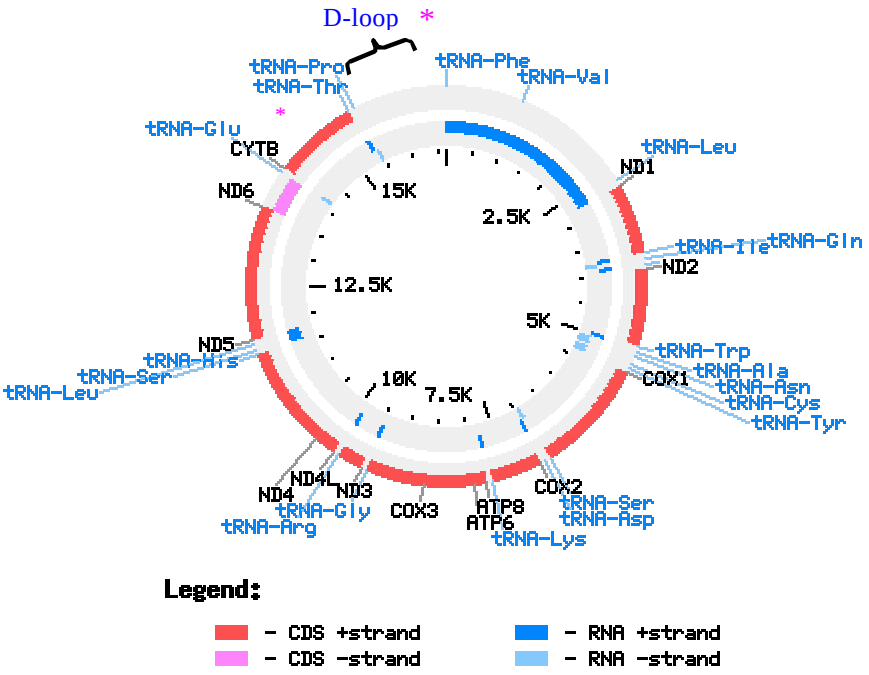


Figura 4. ADN mitocondrial del asno doméstico. ***Fuente: Genebank***

* ***Regiones estudiadas***

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

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

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

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

Razas Andaluza y Catalana

2. OBJETIVOS

Generales:

El principal objetivo de esta tesis es el de sentar las bases de los futuros programas de conservación y mejora de las razas asnales españolas, para así mantener la máxima cantidad de diversidad genética con el mínimo incremento de consanguinidad posible por generación. En esta tesis se plasman los estudios genéticos (nuclear y mitocondrial) realizados en dichas razas. No obstante, el proyecto original es más amplio y contempla además: la caracterización fenotípica (morfológica) de las razas, calculando para ello una serie de índices zoométricos; la caracterización hematológica y bioquímica clínica, que permita establecer los rangos de referencia y de normalidad en esta especie, y la caracterización citogenética (polimorfismos cromosómicos).

Específicos:

- Estudiar los niveles de variabilidad genética de las poblaciones, a través del análisis de marcadores de ADN del tipo microsatélite, originalmente diseñados para caballos.

- Identificación genética de los individuos, tanto para la programación de apareamientos y análisis de paternidades, como para la posible asignación de individuos a raza; todo ello enmarcado dentro de la gestión de los futuros programas de conservación.

- Analizar la estructura genética de las poblaciones, que nos permita además obtener valores promedio de consanguinidad en las mismas.

- Analizar el grado de divergencia genética que existe entre las razas: estudio de las relaciones filogenéticas.

- Estudiar el polimorfismo genético del ADNmt, y analizar la variabilidad genética a este nivel.

Raza Mallorquina

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ***Material biológico****:*

Para los estudios con microsatélites (ADN nuclear), el número de individuos y razas involucradas correspondieron a: 87 asnos Andaluces (AND), 140 Catalanes (CAT), 104 Mallorquines (MALL), 74 asnos de las Encartaciones (ENC) y 108 Zamorano-Leoneses (ZAM). La principal área de distribución de estas razas se aprecia en la Figura 5. Adicionalmente se analizaron 9 individuos de la raza asnal de Marruecos (MOR), que nos sirvió como población de referencia debido a que son genuinos representantes del *Equus asinus africanus,* y 24 caballos de la raza Merens, los cuáles fueron utilizados como población "outgroup". Para el análisis jerárquico de las poblaciones de asnos españoles se procedió a dividir las 5 razas en 16 subpoblaciones, de acuerdo a criterios geográficos y/o áreas de influencia de ciertos criadores. Esta subdivisión "a priori" de las razas en subpoblaciones se puede apreciar en la Tabla 4 y Figura 6.

3.2 ***Extracción de ADN:***

El ADN genómico se extrajo a partir de glóbulos blancos (leucocitos) de muestras sanguíneas obtenidas de los 513 asnos españoles antes descritos y siguiendo para ello la metodología de Ausubel *y col*.(1987). El método consistió en sucesivos lavados de 200 µl de sangre entera con 500 µl de un tampón salino TE (Tris-HCl 10 mM y 1 mM EDTA, pH=8).

Después de 3 ó 4 lavados con TE, el precipitado de glóbulos blancos fue resuspendido en 100 µl de un tampón de digestión K (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Tween 20 0.5%) el cuál contenía un detergente, capaz de lisar la membrana de los leucocitos, y 1 µl de la

enzima proteinasa K (10 mg/ml) que impide que las nucleasas citoplasmáticas degraden el ADN, incubándose posteriormente durante 1 hora a 57 ºC.

Figura 5. Localización geográfica de las razas asnales españolas.

Una vez culminada la incubación, se separó el ADN de las proteínas y demás componentes del lisado celular, añadiendo 400 µl de una mezcla de solventes orgánicos (fenol:cloroformo:alcoholisoamílico en una proporción 25:24:1). Esta mezcla se agitó y centrifugó durante 5 min. a 13.000 rpm, quedando el ADN resuspendido en la fase acuosa y las proteínas y demás componentes en la fase orgánica. A este producto, extraído del solvente, se le añadieron 20 µl (1/10 volúmenes) de cloruro sódico 2 M y 500 µl (2.5 volúmenes) de etanol, siendo la finalidad de este último la de eliminar las sales que contaminan el precipitado. El ADN precipita de manera visible y forma un "algodón" el cuál es transferido a un eppendorf que contiene 500 µl de etanol al

70%, se centrífuga y se retira el sobrenadante. Finalmente, el precipitado de ADN se resuspende con TE o agua mili-q en un volumen que oscila entre 50 y 200 µl y se guarda hasta su posterior análisis a -4 ºC.

Tabla 4. Descripción poblacional de las 5 razas de asnos españoles analizadas.

Raza	*Número*	*Subpoblación*	*Número de animales muestreados*
Andaluza	**87**	**AND1**	**33**
		AND2	**28**
		AND3	**26**
Catalana	**140**	**CAT1**	**55**
		CAT2	**71**
		CAT3	**14**
Mallorquina	**104**	**MALL1**	**24**
		MALL2	**42**
		MALL3	**17**
		MALL4	**21**
Encartaciones	**74**	**ENC1**	**22**
		ENC2	**23**
		ENC3	**29**
Zamorano-Leonesa	**108**	**ZAM1**	**58**
		ZAM2	**22**
		ZAM3	**28**
Asno de Marruecos (*E. a. africanus*)	**9**		**9**
Merens (E. caballus)*	**24**		**24**

* Utilizado como outgroup

3.3 **Marcadores microsatélites:**

De los 15 microsatélites utilizados para el análisis, 12 de ellos se encuentran incluidos en un kit comercial para paternidades en caballos (Stocks-Marks TM for Equine Paternity; Applied Biosystems División, Perkin Elmer Cetus; Norwalk, CT, USA), y correspondieron a los microsatélites: AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, y VHL20

Los otros 3 restantes (HMS1, HMS5 y HTG15) fueron obtenidos de la literatura, considerando para su elección que amplificasen exitosamente en caballos y que fuesen muy polimórficos (Breen *y col*., 1994). Para hacerlos funcionales en las muestras de asnos se realizaron ligeras modificaciones en las condiciones de PCR. Las secuencias de los "*primers*", así como otras características de los mismos, se aprecian en la Tabla 5.

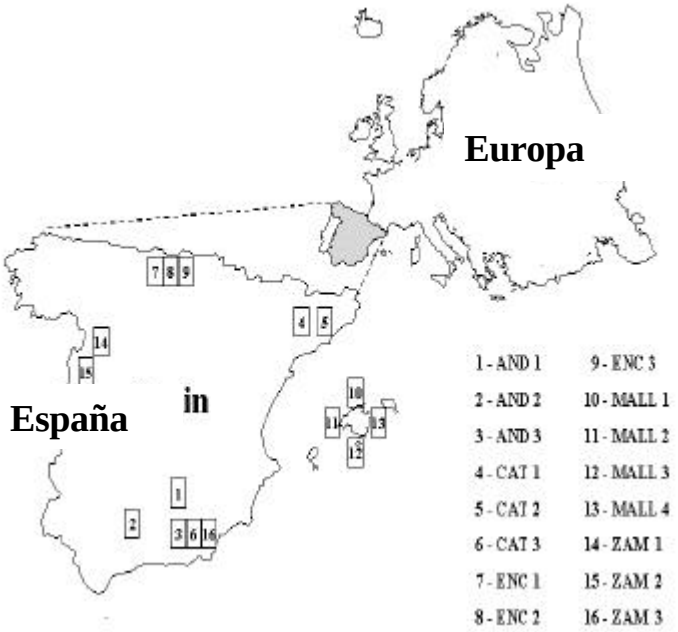


Figura 6. Localización geográfica de la subpoblaciones asnales españolas y su código de referencia.

3.4 ***Condiciones de la PCR***

Los 15 microsatélites, marcados fluorescentemente, se amplificaron en tres múltiplex, con el objeto de evitar el solapamiento entre los productos originados en la PCR.

La primera múltiplex incluyó los microsatélites ASB2, HMS3, HMS6, HTG6, HTG10 y VHL20; la segunda estuvo compuesta por los marcadores AHT4, AHT5, HMS2, HMS7 y HTG7 y la tercera contenía a los marcadores HMS1, HMS5, HTG4 y HTG15. Todas las PCR múltiplex fueron amplificadas en una reacción final de 15 µl, conteniendo 30 ng de ADN genómico, 200 µM de desoxirribonucleótidos (dNTP), 0.5 µl de ADN polimerasa (AmpliTaq gold, 5U/µl), 1.5 µl de cada *"primer"* (AHT4, ASB2, HMS2, HMS3, HTG6, HTG7, HTG10), 0.4 µl de los *"primers"* (AHT5, HMS6, y HMS7) y solo 0.3 µl del *"primer"* VHL20; todos ellos pertenecientes al kit comercial (por lo que las concentraciones no están disponibles) y 0.20 µM de los marcadores HMS1, HMS5, HTG4 y HTG15.

La PCR fue llevada a cabo en un termociclador 9700 (GeneAmp PCR system PE) comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 95ºC durante 10 min., seguido de 30 ciclos que comprendían, una primera fase de desnaturalización a 95ºC durante 30 segundos, una fase de hibridación a 60ºC durante 30 segundos y una fase de extensión de la cadena a 72ºC durante 60 segundos. El programa térmico finalizó con una extensión a 72ºC durante 60 minutos.

Tabla 5. Secuencias de los "*primers*" utilizados y su ubicación en el mapa equino.

Marcador	*ECA*[1]	*Secuencias de "primers" (5'----3')*	*Referencia*
AHT4	24q14	F:[FAM] AACGCCTGAGCAAGGAAGT R: GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	Binns *y col.*(1995)
AHT5	8	F:[JOE] ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	Binns *y col.*(1995)
ASB2	$15_{q21-q23}$	F:[JOE] CCATTCCCGCCCCACCCCCGGCA R:CACAACTGAGTTCTCTGATAGG	Breen *y col.*(1997)
HMS1	15	F:[TAMRA] CATTCTTCATGTCTGCTTGG R:TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	Guerin *y col.*(1994)
HMS2	10	F:[TAMRA]CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG R:GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	Guerin *y col.*(1994)
HMS3	9	F:[TAMRA] CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA R:CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	Guerin *y col.*(1994)
HMS5	5	F:[TAMRA]TAGTGTATCCGTCAGAGTTCAAAG R:GCAAGGAAGTCAGACTCCTGGA	Guerin *y col.*(1994)
HMS6	4	F:[JOE] GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA	Guerin *y col.*(1994)
HMS7	1	F:[TAMRA] CAGGAAACTCATGTTGATACCATC R:TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	Guerin *y col.*(1994)
HTG4	9	F:[FAM] CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R:CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCT	Ellegren *y col.*(1992)
HTG6	15_{q26-27}	F:[JOE] CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT R:GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	Ellegren *y col.*(1992)
HTG7	4	F:[TAMRA]CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R:ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	Marklund *y col.*(1994)
HTG10	21	F:[JOE] CAATTCCCGCCCCACCCCCGGCA R:TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT	Marklund *y col.*(1994)
HTG15	5	F:[JOE] TCCTGATGGCAGAGCCAGGATTTG R:AATGTCACCATGCGGCACATGACT	Bailey *y col.*(1994)
VHL20	30	F:[FAM] CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R:AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	Van Haeringen *y col.* (1994)

[1] *Equus caballus* Autosoma

Los productos de la PCR fueron posteriormente detectados mediante electroforesis capilar, utilizando un secuenciador automático (ABI, Applied Biosystems 310 DNA sequencer), y analizados con el programa GENESCAN (analysis software ABI) usando el marcador ROX 350 pb como marcador interno estándar de tamaño (Figura 7).

3.5 Análisis estadísticos

3.5.1 Variabilidad genética

Los análisis de variabilidad genética se realizaron a partir de las frecuencias alélicas, obteniéndose los valores de los diferentes estadísticos mediante el programa BIOSYS-2 (Swofford y Selander, 1999). El test de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) de las frecuencias genotípicas, fue llevado a cabo, utilizando el test exacto del programa GENEPOP 3.1d (Raymond y Rousset, 1995), usando el método de la cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992).

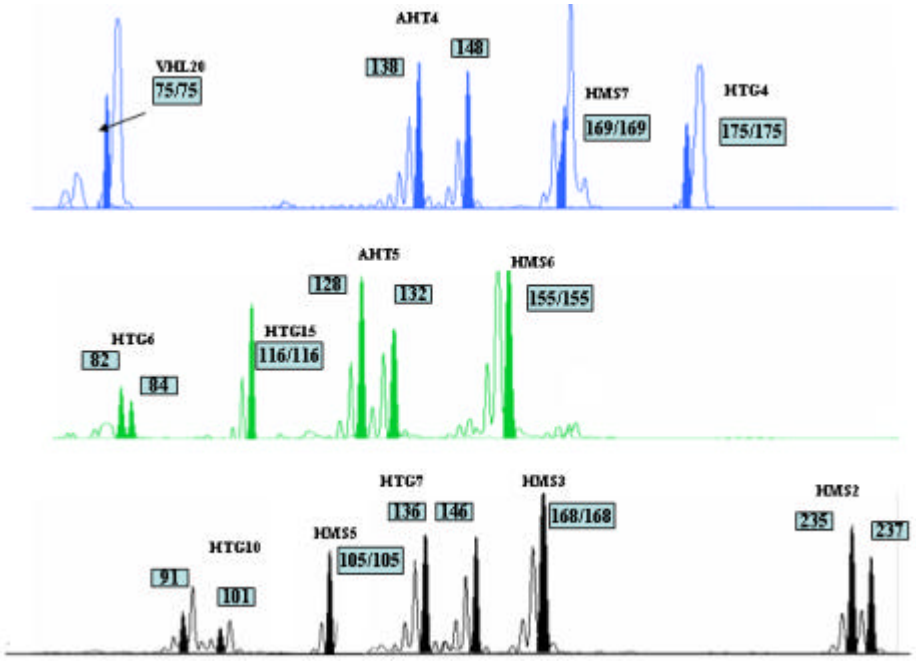


Figura 7. Electroferograma de la leyenda de los microsatélites (ABI 310).

El contenido de información polimórfico (PIC) fue calculado para cada uno de los marcadores según lo descrito por Botstein *y col.* (1980) y la probabilidad de exclusión (PE) fue calculada, tanto de forma individual, como para el conjunto de los marcadores según lo descrito por Jamieson (1994), tanto para la población como un conjunto, como para cada una de las razas en forma particular.

El promedio de heterocigosidad esperada para cada población (H_S) así como la diversidad génica para el total de la población (H_T) y la diversidad génica entre poblaciones, el llamado coeficiente de diferenciación génica G_{ST} (Nei, 1973), fueron estimados usando el programa computacional DISPAN (Ota, 1993) y testados mediante tests permutacionales. Las diferencias en las heterocigosidades medias entre razas fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA test) con el paquete estadístico SAS® (SAS, 1996).

3.5.2. *Estructura de la población*

La estructura de la población fue analizada a través del estudio de los *F*-estadísticos, utilizando el método descrito por Weir y Cockerham (1984) e implementado en el programa computarizado FSTAT (Goudet, 2000). Para el estudio jerárquico de la población (intra-racial) se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) incorporado en el programa computarizado ARLEQUIN 2.000 (Schneider y col.,, 2000). AMOVA permite las estimaciones de estructura de la población a diferentes niveles jerárquicos específicos.

Para realizar los tests de significancía de los diferentes estadísticos, y así testar la hipótesis nula de "no diferenciación" en los correspondientes niveles jerárquicos, se realizaron remuestreos y análisis permutacionales del tipo *jackknifing* y *bootstrapping*, mediante los programas previamente mencionados. La tasa efectiva de migración

génica fue analizada mediante el método de Slatkin (1993), implementado en el programa GENEPOP ($M = N_e m$, siendo M el número promedio de migrantes que se intercambian por generación).

3.5.3 *Distancias y relaciones filogenéticas*

Las distancias genéticas y los árboles filogenéticos entre poblaciones se obtuvieron en primer lugar a partir de la distancia D_A (Nei y col., 1983). Takezaki y Nei (1996) sugirieron el uso de esta medida en los análisis con marcadores del tipo microsatélite, cuando el principal objetivo del estudio está enfocado a la correcta asignación de la topología, más que a estudios de tiempos evolutivos. Las distancias fueron analizadas con el método de agrupamiento neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Dado que este método sólo produce árboles no rotados, se incluyó en el estudio a la raza equina Merens, como población outgroup permitiendo así dar una orientación filogenética al árbol. La robustez del dendrograma fue evaluada por re-muestreos bootstrap, de los *loci*, con un total de 1.000 replicaciones. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete DISPAN (Ota, 1993).

Por otra parte se calculó la distancia genética de Reynolds (Reynolds *y col.*, 1983) entre poblaciones. Esta medida se basa en los valores F_{ST} [$D_L = -\ln (1-F_{ST})$]. La distancia de Reynolds, conjuntamente con el método de agrupamiento NJ, se utilizó para construir el dendrograma y analizar las relaciones existentes entre razas, usando para ello el programa PHYLIP (Felsenstein, 1995). Se obtuvo un árbol de consenso no rotado, evaluado mediante 1.000 replicaciones bootstrap.

Adicionalmente, ya que las distancias genéticas pueden ser utilizadas como medidas de diversidad genética, según lo propuesto por Weitzman (1992, 1993), se realizaron aproximaciones para proveer una representación jerárquica adicional de las razas y además evaluar la

posible pérdida marginal de diversidad, dados diferentes patrones de extinción de las razas, tal y como propusieron Thaon d' Arnoldi *y col.* (1998).

Para realizar dicha aproximación se calcularon las distancias genéticas entre las razas a partir de las frecuencias alélicas de las mismas. Las distancias utilizadas fueron: la distancia de Reynolds (Reynolds *y col.*, 1983) y la distancia estándar de Nei, corregida para pequeños tamaños de muestra (Nei, 1978).

Otras metodologías, tales como el análisis de los componentes principales (PCA), el cuál se realizó mediante el uso del paquete estadístico SAS en su procedimiento PRINCOMP (SAS, 1996) de acuerdo a las recomendaciones de Cavalli-Sforza *y col.* (1994), y el análisis de los alelos compartidos (Bowcock *y col.*, 1994), también fueron utilizadas para así analizar la diversidad genética entre las razas. Para este último se construyó un árbol con la metodología NJ, usando en este caso a cada animal de forma individual como unidad taxonómica operativa (OTU), a partir de una matriz de distancias derivada del estadístico de los alelos compartidos. Esta matriz se obtuvo utilizando el programa computarizado MICROSAT (Minch *y col.*, 1995), y a partir de ella se confeccionó un árbol NJ mediante el paquete estadístico PHYLIP (Felsenstein, 1995).

3.5.4 Asignación de individuos a raza

Los cálculos para la correcta asignación de individuos a sus poblaciones se llevaron a cabo mediante el programa GENECLASS (Cournuet *y col.*, 1999), el cuál tiene en cuenta diferentes métodos de estimación.

3.6 **Análisis del ADN mitocondrial**

En el caso de los estudios del ADN mitocondrial de los asnos españoles hay que realizar algunos comentarios adicionales, dadas sus particulares diferencias con el ADN nuclear (microsatélites). Estos son:

Individuos muestreados:

Se extrajo ADN total (tanto genómico como mitocondrial), mediante el método anteriormente descrito, a un total de 91 asnos para los estudios de la región D-loop y de 79 individuos para la región del citocromo b. La distribución de los animales muestreados por razas se aprecia en la Tabla 6.

Tabla 6. Razas asnales, número de individuos analizados para la secuenciación de la región del D-loop y el citocromo b.

Raza	***Nº de animales analizados***	
	D-loop	**Cit b**
Españolas		
Andaluza	20	18
Catalana	10	12
Encartaciones	11	7
Mallorquina	10	7
Majorera	10	10
Zamorano-Leonesa	10	7
Africanas		
Marruecos	9	7
Zimbabwe	11	11
Total	91	79

Solo comentar que además de las cinco razas estudiadas con los microsatélites, fueron incluidas para estos análisis muestras de la raza asnal española Majorera (MAJ) y 11 individuos del Asno de Zimbabwe (ZIM); estos últimos cedidos por A. Beja-Pereira, de la Unidad de Genética Animal y Conservación de la Universidad de Porto (Portugal), los cuáles fueron considerados como genuinos representantes del *E. a. somaliensis*. La secuencia del *E. caballus* fue usada como población outgroup y la misma fue recuperada del GenBank acceso nº X93337.

PCR y secuenciación de la región D-loop

Los *"primers"* (oligonucleótidos) para la PCR de la región hipervariable del D-loop, localizada entre el $tRNO^{Pro}$ y la larga secuencia central conservada, fueron diseñados en base a la secuencia del ADN mitocondrial almacenada en el GENBANK (Xu *y col*., 1996).

Estas secuencias amplificaron un fragmento de 383 pb, específicamente entre los sitios nucleotídicos 15387 y 15769 (Figura 8). Las secuencias de los *"primers"* diseñados corresponden a: viz. Donk A (5´-CCC AAG GAC TAT CAA GGA AG-3´) y Donk B (5´-TTG GAG GGA TTG CTG ATT TC-3´).

La PCR fue llevada a cabo en una reacción final de 20 µl, conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 20 µM dNTPs, 10 pmol de cada uno de los *"primers"*, 0.2 U AmpliTaq gold (PE Applied Biosytems, MA) y 50 ng de ADN molde. El ciclo térmico fue comportado en un termociclador 9700 (Thermal cycler PE), con el siguiente patrón: 94 ºC por 10 min, seguido de 25 ciclos, cada uno consistía de 94 ºC por 45 s, 60 ºC por 45 s y 72 por 45 seg y una extensión final a 72 ºC por 20 min.

Los productos originados de la PCR fueron purificados mediante la técnica de geles, previa a la reacción de secuenciación, usando el kit de extracción (Q/Aquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Una vez purificado el ADN se secuenció utilizando un kit comercial de secuenciación (ABI PRISM™ Dye Terminater Cycle Sequencing kit; Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA) utilizando, así mismo, el protocolo recomendado por la compañía manufacturera. Las secuencias del ADN asnal fueron determinadas utilizando un secuenciador automático (ABI Prism 310 DNA sequencer) y analizadas con el software GENESCAN de secuenciación (Applied Biosystems).

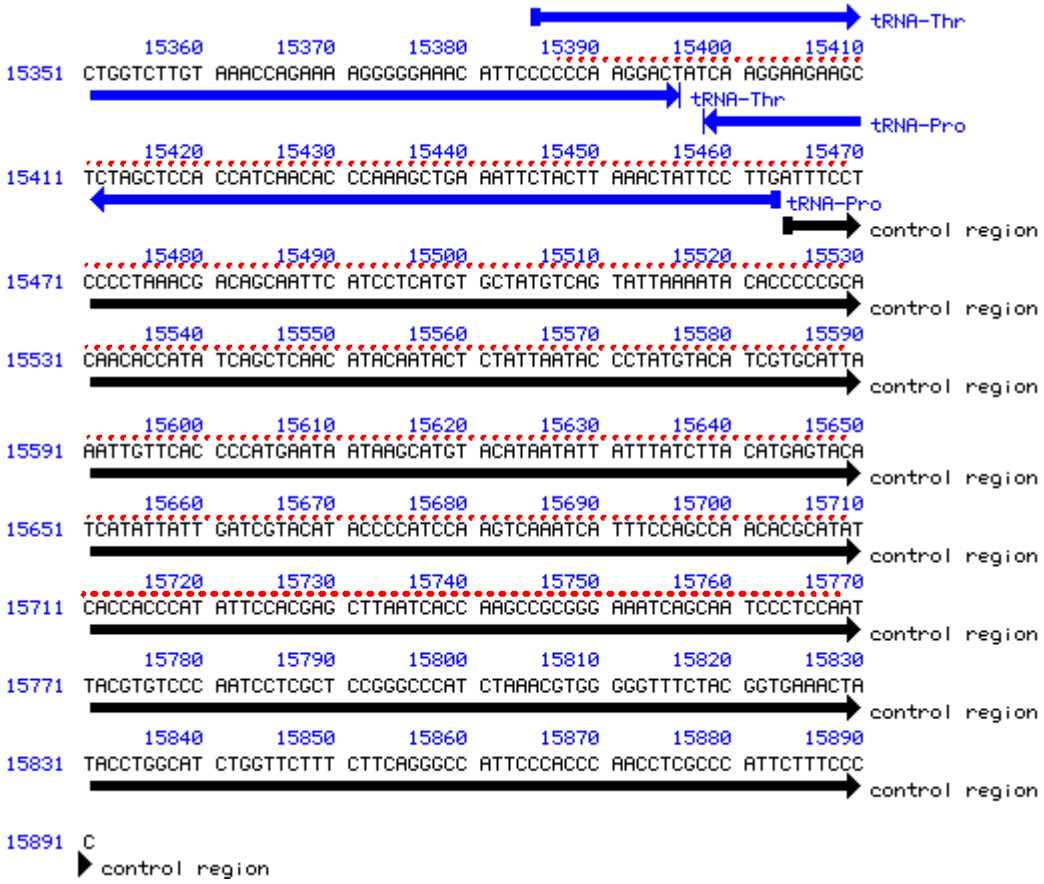


Figura 8. Región D-loop, entre los nucleótidos 15387 y el 15769, secuenciada en las razas asnales.

PCR y secuenciación de la región del citocromo b

Una región parcial del citocromo b, de 312 pb, fue amplificada y secuenciada específicamente entre los nucleótidos 14391 y 14703 (Xu y col., 1996; Figura 9) mediante la técnica de la PCR. Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas previamente para el D-loop. Las secuencias de los *"primers"* correspondieron a: CITB-F (5'-CTG CCG AGA CGT TAA CTA C-3') y CITB-R (5'-GGC TTT GTC TAC TGA GAA TC-3'). Los productos de la PCR fueron, al igual que la región anterior, purificados mediante la técnica de geles y secuenciados con la técnica del "Big Dye terminator" en un ABI 310 Prism (Perkin- Elmer, Applied Biosystems).

Análisis estadísticos

Algunas de las secuencias del ADN mitocondrial han sido depositadas en el GenBank (accesos Nos. AF380130-380135 y AF416594-416599). Dichas secuencias, tanto la del mtDNA D-loop como la del citocromo b fueron alineadas usando el programa de alineamientos múltiples Clustal-X (Thompson *y col.*, 1997) obteniéndose las diferentes secuencias existentes (haplotipos) y sus respectivas frecuencias.

Diversidad molecular

Una vez obtenidos todos los haplotipos, se procedió a evaluar el grado de diversidad en cada una de las razas en general, así como, la posible estructura genética de la población.

Se analizó entonces la diversidad haplotípica (h; Nei y Tajima, 1981), siendo esta medida análoga a la heterocigosidad esperada o diversidad génica de Nei en el ADN nuclear.

$$h = \frac{n}{n-1}\left(1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2\right);$$

donde k= número de diferentes haplotipos y p_i representa a las frecuencias de cada *i* haplotipo.

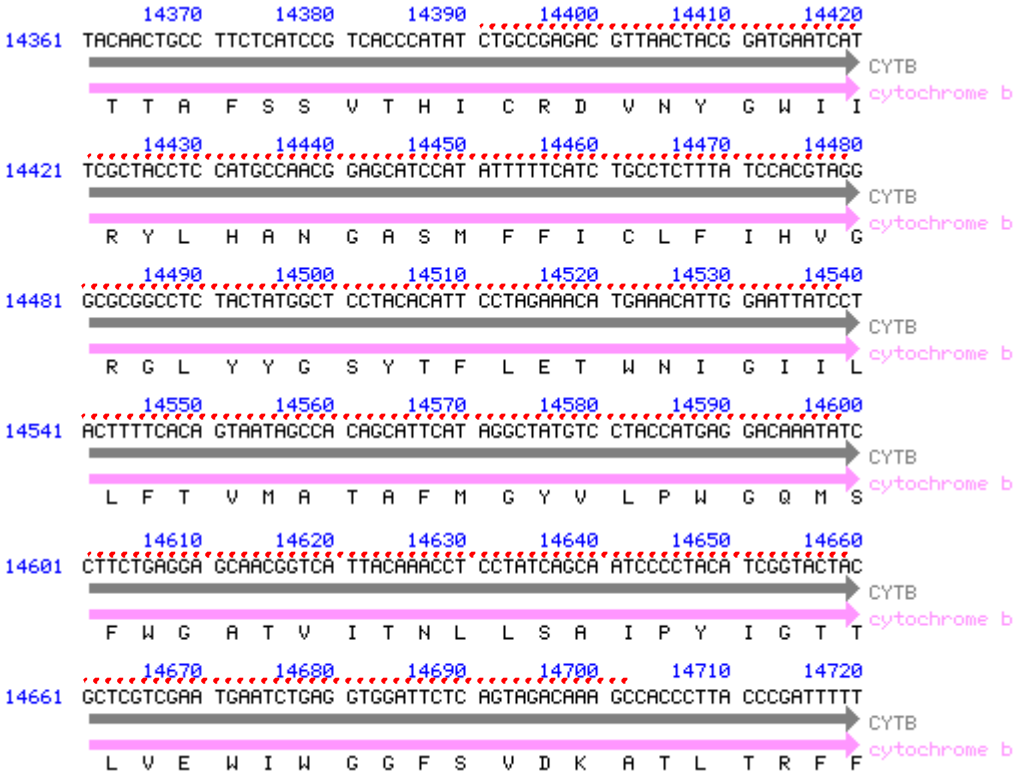


Figura 9. Región Citocromo b, entre los nucleótidos 14391 y 14703, secuenciada en las razas asnales.

Una segunda medida de variabilidad es la denominada diversidad nucleotídica (π; Nei, 1987), definida como el número medio de diferencias nucleotídicas por *locus* entre las diferentes secuencias y se calcula a partir de:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i \; p_j \; \delta_{ij};$$

donde δ_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos *i* y *j*.

La proporción de nucleótidos diferentes entre haplotipos (δ_{ij}) fue estimada a partir de la distancia de Tamura y Nei (1993), y todo ello analizado mediante la utilización del programa ARLEQUÍN (Schneider *y col.*, 2000).

El número medio de substituciones nucleotídicas por posiciones entre dos grupos de secuencias (d_{XY}), que nos da una estimación de la distancia genética entre estos grupos (Nei y Li, 1979), fue calculada a partir de la fórmula:

$$d_{XY} = \pi_{12} = \sum_i \sum_j p_{1i} \; p_{2j} \; \delta_{ij}$$

donde δ_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos *i* y *j*, siendo p_i la frecuencia del haplotipo *i*.

Y a partir de ésta, y con la corrección por las divergencias, dado un grupo de secuencias, podemos calcular (d_A) a partir de:

$$d_A = \pi_{12} - \frac{\pi_1 + \pi_2}{2}$$

La distancia propuesta por Tamura y Nei (1993), es una de las que más se ajusta a la realidad, ya que considera una tasa mutacional diferente entre transiciones (α) y transversiones (β); así como, los cambios transcicionales entre purinas ($\alpha 1$) y entre pirimidinas ($\alpha 2$) ya

que los mismos presentan tasas diferentes, y también pondera la frecuencia de cada una de las bases (Figura 10).

La divergencia de las secuencias (*K*) y su error estándar, así como, los análisis filogenéticos fueron realizados utilizando el programa informático MEGA (Kumar *y col*., 2001).

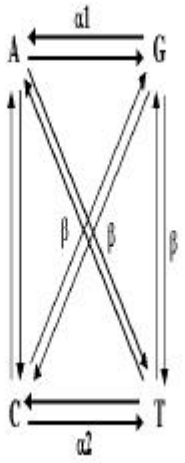


Figura 10. Modelo de substitución nucleotídica de Tamura y Nei.

El árbol filogenético fue construido usando el algoritmo NJ y la confianza estadística de cada nodo fue estimada sobre 1000 réplicas bootstrap utilizando los programas MEGA y ARLEQUÍN; la secuencia del caballo (*E. caballus*), secuencia H1, cuyo número de acceso es el nº X93337 (Ishida *y col*., 1994), fue utilizada como outgroup.

Para la estimación de la divergencia nucleotídica entre las poblaciones (d_A), se asumió una tasa de substitución nucleotídica por sitio y año (λ) de la región del D-loop de 2-4 x 10^{-8} (Ishida *y col*., 1995). A partir de la ecuación de Nei (1987), donde $d_A = 2\lambda t$; se estimó el

tiempo de divergencia (t, en años) entre las secuencias de asnos y la del caballo.

Minimum Spanning tree

Este tipo de reconstrucción filogenética se basa en un algoritmo similar al de parsimonia y elabora un árbol a partir de los haplotipos, utilizados estos como nodos intermedios y no como terminaciones, a pesar de que algunos OTU´s (haplotipos) se puedan situar al final de la rama. Las principales diferencias y/o semejanzas referidas a las relaciones genéticas están definidas por el número de cambios nucleotídicos. Un "minimum spanning tree" (Prim, 1957), basado en el número de nucleótidos diferentes entre cada par de haplotipos, fue obtenido usando el programa MST del paquete informático NTSYS (Rohlf, 2001).

Raza Zamorano-Leonesa

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. VARIACIÓN GENÉTICA

Resultados

Todos los microsatélites equinos amplificaron exitósamente 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_T, 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 (± error estándar) a partir del análisis de 13 loci microsatélites en las razas asnales españolas.

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

* 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

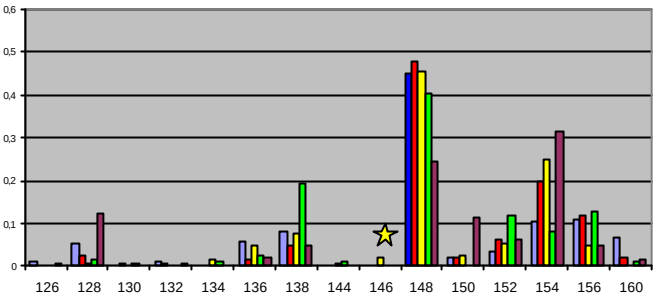
El número de alelos promedio, así como la heterocigosidad esperada (H_E) y demás indicadores de variabilidad genética fueron similares en todas las razas, indicando que no existen diferencias apreciables en las 5 razas de asnos españolas a nivel de variabilidad genética. Estos valores son además similares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

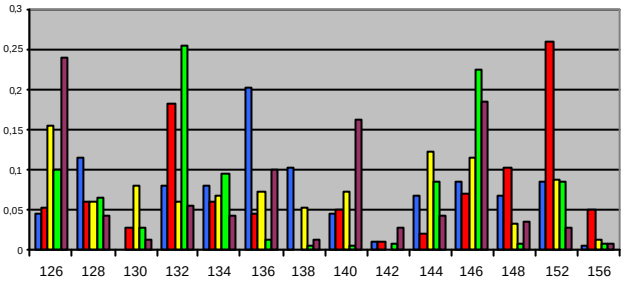
La diferenciación genética promedio (G_{ST}) entre razas fue del 3.6%, relativamente baja pero significativa ($P<0.001$), contribuyendo todos los *loci* a esa diferenciación.

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 (Equus asinus)						
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





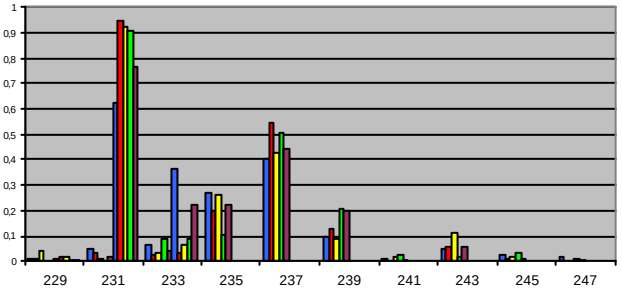
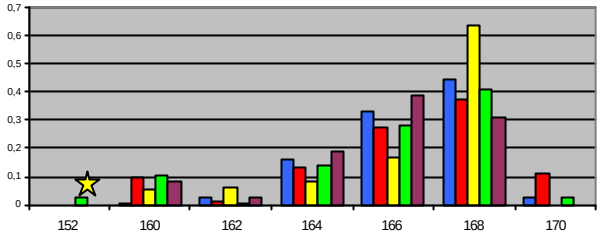
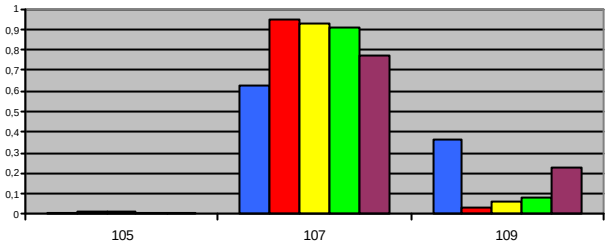


Figura 11. Frecuencias alélicas y su distribución en las poblaciones asnales.

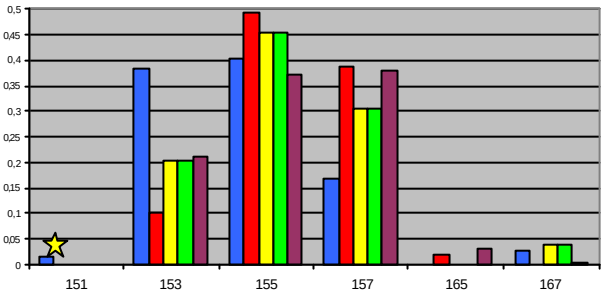
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS3	160				0,029	
	162	0,006	0,096	0,054	0,106	0,083
	164	0,023	0,011	0,061	0,005	0,028
	166	0,165	0,134	0,082	0,139	0,191
	168	0,335	0,273	0,168	0,284	0,388
	170	0,448	0,371	0,635	0,409	0,310
	172	0,023	0,114		0,029	
	PIC	0,596	0,709	0,521	0,676	0,658
	PE	0,392	0,525	0,342	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



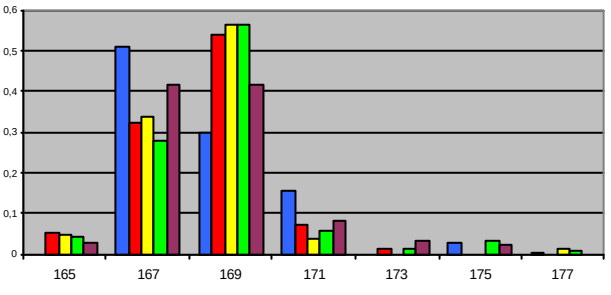
LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
HMS5	105	0,006	0,018	0,014	0,005	0,005
	107	0,626	0,946	0,926	0,909	0,769
	109	0,368	0,036	0,061	0,087	0,227
	PIC	0,366	0,101	0,132	0,154	0,296
	PE	0,186	0,052	0,069	0,079	0,151
	He	0,475	0,103	0,140	0,168	0,360
	Ho	0,517	0,107	0,122	0,183	0,352



LOCUS		AND	CAT	ENC	MALL	ZAM
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

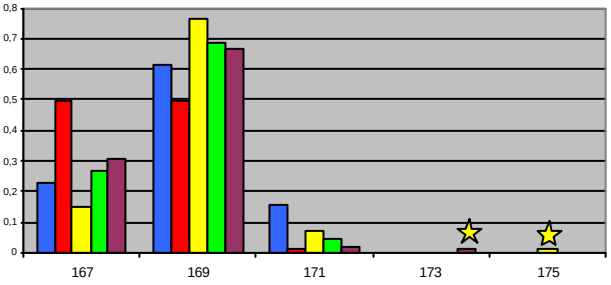
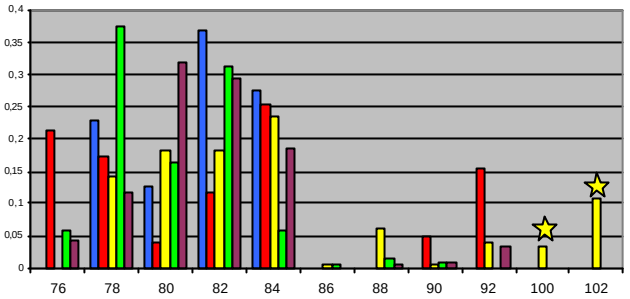
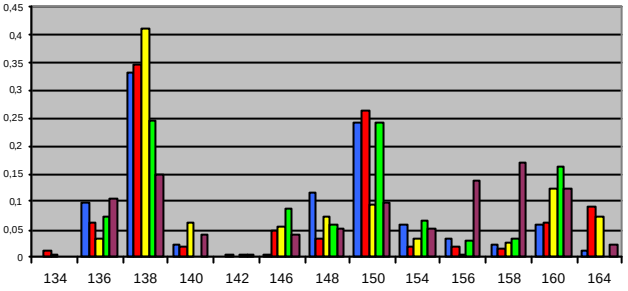


Figura 11. **(Continuación)**

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





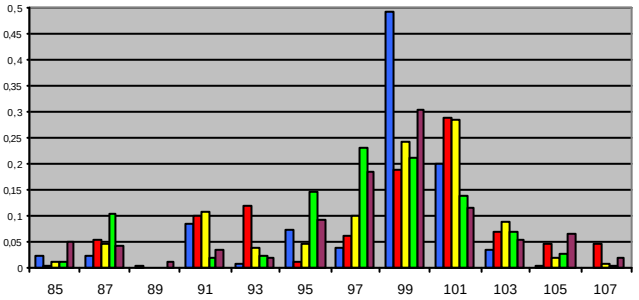


Figura 11. **(Continuación)**

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		**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

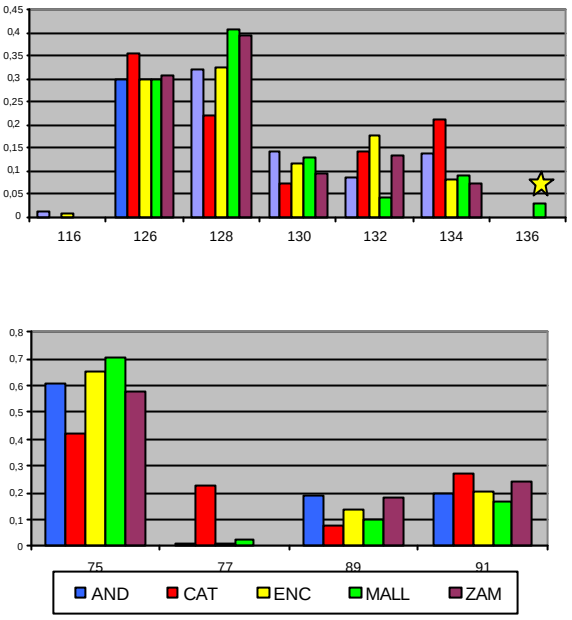


Figura 11. **(Continuación)**

☆ 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} multi*locus* 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 (†) de los 13 microsatélites polimórficos en cinco razas de asnos españoles y (‡) media estimada para estas razas.

Locus †	F_{IS} ó *f*	F_{IT} ó *F*	F_{ST} ó *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 ‡	**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; †*Locus*: estimado a partir de jackknife sobre poblaciones.
‡ 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 ($F \cong F_{IT}$), 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} ó f	F_{IT} ó F	F_{ST} ó q
Andaluza	0.184 (0.058)***	0.232 (0.058)***	0.058 (0.009)***
	† (0.084-0.306)	(0.132-0.352)	(0.040-0.075)
Catalana	0.189 (0.053)***	0.214 (0.052)***	0.031 (0.007)***
	(0.102-0.303)	(0.127-0.324)	(0.018-0.044)
Mallorquina	0.091 (0.045)***	0.112 (0.049)***	0.022 (0.007)***
	(0.016-0.193)	(0.032-0.221)	(0.010-0.038)
Encartaciones	0.118 (0.040)***	0.130 (0.041)***	0.013 (0.006)***
	(0.053-0.210)	(0.062-0.224)	(0.003-0.026)
Zamorano-Leonesa	0.193 (0.053)***	0.223 (0.061)***	0.037 (0.014)***
	(0.099-0.307)	(0.116-0.353)	(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 @ FIT), 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_em) (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_em) 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 desciende 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.

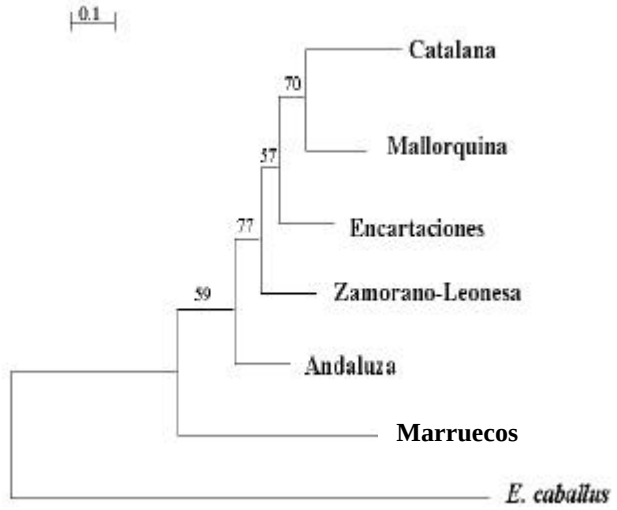


Figura 12. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cinco razas asnales españolas, el asno de Marruecos y la raza equina Merens (outgroup), utilizando la distancia D_A y el algoritmo NJ. Los valores indican el porcentaje de replicaciones bootstrap entre los grupos.

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.

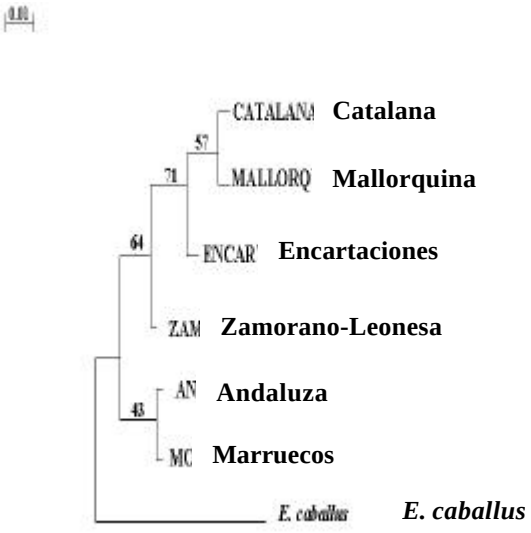


Figura 13. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre las cincos razas asnales españolas, el asno de Marruecos y el E. caballus usado como outgroup, utilizando la distancia de Reynolds y el algoritmo NJ. Los números en los nodos corresponden a los porcentajes de 1000 replicaciones bootstrap.

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.

Razas	*Andaluza*	*Catalana*	*Mallorquina*	*Encartaciones*	*Zam.-Leonesa*
Andaluza	--------	**0.1324**	0.1074	0.0797	0.0737
Catalana	**0.0618**	--------	0.0801	0.0767	0.1140
Mallorquina	0.0561	0.0441	--------	*0.0597*	0.0702
Encartaciones	0.0452	0.0413	0.0379	--------	0.0723
Zamorano-Leonesa	*0.0372*	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.

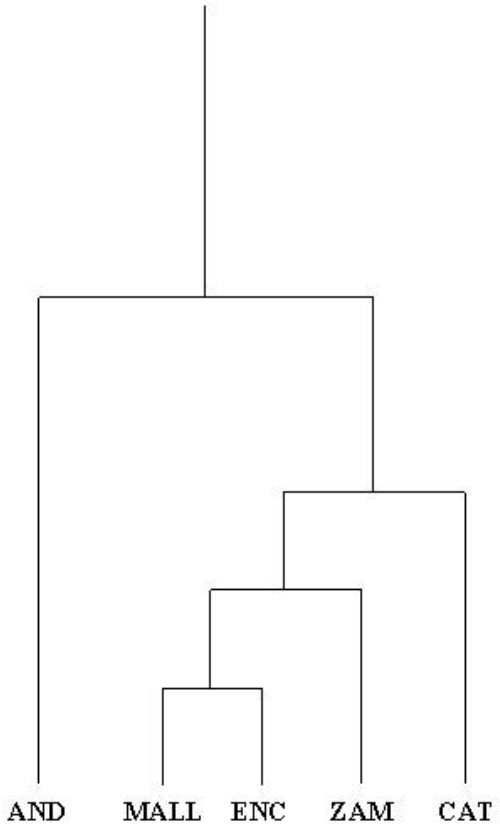


Figura 14. Dendrograma de las relaciones establecidas por el método de Weitzman, utilizando la distancia estándar de Nei, entre las cinco razas asnales españolas.

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.

	Distancia de Reynolds			***Distancia estándar de Nei***			***Promedio***
Pérdida de la raza (Q)	Diversidad V(S\Q)	Pérdida absoluta ΔV	Pérdida relativa ΔV/V (%)	Diversidad V(S\Q)	Pérdida absoluta ΔV	Pérdida relativa ΔV/V (%)	ΔV/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; ΔV = V(S) - V(S\Q) = valor absoluto.
ΔV/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.

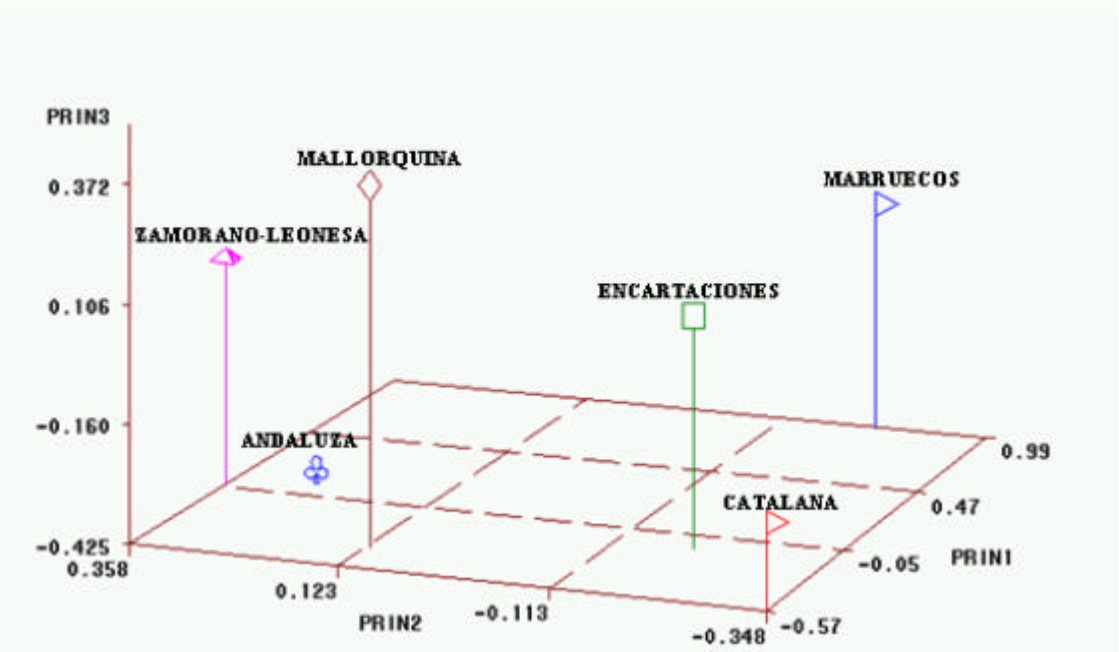


Figura 15. Análisis de los componentes principales a partir de las frecuencias de los 13 microsatélites en las cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. El primer PC explica el 52.0% de la variación, el segundo el 15.0% y el tercero el 13.8% de la variación total.

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 cómo 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 *et al*	**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**
$(dm)^2$ Goldstein *et al*	**33.14**

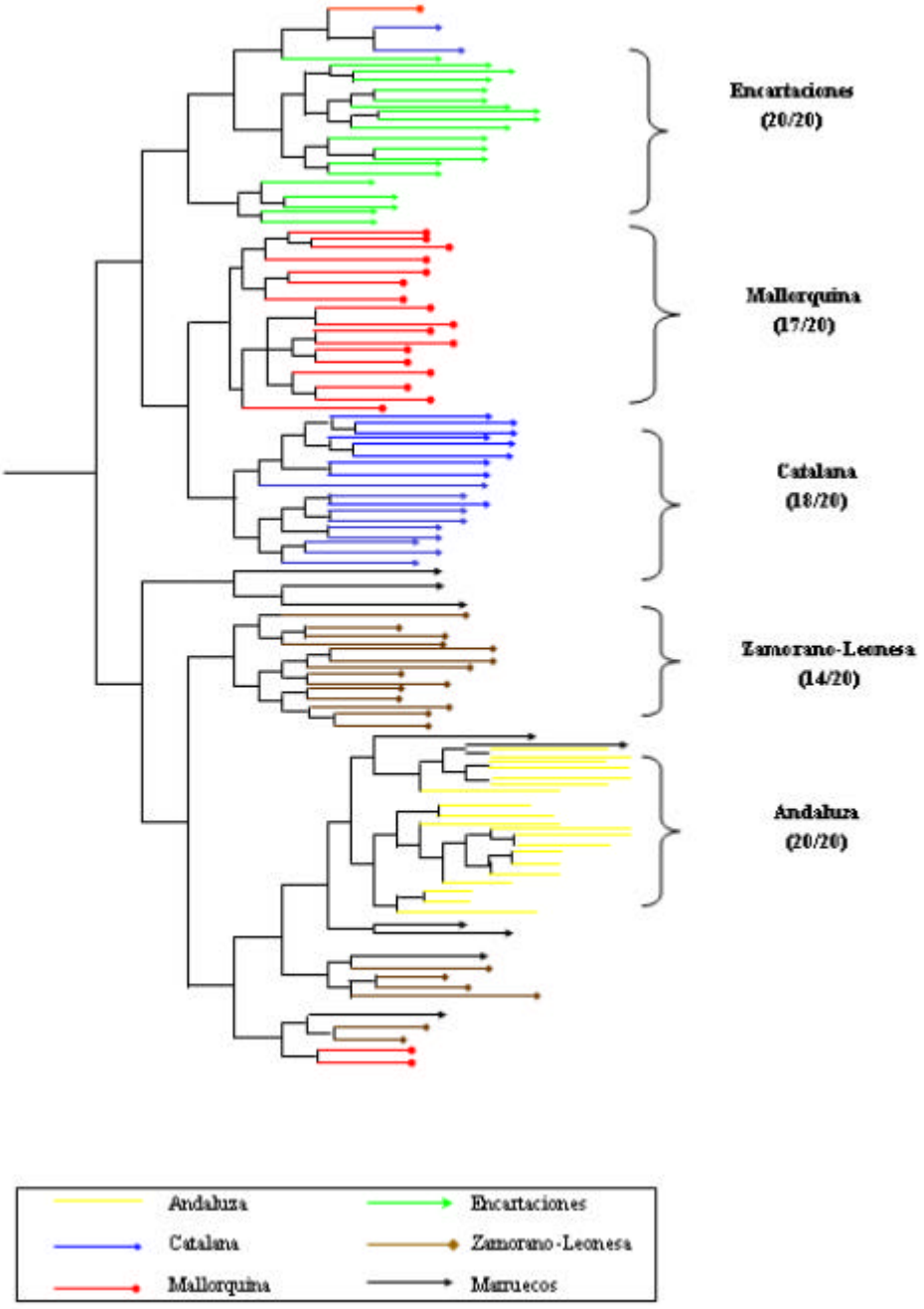


Figura 16. Dendrograma NJ construido a partir de la distancia de los alelos compartidos entre 109 individuos de las cinco razas asnales españolas y el asno de Marruecos. Los números a la derecha indican la fracción de individuos de la raza.

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 forman 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 substituciones del tipo de transversiones, afectando ambos en la posición nucleotídica 14592. Así mismo, no se presentó ninguna deleción 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.

Posición / **Haplotipos**	***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**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**
***EQUUS*[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, qué se van agregando al árbol en ramas únicas (Figura 17).

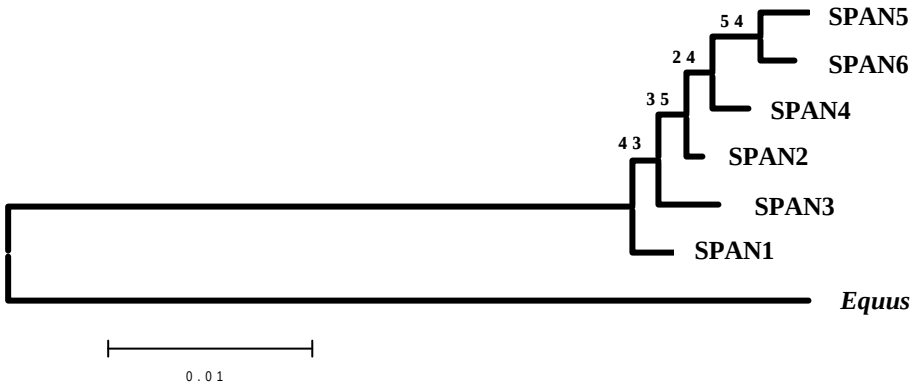


Figura 17. Dendrograma N-J para los 6 haplotipos del citocromo b en cinco razas de asnos españoles, dos africanas y la secuencia de caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones corresponden a los porcentajes sobre 1.000 replicaciones bootstrap.

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).

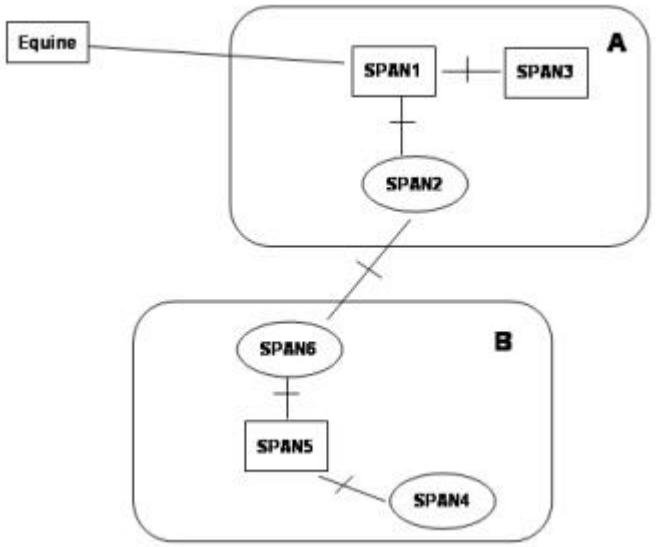


Figura 18. Minimum spanning tree mostrando los network de interrelación entre los 6 haplotipos del citocromo b en las razas analizadas. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo.

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 (h ± DE)*	*Diversidad Nucleotídica (p)*
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 substituciones 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.***

Nucleótido Posición / Posición	11111 55555 44444 16889 19480	11111 55555 45555 90111 23468	11111 55555 55555 22334 18130 (b)	11111 55555 55555 44444 13467	11111 55555 55555 45566 83901	11111 55555 55555 66789 59008	11111 55555 56666 92344 91043	11111 55555 66667 56690 22784
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 (h ± DE)*	*Diversidad Nucleotídica (p)*
Españolas				
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
Africanas				
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 x 10^{-8} substituciones por sitio y año (Ishida *y col.*, 1995), el tiempo de divergencia estimado

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

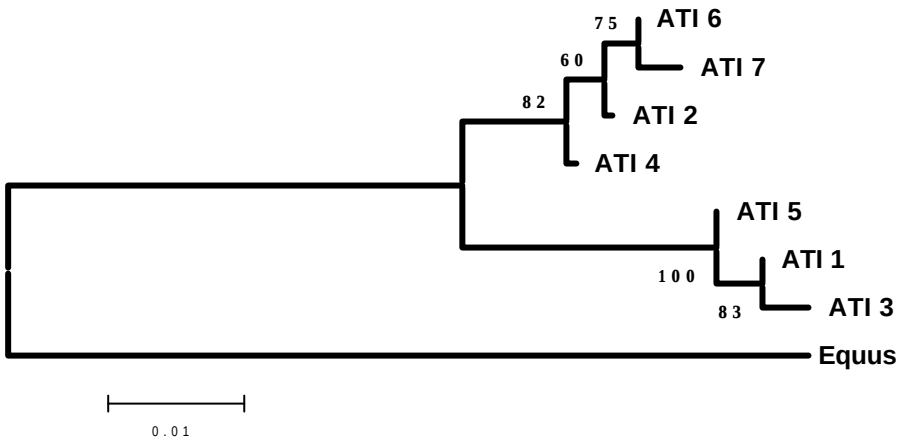


Figura 19. Dendrograma N-J para los 7 haplotipos del D-loop en seis razas de asnos españolas, dos africanas y la secuencia de caballo como outgroup. Los números en las bifurcaciones representan el porcentaje de 1.000 replicas bootstrap

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 substitución 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%.

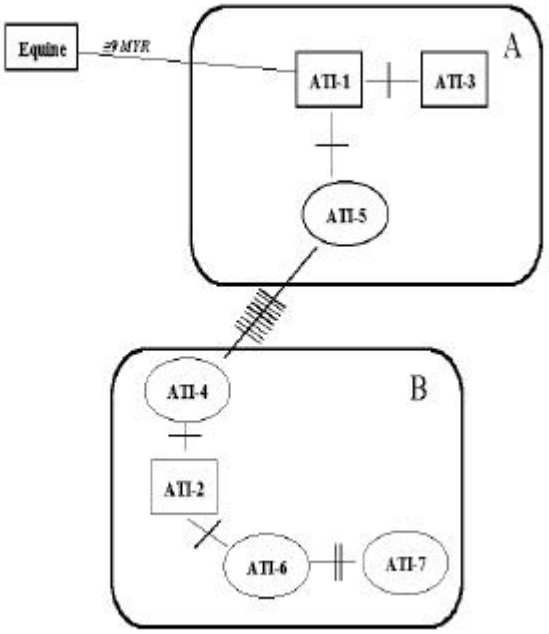


Figura 20. Minimum spanning tree mostrando los network de interrelación entre los 7 haplotipos del D-loop en las razas analizadas. Las líneas entre los haplotipos indican el número de mutaciones ocurridas hasta la aparición de un nuevo haplotipo.

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 q_{ST} (debajo de la diagonal) en las razas asnales españolas y africanas.

Razas	*Españolas*					*Africanas*		
Origen	*AND*	*CAT*	*ENC*	*MALL*	*ZAM*	*MAJ*	*MOR*	*ZIM*
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.

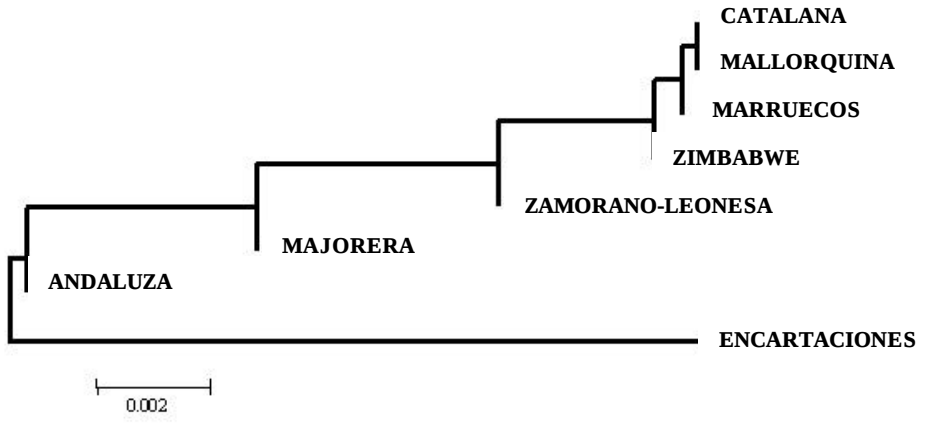


Figura 21. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en la divergencia nucleotídica (d_A) entre las poblaciones.

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.

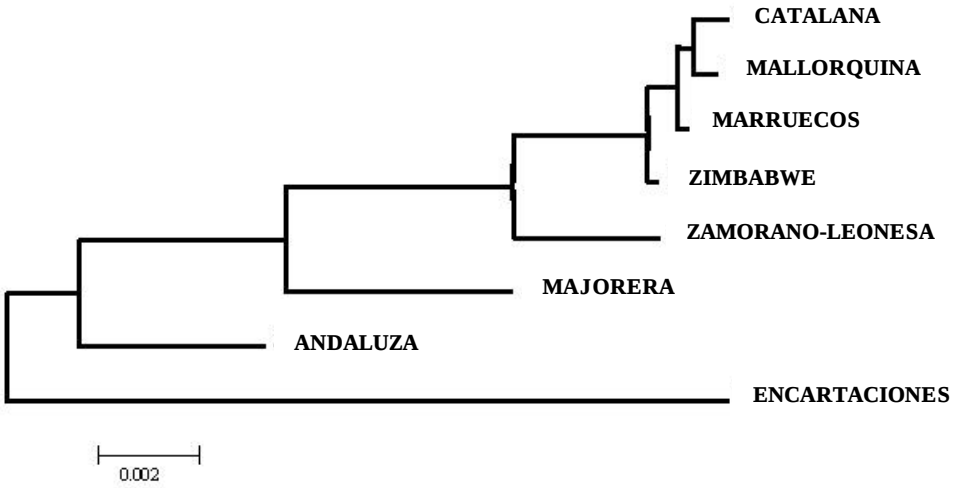


Figura 22. Dendrograma NJ para las seis razas asnales españolas y dos africanas, basadas en el número medio de substituciones nucleotídicas entre poblaciones (d_{XY}).

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 *y col.*, 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.

Raza asno de los Encartaciones

5. DISCUSIÓN GENERAL

En este apartado pretendemos realizar una discusión global de los capítulos de resultados y discusiones plasmados anteriormente, todo ello enmarcado en la caracterización molecular de las razas asnales españolas.

El objetivo último de esta tesis es poder brindarle a los interesados (criadores, investigadores y estudiantes) en las razas asnales, cierta información que, en conjunción con los demás trabajos de caracterización morfológica, hematológica, bioquímica y citogenética, permita establecer un Plan de Conservación *in situ* de estas poblaciones que actualmente se encuentran en peligro de extinción.

La excelente adecuación y amplificación de los marcadores de caballos en los asnos (pertenecientes ambos al mismo género *Equus*) nos permitió hacer esta primera aproximación del estudio a nivel del ADN en estas razas. Claro está, después de realizar algunas ligeras modificaciones, en especial en las condiciones de PCR, ajustando tanto cantidades de los productos utilizados (Taq, Oligos, $MgCl_2$, etc) como temperaturas de *anneling* y combinaciones de los marcadores (para evitar solapamientos, que en principio no se presentan en los análisis de muestras originarias de caballos), logrando la completa amplificación en 14 de los 15 microsatélites de caballos utilizados en muestras de asnos.

En trabajos previos, Breen *y col.* (1994) ya habían demostrado que ciertos microsatélites de caballos lograban amplificar en individuos del mismo género *Equus,* y que había la posibilidad del uso de estos para estudios poblacionales en especies relacionas y en especial en las razas minoritarias donde la investigación es bastante limitada. Más tarde, en los primeros trabajos de esta Unidad (Unidad de Genética y Mejora Animal de la UAB), se lograban amplificar estos y otros microsatélites equinos en muestras de asnos (Jordana *y col*., 1999).

Es así que, los microsatélites utilizados, salvo la excepción del marcador ASB2 que no logró amplificar y el HMS1 que fue monomórfico (165 pb.), fueron exitosamente polimórficos y con valores de PIC aceptables, lo que los hace altamente informativos para este tipo de estudios.

El principal objetivo de un programa de conservación *"in situ"* es el mantenimiento de animales vivos que retengan la máxima cantidad de variabilidad genética posible (bajo la hipótesis de existencia de correlación con la viabilidad de la población) con el mínimo incremento de consanguinidad por generación. Esto repercute principalmente en nuestro caso en una depresión consanguínea, una reducción de los caracteres reproductivos y la inevitable disminución del número efectivo de la población, llegando inclusive a la extinción de no tomarse medidas. Así que discutiremos cómo la aportación de esta investigación, contribuye a dar respuesta a esta problemática.

En este orden de ideas, podemos indicar que con respecto a la diversidad de las razas asnales españolas, las cinco razas estudiadas (AND, CAT, ENC, MALL y ZAM) mostraron unos niveles similares y aceptables de variabilidad genética, con valores promedios de H_E y H_O de 0.654 y 0.546 respectivamente, y un número promedio de alelos por *locus* de 7.2, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Así mismo, podemos indicar que tanto para cada una de las razas individuales como a nivel global, la probabilidad de exclusión (PE) fue del 99,99%, lo cuál nos permite contar con una herramienta eficaz a la hora de realizar pruebas de paternidades o descartar una asignación errónea de paternidad. Esto puede ser de gran interés si tenemos en cuenta que en la mayoría de las razas no se dispone de información genealógica. La identificación de alelos y sus respectivas frecuencias,

revelaron pocas o nulas diferencias entre las razas. A pesar de que se presentaron algunos alelos privados, su baja frecuencia no permite utilizarlos como alelos marcadores de raza.

En cuanto al estudio de la estructura genética de las razas, se realizó en primer lugar un análisis global de las mismas y en segundo lugar, y después de detectar un significativo déficit de heterocigotos en la población, se realizó un exhaustivo análisis jerárquico, subdividiendo a cada una de las razas en subpoblaciones (básicamente por su proximidad geográfica) y que nos permitiera de ese modo explicar ese déficit.

A nivel global se presentó una aparente diferenciación racial, del 4.1% ($P< 0.001$), contribuyendo todos los *loci* a ella, por lo que el remanente 95.9% correspondería a diferencias entre los individuos. Como promedio las razas presentaron un déficit de heterocigotos del 17.8%; mientras que en la población total ese déficit fue del 21.1 % ($P < 0.001$).

Este bajo aunque significativo valor de diferenciación genética (4.1%), también nos da indicios de un elevado flujo de genes entre estas razas; siendo mayor entre las razas CAT, MALL y ENC por un lado, y por otro, entre AND y ZAM y mucho menores entre AND y CAT-MALL al igual que entre las razas CAT y ZAM.

El análisis jerárquico mostró, tal y como era de esperar, que las mayores diferencias se presentaran entre razas con respecto al total, más que entre las subpoblaciones dentro de razas y dentro de las subpoblaciones 6.4% vs. 3.5% y 3.0%, respectivamente.

El déficit de heterocigotos en todas las razas osciló entre el 13.0% y el 23.2% para las razas del asno de las Encartaciones y la raza

Andaluza, respectivamente. La principales causas de este déficit podrían variar por raza; atribuyéndose principalmente en las razas AND, CAT y ZAM a la consanguinidad, dado que más del 75% de los *loci* se encontraron en déficit; aunque en estas razas también se presentó un significativo valor de diferenciación genética (F_{ST}) dentro de razas, lo que indica además una cierta subestructuración reproductiva. Mientras que, en las razas ENC y MALL, el déficit podría ser explicable, primordialmente, por la subestructuración reproductiva (efecto Wahlund), más que por consanguinidad, ya que tan solo 6 y 5 de los marcadores, respectivamente, mostraron déficit significativo.

Otro efecto que no podemos olvidar como posible causante de déficit de heterocigotos es el derivado de los alelos nulos, los cuáles, a pesar de no haber podido ser verificados (dada la carencia de información genealógica en la mayoría de las razas), no deberían ser obviados, ya que nos podrían ayudar a explicar parte del déficit presente en todas las razas, en especial la de los marcadores HTG4 y HMS7, estando este último ya reportado en caballos de la raza "Quarter horse" (Bozzini *y col.*, 1997).

La divergencia genética existente entre las razas queda reflejada gráficamente en los árboles (dendrogramas) generados en el estudio de las relaciones filogenéticas. Dependiendo de la distancia utilizada, las mayores divergencias se presentaron entre las razas AND y CAT para todas las distancias evaluadas; mientras que las menores fueron entre AND y ZAM, cuando las distancias fueron la D_A y D_S, y las razas MALL-ENC en la evaluación con la distancia de Reynolds.

Sin embargo, los árboles generados y evaluados por permutaciones bootstrap nos produjeron dos claros patrones de organización: en primer lugar una estrecha relación entre las razas CAT y MALL las cuáles siempre formaron una agrupación más o menos

sólida, y por otro lado, la separación o cierto distanciamiento de la raza AND con el resto de las razas españolas, llegando al caso inclusive, que utilizando la distancia de Reynolds, esta raza clusterizó con el asno de Marruecos, dando indicios de un posible origen común.

Las divergencias genéticas entre las razas, desde un punto de vista general, parecería que por si sola no aportan mucho a un programa de conservación; sin embargo, si tomamos en cuenta que estas poblaciones son de un número efectivo reducido, dichas relaciones podrían servirnos, en casos extremos, a la hora de decidir sobre la utilización de otra raza cercana o próxima a la que está en peligro a la hora de buscar incrementar su *Ne* y así evitar su extinción.

Las representaciones gráficas, tanto de la metodología PCA como D_{AS}, nos dio una distribución más o menos similar a la obtenida previamente con las distancias genéticas, agrupando por un lado de forma más próxima a las razas CAT y MALL y más retirada o distante la raza AND. Con respecto al análisis de Weitzman, el patrón de variación genética o aporte de cada una de las razas al pool genético osciló entre el 19.9% del asno de las Encartaciones y el 29.11% para la raza Catalana; por lo cuál resulta obvio que la pérdida de la raza CAT causaría una mayor pérdida que la extinción de la raza ENC o inclusive la MALL. Este último análisis presenta otra utilidad práctica para la conservación de razas, ya que en situaciones cuando los recursos económicos son reducidos o limitados, nos permite establecer prioridades en base al aporte genético de ciertas razas a la diversidad genética en una población. Pudiendo por lo tanto, elegir para conservar, aquélla (s) raza (s) que nos aporten un mayor nivel de variabilidad genética a la población.

Dado que otro de los puntos a discutir es el mínimo incremento de consanguinidad por generación, obviamente lo ideal sería contar con

los registros genealógicos de las razas y a partir de allí programar aquellos apareamientos que resultasen con una descendencia menos consanguínea; sin embargo, conocida la falta de esta información, podemos, a partir de la información generada por los microsatélites estimar estas relaciones y así poder, mediante las combinaciones haplotípicas de los diferentes marcadores y la proporción de alelos compartidos, programar los apareamientos de mínima consanguinidad.

En este punto podemos citar el trabajo recientemente publicado por Eding y Meuwiseen (2001). En él se realiza el cálculo de un índice de parentesco a partir de la información generada por los microsatélites, denominado "Índice de Similitud", bastante parecido al índice de parentesco calculado a partir de los registros genealógicos (elevada correlación entre ambos). En dicho trabajo se concluye que en casos de poblaciones con falta de pedigrí (como las aquí plasmadas), la información molecular puede sustituir las estimaciones genealógicas de parentesco y así poder tomar decisiones acertadas para los planes de conservación.

Es así que, la información generada en este trabajo, puede ser utilizada para el cálculo del índice de parentesco (índice de similitud) y así poder programar aquel apareamiento más óptimo entre un macho y una hembra que maximice el llamado Índice de Conservación Genética y minimice la Consanguinidad (F) de un hipotético hijo de la pareja, con lo cuál podemos mantener al máximo la variabilidad genética de las poblaciones.

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de los estudios con el mtDNA, además de proveer las primeras evidencias de estudios moleculares a este nivel, nos permitió observar que las razas asnales presentan un bajo nivel de variación genética mitocondrial. Con respecto a las relaciones filogenéticas los resultados parecen indicar

que el origen evolutivo del asno español podría derivarse de un único y común tronco ancestral con las razas africanas estudiadas y que desde entonces han ido evolucionando de acuerdo a las preferencias de los criadores y al ambiente en el cual se han desarrollando; o bien que, procediendo de dos troncos ancestrales, las actuales razas españolas serían producto de una mezcla de diferentes líneas maternas como consecuencia de la gran afluencia africana que ha tenido España, directa o indirectamente, ya sea a través de los movimientos poblacionales e intercambios que han producido un verdadero trasiego de asnos africanos que se han cruzados con asnos españoles y viceversa (Romagosa, 1959).

En segundo lugar, efectos del tipo "cuellos de botella" o "efectos fundadores" explicarían la inesperada separación de la raza ENC del resto de las razas estudiadas, y en tercer lugar, cabe destacar la gran similitud presentada entre las razas AND y MAJ, ya que estas comparten la mayoría de los haplotipos encontrados (tanto del citocromo b como del D-loop) lo que nos sugiere un posible origen ancestral común o bien que ha existido un gran intercambio de reproductores entre ellas.

Y para finalizar podemos corroborar que el tiempo de divergencia del asno y el caballo a partir del fragmento del D-loop, correspondió a cerca de 9 millones de años, coincidiendo con lo referido por Xu *y col.* (1996); aunque más temprano que lo citado por otros autores (Lindsay *y col.*, 1980; George y Ryder, 1986; Kim *y col.*, 1999) de tan solo 1.5 a 3.5 millones. La diferencia entre las aproximaciones de la divergencia, están relacionadas en primer lugar con la región o fragmento utilizado para el cálculo, y en segundo lugar, por las tasas evolutivas de estos.

Raza Majorera

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. La utilización de marcadores de caballos resultó exitosa y de gran utilidad para los estudios en poblaciones de asnos. Salvo la excepción del microsatélite ASB2 que no amplificó y el HMS1 que fue monomórfico, los demás fueron altamente polimórficos.

2. Las razas asnales españolas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto a sus niveles de variabilidad genética.

3. La probabilidad de exclusión (PE) obtenida con este conjunto de marcadores de 99.99%, resulta de gran utilidad para futuras pruebas de paternidades. El polimorfismo encontrado nos sirve además para la identificación individual de los animales, al igual que la asignación de individuos a raza, la cuál es pieza clave para la gestión del programa de conservación.

4. La diferenciación genética entre las razas asnales fue del 4.1%, siendo como promedio el déficit de heterocigotos por raza del 17.8%. El mayor déficit correspondió a las razas AND, CAT y ZAM, en las cuáles la consanguinidad y la subestructuración reproductiva juegan un papel muy importante. Este último fenómeno parece ser la principal causa de déficit en las razas ENC y MALL.

5. Según el análisis de Weitzman, las razas que aportan mayor diversidad a la población son la CAT con el 29.11% y la AND con el 27.53%, siendo la que menos aporta el asno de las Encartaciones con tan solo un 19.19%. La agrupación AND, CAT y ENC aporta un 78.20% al total de la variabilidad.

6. Las relaciones genéticas mostraron que las razas más próximas fueron siempre la CAT y MALL, estando la AND siempre más alejada de la razas del norte de España y más próxima a la del asno de Marruecos.

7. El análisis del mtDNA permitió detectar tan solo 6 haplotipos a partir del citocromo b y 7 a partir de la región D-loop, mostrando por tanto un bajo nivel de variabilidad en las razas asnales analizadas.

8. Los resultados del mtDNA permiten indicar que el estado actual de las razas asnales españolas parece corresponder al producto de una mezcla de líneas maternas debido posiblemente a un elevado flujo de genes entre ellas, o bien qué, el origen evolutivo del asno español podría derivarse de un único y común tronco ancestral con las razas africanas.

9. El tiempo de divergencia entre el asno y el caballo, correspondió a 9 MYA, similar a otros reportes.

Raza Andaluza

7. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

ADAMETZ, L. (1943). Zootecnia General, Ed. Labor, Madrid, España.

ALDERSON, G.W., GIBBS, H.L., SEALY, S.G. (1999). Parentage and Kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the Brown-headed cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers. *The Journal of Heredity*, **90**, 182-190.

ANONYMOUS. (1992). Recommendations of the FAO expert consultation. En: Hodges J. (Ed.), The Management of Global Animal Genetics Resources. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, pp. 1-24.

APARICIO, G. (1960). Zootecnia Especial. Etnología compendiada. Imprenta Moderna Córdoba.

ARANGUREN-MENDEZ, J.A., JORDANA, J., GOMEZ, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection and Evolution*. **33**, 433-442.

ARMOUR, J.A., NEUMANN, R., GOBERT, S., JEFFREYS A.J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* **3**, 599-605.

ARRANZ, J.J. BAYON, Y., SAN PRIMITIVO, F. (2001). Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Research*, **39**, 3-10.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, G.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

AVISE, J.C., LANSMAN, R.A., SHADE, R.O. (1979). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, **92**, 279-295.

AVISE, J.C., ARNOLD, J. BALL, M.B., BERMINGHAM, E. LAMB, T., NEIGEL, J.E., REB, C.A., SAUNDERS, N.C. (1987). Intraespecif phylogeography: the mitocondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews Ecological Systematic*, **18**, 459-522.

BAILEY, E., GRAVES, K.T., COTHRAN, E.G., REID, R., LEAR, T.L., ENNIS, R.B. (1995). Synteny-mapping horse microsatellite markers using a heterohybridoma panel. *Animal Genetics*. **26,** 80-111.

BARKER, J.S.F. (1999) Conservation of livestock diversity. *Animal Genetic Resources Information*. **25**, 33-43.

BARKER, J.S.F., BRADLEY, D.G., FRIES, R., HILL, W.G. NEI, M., WAYNE , R.K. (1993). An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. FAO Animal Production and Health Division, Rome Italy.

BARKER, J.S.F., MOORE, S.S., HETZEL, D.J.S., EVANS, S., TAN, S.G., BYRNE, K. (1997). Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics*. **28**, 103-115.

BEAUMONT, M.A., BRUFORD, M.W. (1999). Microsatellites in conservation genetics. En: Goldstein, D. and Schötterer, C. (eds.) Microsatellites Evolution and Applications. Cap. 13, pp.165-182. Oxford University Press, New York.

BELLONE, R.R., COTHRAN, E.G., KETCHUM, M.S. (1998). Genetic variation in the rare donkey breed, Baudet du Poitou. *Animal Genetics*. **29,** (Suppl. 1), 17.

BINNS, M.M., HOLMES, N.G., HOLLIMAN, A., SCOTT A.M. (1995). The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use Thoroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal*. **151**, 9-15.

BJØRNSTAD, G., GUNBY, E., RØED, K.H. (2000). Genetic structure of Norwegian horse breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **117**, 307-317.

BLOTT, S.C., WILLIAMS, J.L., HALEY, C.S. (1998). Genetics relationships among European cattle breeds. *Animal Genetics*. **29**, 273-282.

BODO, I. (1992). The minimum number of preserved populations. En: Hodges, J. (ed.) The management of global animal genetic resources. Paper 104, 91-105. Rome: FAO Animal Production and Health.

BOTSTEIN, D., WHITE R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. **32,** 314-331.

BOWCOCK, A.M., RUIZ-LINARES, A., TOMFOHRDE, J., MINC, E., KIDD, J.R., CAVALLI-SFORZA, L.L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature.* **368**, 455-457.

BOWLING, A.T, CLARK, R.S. (1985). Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses of United States. *Anim. Blood Gr. and Biochem. Genet.* **16**, 93-108.

BOWLING, A.T., EGGLESTON-STOTT, M.L., BYRNS, G., CLARK, R.S., DILEANIS, S., WICTUM, E. (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics.* **28**, 247-252.

BOWLING, A.T., DEL VALLE, A., BOWLING, M. (1998). Verification of horse maternal lineage based on derived mitochondrial DNA séquense. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* **115**, 351-355.

BOWLING, A.T. (2001). Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. *Livestock Production Science*. **72**, 11-116.

BOZZINI, M., EGGLESTON-STOTT, M., DEL VALLE, A., ZIEGLE, Y. (1997). Addition of degenerate primer in multiplex PCR,s corrects the equine microsatellite locus HMS7 null allele in the Quarter horse. Abstracts P50. Plant & Animal Genome V Conference.

BREEN, M., DOWNS, P., IRVIN, Z., BELL, K. (1994). Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalski's horse (*E. przewalskii*). *Animal Genetics.* **25**, 401-405.

BREEN, M., LINDGREN, G., BINNS, M.M. (1997). Genetical and physical assignments of equine microsatellites –First integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome*. **8**, 267-273.

BROWN, W.M., GEORGE, M.Jr., WILSON, A.C. (1979). Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* **76**, 1967-1971.

CABALLERO, A., TORO, M.A. (2002). Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics.* (In Press).

CAMAC, R.O (1989). Introduction and Origins of the Donkey. En: Svendsen E. D. (Ed.), The professional handbook of the Donkey, 2nd edn., The Donkey Sanctuary, Sidmouth, Devon, pp. 1-10.

CAÑON, J., CHECA, M.L., CARLEOS, C., VEGA-PLA, J.L., VALLEJO, M., DUNNER S. (2000). The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*. **31**, 39-48.

CAVALLI-SFORZA, L.L., EDWARDS, W.F. (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. **19**, 233-257.

CAVALLI-SFORZA, L.L., MENOZZI, P., PIAZZA, A. (1994). *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

CHAKRABORTY, R., JIN, L. (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness ans population distance. En: PENA, S.D.J., CHAKRABORTY, R., EPPLENJ, J.T., JEFFREYS, A.J. (eds.). DNA finger-printing: state and the science. Birkhäuser Verlag, Basel. Switzerland. pp. 153-175.

CHENG, H.H., CRITTENDEN, L.B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*. **73,** 539-546.

CHENG, H.H., LEVIN, I., VALLEJO, R.L., KHATIB, H., DODGSON, J.B., CRITTENDEN, L.B., HILLEL, J. (1995). Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*. **74,** 1855-1874.

CHESSER, R.K. (1983). Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. *Evolution*. **37**, 320-331.

CLUTTON-BROCK, J. (1987). A natural history of domestic mammals, Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge.

COTHRAN, E.G., KOVAC, M. (1997). Genetic analysis of the Croatian Trakehner and Posavina horse breeds. *Zivocišna Výroba*. **42**, 207-212.

CORNUET, J.M., PIRY, S., LUIKART, G., ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. **153**, 1989-2000.

CROW, J.F., KIMURA, M. (1970). An introduction to population genetics theory. New York, Evanston and London. Harper and Row Publishers.

DAWSON, R.J.G., GIBBS, H.L., HOBSON, K.A., YEZERINAC, S.M. (1997). Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*. **79**, 506-514.

DI RIENZO, A. PETERSON, A.C., GARZA, J.C., VALDES, A.M., SLATKIN, M., FREIMER, N.B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* **91**, 3166-3170.

DELGADO, J.V., FRESNO, M.R., BARBA, C., HERNANDEZ, J., RODERO, E., SIERRA, A.C. (1998). El burro Majorero decripción etnogenética y funcional. 3er Coloquio Internacional sobre equidos de trabajo. Mexico, Univ. Nacional Autonoma de Mexico. pp. 343-348.

DODGSON, J.B., CHENG, H.H., OKIMOTO, R. (1997). DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*. **76,** 1108-1114.

EDING, H. LAVAL, G. (1999). Measuring genetic uniqueness in livestock. En: OLDENBROEK, K. (ed.) Genebanks and the management of farm animal genetic resources, IDO-DL press. The Netherlands, pp. 33-58.

EDING, H., MEUWISEEN, T.H.E. (2001). Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* **118**, 141-159.

EISEN, J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. En: Goldstein, D. and Schötterer, C. (eds.) Microsatellites Evolution and Applications. Cap. 4, pp.34-48. Oxford University Press, New York

ELLEGREN, H., JOHANSSON, M., SANDBERG, K., ANDERSSON, L. (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Animal Genetics*. **23,** 133-142.

EPSTEIN, H. (1984). Ass, mule and onager. En: Mason, I. L. (ed.) Evolution of domesticated animals. pp 174-184. Longman, London and New York.

ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M., CORNUET, J.M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera L.*) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. **140**, 679-695.

ESTOUP, A., COURNET, J-M. (1999). Microsatellite evolution : inferences from population data. En: Goldstein, D. and Schlötterer, C. (eds.) Microsatellites Evolution and Applications. Cap. 5, pp.49-65. Oxford University Press, New York.

FALK, D.A. (1991). Joining biological and economic models for conserving plant genetic diversity. En: Falk DA *et al* (ed.,).*Genetics and conservation of rare plants*. pp 209-224. Oxford University Press, New York.

FAO. (1995). World watch list for Domestic Animal Diversity. 2nd Ed. FAO, Rome.

FARID, A., O`REALLY, E., DOLLARD, C., KELSEY, Jr. C.R. (2000). Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*. **80**, 9-17.

FELSENSTEIN, J. (1995). Phylip (Phylogeny Inference package), Version 3.57c. University of Washington, Seattle, WA.

FOLCH, P. (1998). Programa de conservació i manteniment de recursos genètics animals en la raça asinina Catalana. Tesis Doctoral, Universidad Autònoma de Barcelona. España.

FORBES, S.H., HOGG, J.T., BUCHANAN, F.C., CRAWFORD, A.M., ALLENDORF, F.W. (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: Domestic and Bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution*. **12**, 1106-1113.

GARCÍA-DORY, M.A., MARTÍNEZ, S., OROZCO, F. (1990). Guía de campo de las razas autóctonas españolas, Alianza Editorial, Madrid.

GEORGE, M.Jr., RYDER, O.A. (1986). Mitochondrial DNA evolution in the gene Equus. *Molecular Biology and Evolution*. **3**, 535-546.

GOLDSTEIN, D.B., RUIZ-LINARES, A., CAVALLI-SFORZA, L.L., FELDMAN, M.W. (1995). Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **92**, 6723-6727.

GOLDSTEIN, B.D., SCHLÖTTERER C. (1999). Microsatellites: evolution and applications. *Oxford University Press, New York*; 352pp.

GÓMEZ, M. (1997). Razas autóctonas Vascas. Catálogo etnológico. Ed. Mesa técnica de Recursos Genéticos Animales. Fondo de cooperación Euskadi-Aquitania. Vitoria-Gasteiz. pp. 43.

GONZÁLEZ-CANDELAS, F., MONTOLIO, A. (2000). Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. *The Journal of Heredity*. **91**, 134-141.

GOUDET, J. (2000). FSTAT Ver. 2.9.1. Computer package for PCs. Institute of ecology, Biology building, UNIL, CH-1015 Lausane, Switzerland.

GROSSMANN, L.I., SHOUBRIDGE, E.A. (1996). Mitochondrial genetics and human disease. *BioEssays*. **18**, 983-991.

GUERIN G., BERTAUD M., AMIGUES Y. (1994). Characterisation of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS4, HMS5, HMS6, HMS7, and HMS8. *Animal Genetics*. **25**, 62.

GUIFFRA, E., KIJAS, J., AMARGER, V., CARLBORG, J., JEON, T. ANDERSON, L. (2000). The origin of domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. **154**, 1785-1791.

GUO, S.W., THOMPSON, E.A. (1992). Performing the exact of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. **48**, 361-372.

HALL, S.J.G. (1993).Strategies for genetic improvement of local livestock and their consequence for conservation. En: CARTWRIGHT, A. (ed.) World Agriculture. Sterling Publishing Group PLC, London. pp. 75-77.

HANCOCK, J. (1999). Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (Eds.), Microsatellites. Evolution and Applications, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.

HARDY, G.H. (1908). Mendelian proportion in a mixed population. *Science*. **28**, 49-50.

HIENDLEDER, S., MAINZ, K., PLANTE, Y. LEWASLSKI, H (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *The Journal of Heredity*. **89**, 113-120.

HORIN, P., COTHRAN, E. G., TRTKOVA, K., MARTI, E., GLASNAK, V., HENNEY, P., VYSKOCIL, M., LAZARY, S. (1998). Polymorphism of Old Kladruber horses, a surviving but endangered baroque breed. *Eur. J. Immunogenet.* **25**, 357-363.

HUTCHISON, C.A., NEWBOLD, J.E., POTTER, S.S., HALL, E.M. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*. 251, 535-546.

ISHIDA, N., HASEGAWA, T., TAKEDA, K., SAKAGAMI, M., ONISHI, A., INUMARU, S., KOMATSU, M., MUKOYAMA, H. (1994). Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*. **25**, 215-221.

ISHIDA, N., OYUNSUREN, T., MASHIMA, S., MUKOYAMA, H. SAITOU, N. (1995). Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus Equus with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalski´s wild horse and domestic horse. *Journal of Molecular Evolution*. **41**, 180-188.

JAMIESON, A. (1994). The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*. **25,** (Suppl. 1), 37-44.

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. (1985). Hypervariable "minisatelite" regions in human DNA. *Nature*. **314**, 67-73.

JONES, A.G., ÖSTLUND-NILSSON, S., AVISE, J.C. (1998). A microsatellite assessment of sneaked fertilizations and eggs thievery in the fifteenspines stickelback. *Evolution*. **52**, 848-858.

JORDANA, J., PIEDRAFITA, J., SANCHEZ, A., PUIG, P. (1992). Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds. *The Journal of Heredity*. **83**, 367-374.

JORDANA, J., FOLCH, P. (1997). The Catalonia donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed. *Archivos de Zootecnia*. **47**, 403-409.

JORDANA, J., FOLCH, P., SANCHEZ, A. (1999). Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalonian donkeys. *Biochemical System Ecology*. **27,** 791-798.

JORDANA, J., FOLCH, P., ARANGUREN, J.A. (2001). Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **118**, 57-63.

KANTANEN, J., OLSAKER, I., HOLM, L.-E., LIEN, S., VIKKI, J., BRUSGAARD, K., EYTHORSDOTTIR, E., DANELL, B., ADALSTEINSSON, S. (2000). Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity*. **91**, 446-457.

KIM, K.L., YANG, Y.H., LEE, S.S., PARK, C., MA, R., BOUZAT, J.L., LEWIN, H.A. (1999). Phylogenetic relationships of Cheju horse to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*. **30**, 102-108.

KUMAR, S. TAMURA, K., JOKOBSEN, I.B., NEI, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Análisis software. Arizona State University. Tempe, Arizona, USA.

LAND, R.B. (1986). Genetic resources requirements under favourable production marketing systems: priorities and organization. En: 3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Lincoln (USA), Univ. of Nebraska. Vol XII, pp 486-491.

LAU, C.H., DRINWATER, R.D., YUSOFF, K., TAN, S.G., HETZEL, D.J.S., BARKER, J.S.F. (1998). Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): Mitochondrial DNA Dloop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*. **29**, 253-264.

LAVAL, G., IANNUCCELLI, N., LEGAULT, C., *ET AL*. (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection and Evolution*. **32**, 187-203.

LEVIN, I., SANTAGELO, L., CHENG, H., CRITTENDEN, B., DODGSON, B. (1994). An autosomal genetic linkage map of the chicken. *The Journal of Heredity*. **85**, 79-85.

LINDSAY, E.H., OPDYKE, N.D., JOHNSON, N.M. (1980). Pliocene dispersal of the horse *Equus* and late Cenozoic mammalian dispersal events. *Nature*. **287,**135-138.

LITT, M., LUTY, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. **44**, 397-401.

LITTAUER, M.A., CROUWEL, J.H. (1979). Wheeled vehicles and ridden animals in the ancient near east. Brill, Leiden and Köln.

LOFTUS, R.T., MACHUGH, D.E., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M., CUNNINGHAM, P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.*. **91**, 2757-2761.

LORENZO, J. (1997). Conocimiento y conservación de las razas autóctonas: "El asno Zamorano-Leonés" estudio del estado actual de la raza en la provincia de Zamora; valoración general: Aspectos biopatológicos y funcionales, Tesis Doctoral, Universidad de León, España.

MACHUGH, D.E., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellites markers *Animal Genetics* **29**, 333-340.

MAIJALA, K., CHEREKAEV, A.V., DEVILLARD, J.M., REKLEWSKI, Z., ROGNONI, G., SIMON, D.L., STEANE, D.E. (1984). Conservation of animal genetic resources in Europe. Final of an E.A.A.P., working party. *Livestock Production Science.* **11**, 3-22.

MANNEN, H., TSUJI, S., LOFTUS, R.T., BRADLEY, D.G. (1998). Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (*Bos taurus*). *Genetics.* **150**, 1169-1175.

MARKLUND, S., ELLEGREN, H., ERIKSSON, S., SANDBERG, K., ANDERSSON, L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics.* **25,** 19-23.

MASON, I.L. (1974). Introduction to round table a: The conservation of animal genetic resources. Proceedings of the 1st World Congress of Applied Livestock Production. **2**, 13-21.

MINCH, E., RUIZ-LINARES, A., GOLDSTEIN, D.B., FELDMAN, M.W., CAVALLI-SFORZA L.L. (1995). MICROSAT (version 1.4): a computer program for calculating various statics on microsatellite allele data. www: http://lotka.stanford.edu/research/distance.html.

MOAZAMI-GOUDARZI, K., LALOË, D., FURET, J.P., GROSCLAUDE, F. (1997). Analysis of genetic relationship between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics.* **28**, 338-345.

MULLIS, K.B., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring. *Harb. Symp.Quant.Biol.* **51**, 263-273.

MUNDY, N.I., WOODRUFF, D.S. (1996) Polymorphic microsatellite markers in the loggerhead shrike, *Lanius ludovicianus*, isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology*. **5**, 811-813.

MURRAY, B.W. (1996). The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. Http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html

NAGAMINE, Y., HIGUCHI, M. (2001). Genetic distance and classification of domestics animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **118**, 101-109.

NAUTA, M.J., WEISSING, F.J. (1996). Constrains on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*. **143**, 1021-1032.

NAVERO, L.M. (1987). Aportación al conocimiento y la problemática del garañon Andaluz-Cordobes. (ADEBO).

NEI, M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist*. **106**, 283-292.

NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **70**, 3321-3323.

NEI, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet*. **41**, 225-233.

NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**, 583-590.

NEI, M., LI, S. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **76**, 5269-5273.

NEI, M., TAJIMA, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. **97**, 145-163.

NEI, M., TAJIMA, F., TATENO, T. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal Molecular and Evolution*. **19,** 153-170.

NEI, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.

NEUMAN, K., WETTON, J.H. (1996). Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Molecular Ecology*. **5,** 307-309.

NOZOWA, K., SHOTAKE, T., KAWAMOTO, Y. (1998). Phylogenetic relationship among Japanese native and alien horses estimated by protein polymorphisms. *Journal of Equine Science*. **9**, 53-69.

OTA, T. (1993). DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis, Pennsylvania State University, University Park, PA.

PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I., STROBECK, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*. **4**, 347-354.

PAYERAS, L. FALCONER, J. (1998). Races autóctones de les Illes Baleares. Govern Balear. Palma de Mallorca, España. pp 445.

PEELMAN, L.J., MORTIAUX, F., VAN ZEVEREN, A., DANSERCOER, A., MOMMENS, G., COOPMAN, F., BOUQUET, Y., BURNY, A., RENAVILLE, R., PORTETELLE, D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*. 29, 161-167.

PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., SCHMOLL, F., HORST, P., SCHELLANDER, K. (1999). Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in Chicken. *The Journal of Heredity*. **90,** 656-659.

PREVOSTI, A., OCANA, J., ALONZO, G. (1975). Distances between population for *Drosophila subobscura* based on chromosome arrangement frequencies. *Theorical Applied Genetics*. **45**, 231-241.

PRIM, R.C. (1957). Shortest connection networs and some generalizations. *Bell System Technical Journal.* **36**, 1389-1401.

PRIMMER, C.R., ELLEGREN, H. (1998) Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*. **15,** 997-1008.

RAMÍREZ de la FE, A.R., SOTILLO, F., SOTILLO, J.L. (1996). Razas asnales. En: BUXADÉ, C. (ed.), Producciones equinas y de ganado de lidia. Zootecnia, Tomo XII. Bases de Producción Animal. Capítulo X. Ediciones Mundi-Prensa. España, pp. 152-163.

RANNALA, B., MOUNTAIN, J. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* **94**, 9197-9201.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. (1995). GENEPOP (Version 3.1): Population genetics software for exact test and ecumenicism, *The Journal of Heredity*. ***86***, 248-249.

RENWICK, A., DAVINSON, L., SPRATT, H., PATRICK KING, J., KIMMEL, M. (2001). DNA Dinucleotide evolution in Humans: fitting theory to facts. *Genetics.* **159**, 737-747.

REYNOLDS, J., WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics.* **105**, 767-769.

ROCHAMBEAU, H., FOURNET-HANOCQ, F., VU TIEN KHANG, J. (2000). Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech*. **49**, 77-93.

RODERO, E., VALERA, M., HERRERA, M., Y GÓMEZ, M. (1998) Situación actual de la población asnal autóctona española. *Archivos de Zootecnia*, **179**, 523-528.

ROGERS, J.S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. En: Studies in Genetics VII. University of Texas Publication 7213, pp. 145-153.

ROHLF, F.J. (2001). NTSYS-pc Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System. Ver. 2.10j. Exeter publications, New York, USA.

ROMAGOSA, J.A. (1959). El Garañón Catalán, Tesis Doctoral, Universidad de Madrid, España.

RUANE, J. (1999). A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* **116**, 317-323.

SAITBEKOVA, N., GAILLARD, C., OBEXER-RUFF, G., DOLF, G. (1999). Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics.* **30**, 36-41.

SAITOU, N., NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**, 406-425.

SALVANS, L., TORRENS, M. (1959). Ganado asnal y ganado mular. Editorial Salvat. Barcelona. España.

SAS.® (1996). Institute Inc., SAS® User's Guide: Statistics. Version 6.12. Cary, NC, USA.

SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. **20,** 211-215.

SCHMID, M., SAITBEKOVA, C., DOLF, G. (1999). Genetic diversity in Swiss cattle breeds, *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **116**, 1-8.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. EXCOFFIER, L. (2000). Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SELANDER, R.B., KAUFMAN, D.W. 1975. Genetic structure of populations of the brown snail (Helix apersa): I. Microgeographic variation. *Evolution*. **29**, 385-401.

SIMONS, D.L. (1984). Conservation of animal genetic resources. A review. *Livestock Production Science*. **11**, 23-36

SLATKIN, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*. **47**, 264-279.

SOTILLO, J.L., SERRANO, V. (1985). Producción animal 1, Etnología Zootecnia, Tebar-Flores, Madrid.

STAHLBERGER-SAITBEKOVA, N., SCHLÄPFER, J., DOLF, G., GAILLARD, C. (2001). Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **118**: 379-387.

SWOFFORD, D.L., SELANDER, R. (1999). BIOSYS-2: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics (Release 2.0). University of Illinois, Urbana, Champaign, IL.

TAKAHATA, N., NEI, M. (1985). Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics*. **110**, 325-344.

TAKEZAKI, N., NEI, M., (1996). Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. **144,** 389-399.

TAMURA, K., NEI, M. (1993). The control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. **10**, 512-526.

TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.

TAUTZ, D., SCHLÖTTERER, C. (1994). Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*. **4,** 832-837.

THAON D'ARNOLDI, C., FOULLEY, J.L., OLLIVER, L. (1998). An overview of the Weitzman approach to diversity. *Genetics Selection and Evolution*. **30**, 149-161.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. **24**, 4876-4882.

TIVANG, J.G., NIENHUIS, J., SMITH, O.S. (1994). Estimation of sampling variance of molecular data using the bootstrap procedure. *Theoretical and Applied Genetics*. **89**, 259-264.

VAN HAERINGEN, H., BOWLING, A.T., STOTT, M.L., LENSTRA, J.A., ZWAAGSTRA, K.A. (1994). A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20, *Animal Genetics*. ***25,*** 207.

VANCE, J.F., OTHMANE, K.M. (1998). Methods of genotyping. In Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. (eds.) Approaches to gene mapping in complex human diseases. Cap. 9. pp 213-228. A John Wiley & Son, Inc., Publication. NY.

VANHALA, T., TUISKULA-HAAVISTO, M., ELO, K., VILKKI, J., MÄKI-TANILA, A. (1998). Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*. **77,** 783-790.

VIGILANT, L. STONEKING, M., HARPENDING, H., HAWKES, K., WILSON, A.C. (1991). African population and evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. **253**, 1503-1507.

VILA, C., AMORIM, I.R., LEONARD, J.A., POSADA, D., CASTROVIEJO, S.J., PETRUCCI-FONSECA, F., CRANDALL, K.A., ELLERGREEN, S.H. WAYNE, R.K. (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*. **8**, 2089-2103.

WEBER, J,L., MAY, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chaind reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 388-396.

WEBER, J.L., WONG, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics.* **2,** 1123-1128.

WEIMBERG, W. (1908). Über den Nachweis der Vererbung beim Menschem. *Jh. Ver. Vaterl Naturk*. **64**, 369-382.

WEIR, B.S. COCKERHAM, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* **38**, 1358-1370.

WEIR, B.S. (1990). Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Masachusetts. 377 p.

WEIR, B.S. (1996). Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Masachusetts.

WEITZMAN, M.L. (1992). On diversity. *The Quarterly Journal of Economics*. **107**, 363-405.

WEITZMAN, M.L. (1993). What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. *The Quarterly Journal of Economics.* **108**, 157-183.

WRIGHT, S. (1965). Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution.* **19**, 395-420.

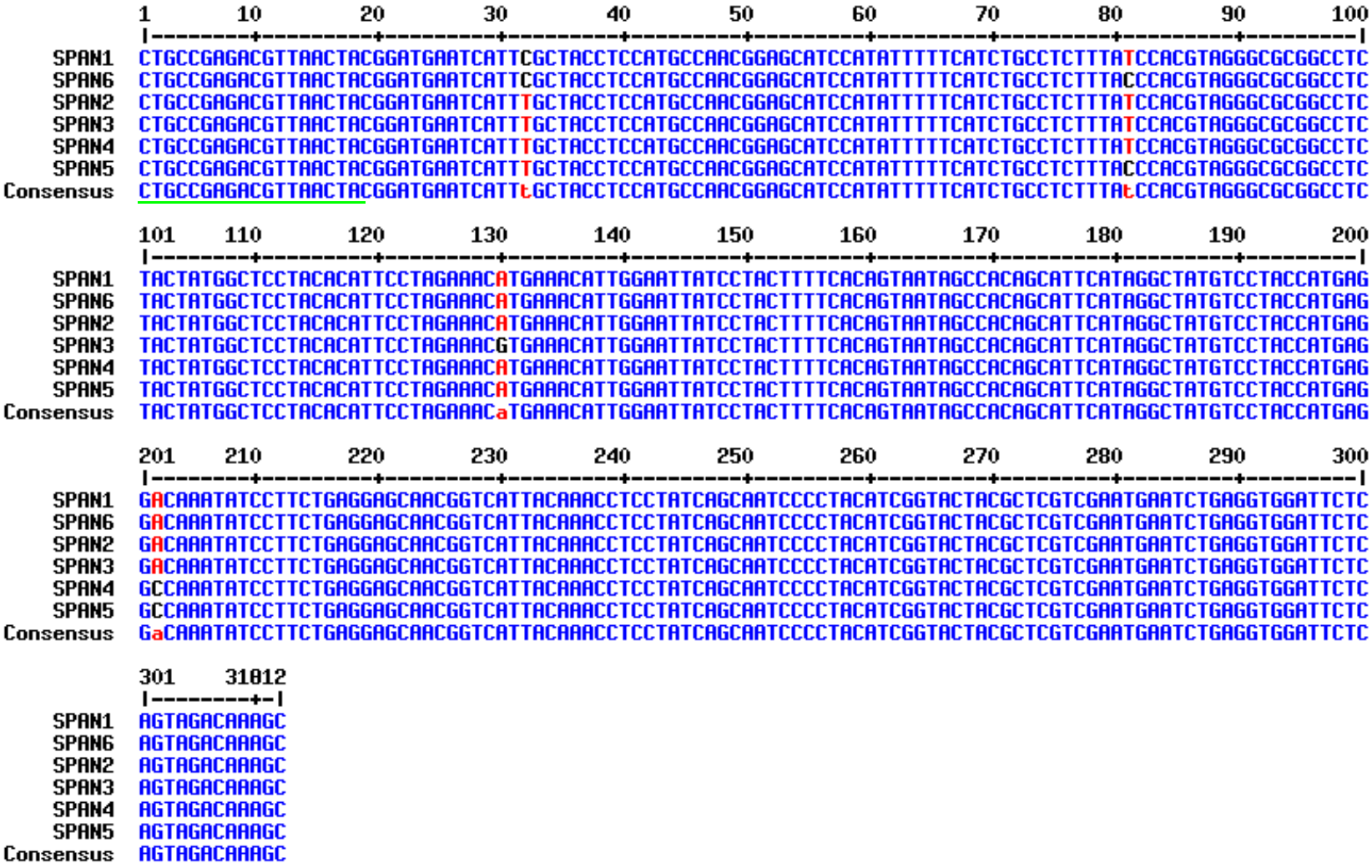
XU, X., GULLBERG, A., ARNANSON, U. (1996). The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *Journal Molecular and Evolution*. **43**, 438-446.

YANES, G.J. (1999). El asno Zamorano-Leonés, una gran raza autóctona. Diputación de Zamora, España.

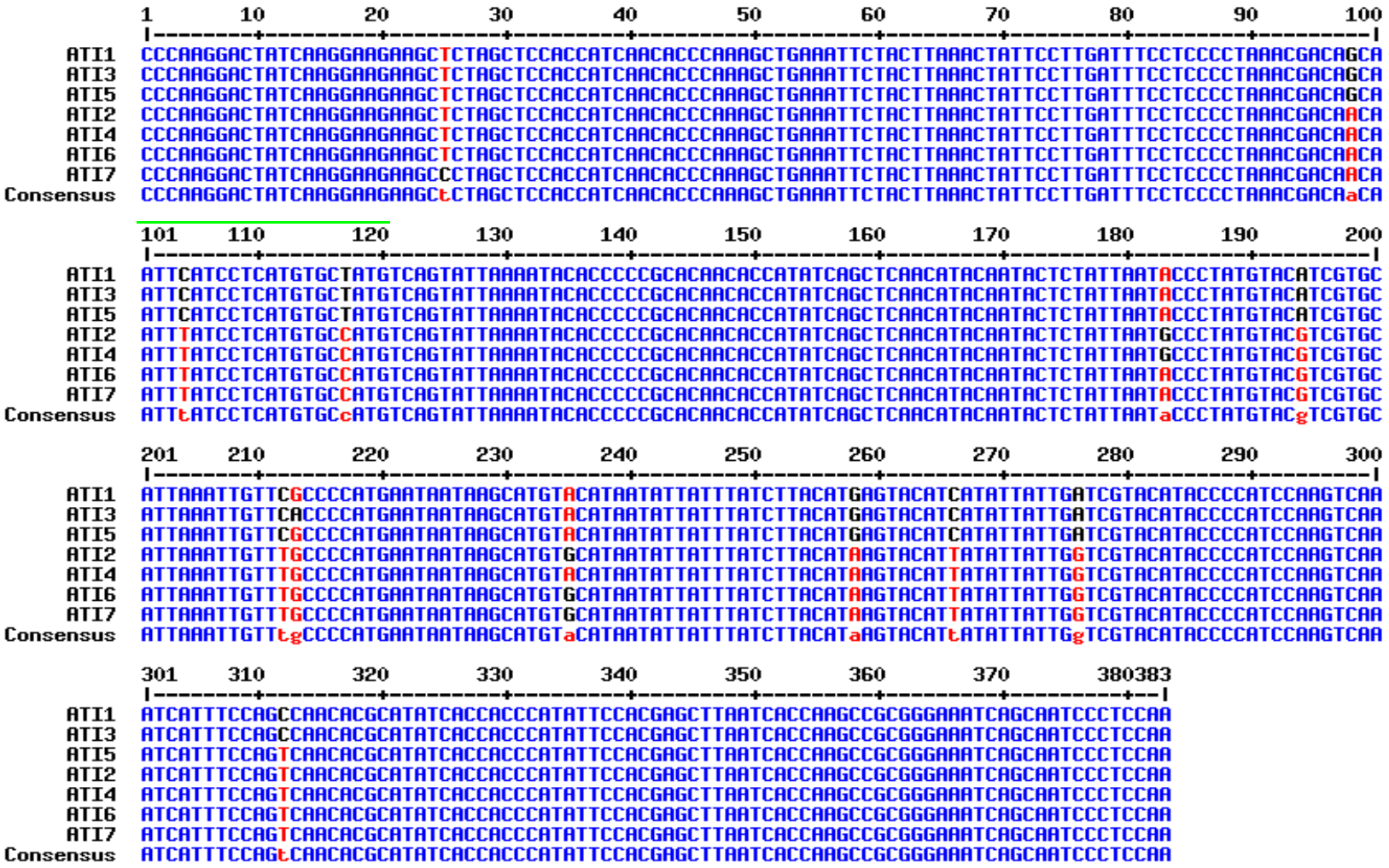
ZAPATA, C. (1987). La variabilidad genética de las poblaciones. En: J. ESPINOSA de los MONTEROS y U. LABARTA (eds.). Genética de la acuicultura. pp. 33-57. Caicyt-Feuga, Madrid.

Raza Catalana

8. ANEXOS



Anexo 1. Secuencias haplotípicas del citocromo b en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al *primer* CITB-F.



Anexo 2. Secuencias haplotípicas del D-loop en las razas asnales españolas. La región marcada corresponde al *primer* DONK-A.

Sub Poblaciones	A1	A2	A3	C1	C2	C3	M1	M2	M3	M4	E1	E2	E3	Z1	Z2
AND2	**.072**														
AND3	**.051**	**.049**													
CAT1	.084	.119	.042												
CAT2	.078	.099	.041	**.023**											
CAT3	.118	.188	.084	**.035**	**.057**										
MALL1	.097	.121	.043	.037	.060	.075									
MALL2	.075	.110	.057	.040	.073	.085	**.007**								
MALL3	.081	.124	.057	.040	.073	.085	**.045**	**.037**							
MALL4	.055	.076	.028	.029	.050	.088	**.033**	**.013**	**.014**						
ENC1	.065	.114	.049	.053	.071	.084	.062	.052	.033	.041					
ENC2	.040	.082	.041	.039	.047	.068	.058	.046	.035	.018	**.014**				
ENC3	.053	.078	.029	.036	.036	.071	.043	.045	.036	.022	**.012**	**.012**			
ZAM1	.047	.070	.034	.056	.077	.091	.054	.044	.041	.016	.054	.031	.037		
ZAM2	.046	.070	.034	.059	.060	.106	.065	.064	.071	.037	.070	.040	.026	**.015**	
ZAM3	.076	.118	.043	.053	.074	.092	.059	.072	.090	.006	.084	.067	.058	**.047**	**.052**

Anexo 3. Distancias F_{ST} entre las subpoblaciones de los asnos españoles (en negritas distancias dentro de razas).

ANEXO 4

Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers.

Manuscrito publicado en la Revista *Genetics, Selection and Evolution*

(Volumen 33 (2001) 433-442)

Genet. Sel. Evol. 33 (2001) 433–442
© INRA, EDP Sciences, 2001

Original article

Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers

José ARANGUREN-MÉNDEZ[a,b], Jordi JORDANA[a,*], Mariano GOMEZ[c]

[a] Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain
[b] Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción Animal, Maracaibo 4001-A, Venezuela
[c] Servicio de Ganadería, Diputación Foral de Bizkaia, Avda. Lehendakari Aguirre, 9, 2 °, 48014 Bilbao, Spain

(Received 27 November 2000; accepted 23 April 2001)

Abstract – Genetic diversity at 13 equine microsatellite loci was compared in five endangered Spanish donkey breeds: Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones and Zamorano-Leonesa. All of the equine microsatellites used in this study were amplified and were polymorphic in the domestic donkey breeds with the exception of HMS1, which was monomorphic, and ASB2, which failed to amplify. Allele number, frequency distributions and mean heterozygosities were very similar among the Spanish donkey breeds. The unbiased expected heterozygosity (H_E) over all the populations varied between 0.637 and 0.684 in this study. The low G_{ST} value showed that only 3.6% of the diversity was between breeds ($P < 0.01$). Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were shown for a number of locus-population combinations, except HMS5 that showed agreement in all analysed populations. The cumulative exclusion probability (PE) was 0.999 in each breed, suggesting that the loci would be suitable for donkey parentage testing. The constructed dendrogram from the D_A distance matrix showed little differentiation between Spanish breeds, but great differentiation between them and the Moroccan ass and also with the horse, used as an outgroup. These results confirm the potential use of equine microsatellite loci as a tool for genetic studies in domestic donkey populations, which could also be useful for conservation plans.

donkey / endangered breed / microsatellite / diversity / genetic variability

1. INTRODUCTION

The local Spanish donkey breeds (*Equus asinus*) Andaluza, Catalana, Encartaciones, Mallorquina and Zamorano-Leonesa have suffered a substantial decrease in population size which might cause high levels of inbreeding

* Correspondence and reprints
E-mail: Jordi.Jordana@uab.es

resulting in inbreeding depression and increasing the risk of breed extinction. The principal cause of the great reduction in population size of up to 80% has been the intense mechanisation of agriculture which took place in Spain during the 60s and the 70s. These Spanish donkey breeds have been officially recognised as breeds for a long time. Currently, the number of animals recorded among these five breeds is very low, and they are included in the FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) list of domestic animal breeds to be conserved (FAO, DAD-IS http://fao.org/dad-is). At present, the Spanish donkey breeds comprise approximately 100 to 200 females each (Breed Associations personal communications). These figures fit into the category of an endangered breed as proposed by the FAO Expert Consultation [2]. Without immediate action, the effective population size of these five Spanish breeds will be inadequate to prevent constant genetic loss at each generation [8].

The origin of the modern Spanish donkey breeds remains uncertain. According to several authors [1,12,13,15] current Spanish donkeys seem to derived from two ancestral sources: the Nubian ass (*Equus asinus africanus*), which gave rise to the Andaluza breed [3,16,40], and secondly, the Somalian ass (*Equus asinus somaliensis*) which gave rise to the donkeys of Southwest Asia and probably also to the majority of European breeds, among which the Catalana, Mallorquina, Encartaciones and Zamorano-Leonesa breeds [15].

Notwithstanding this, Dechambre and Sanson, as cited by several authors [3, 24,37,40], support the theory of two different ancestral sources: one which would correspond to the *Equus asinus africanus*, originating from Northeast Africa, and the other one, the *Equus asinus europeus*, whose area of origin is the Mediterranean Basin, in particular the Balearic Isles, which would have given rise to the majority of European donkey breeds, including the four Spanish breeds mentioned in the previous paragraph.

The conservation of genetic variation found in these minor livestock breeds is a growing world-wide concern due to the increasing risk of breed loss. Recently, many studies of breed conservation have used allele frequencies for several DNA markers, such as microsatellites [19,26,36].

Very little literature reporting microsatellite data in domestic donkeys exists; only Breen *et al.* [10], using a set of 13 microsatellite loci isolated from the domestic horse, verified that they were well-amplified in eight individuals. In addition, Bellone and co-workers [7] reported studies in one French donkey breed (Baudet du Poitou) with nine microsatellite loci. Finally, we also performed studies with the Catalonian donkey breed [22,23]. In the present work, 15 equine microsatellite loci were analysed in 5 Spanish donkey breeds, in order to study the genetic variability both within and between these breeds.

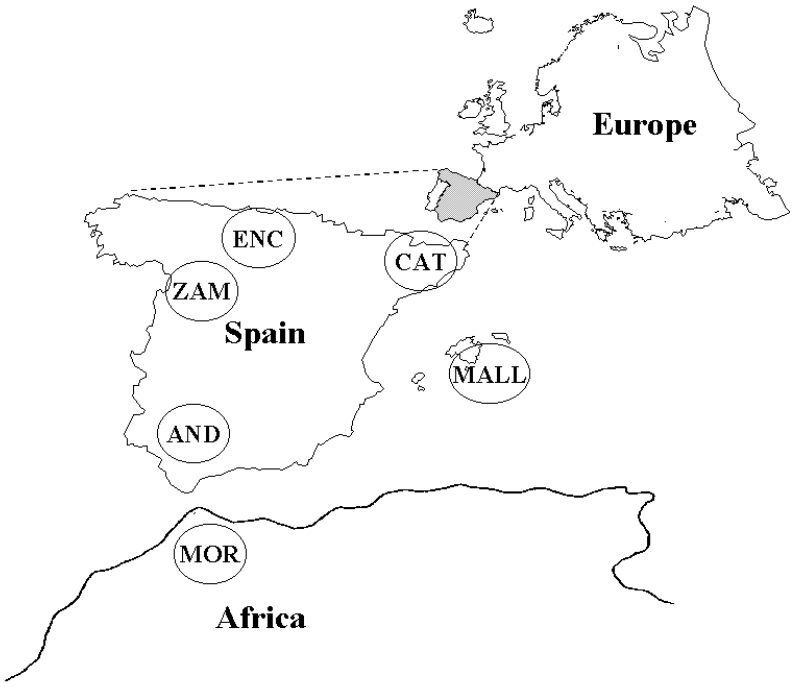


Figure 1. Geographical location of the Spanish donkey breeds.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Population samples

The number of individuals sampled, of both sexes, was 87 Andaluza (AND), 140 Catalana (CAT), 104 Mallorquina (MALL), 74 Encartaciones (ENC) and 108 Zamorano-Leonesa (ZAM) representing 75 and 95% of the whole population in each case. The area of main distribution of these indigenous Spanish breeds is shown in Figure 1. In addition, 9 Moroccan asses (MOR) were used as genuine members of *E. asinus africanus*, and 24 horses of the Merens breed (*E. caballus*) were used as an outgroup. Donkey DNA was prepared from whole blood according to standard methods involving lysates of the washed white-cells and phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) extraction [4].

2.2. Microsatellite markers

The 15 microsatellite loci studied were AHT4, AHT5 [6], ASB2 [11], HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 [17], HTG4, HTG6 [14], HTG7, HTG10 [25], HTG15 [5] and VHL20 [41].

2.3. Multiplex PCR conditions

The 15 microsatellites were amplified in three multiplexes using fluorescently-labelled primers. The first multiplex included microsatellites ASB2, HMS3, HMS6, HTG6, HTG10, and VHL20. The second was composed of AHT4, AHT5, HMS2, HMS7 and HTG7, while the third contained HMS1, HMS5, HTG15 and HTG4. Multiplex PCRs were carried out in 15 μL reactions containing 30 ng of genomic DNA, 200 μM of dNTP, 0.5 μL of AmpliTaq Gold (5 U $\cdot$ μL^{-1}), 1.5 mM of $MgCl_2$ and 0.5 μL of each primer (AHT4, ASB2, HMS2, HMS3, HTG6, HTG7, HTG10), 0.4 μL of the primer (AHT5, HMS6 and HMS7) while 0.3 μL of primer VHL20 (StockMarks® for Horses, Equine Paternity PCR Typing Kit, PE Applied Biosystems, Foster City, CA), and finally, 0.20 μM of primers HMS1, HMS5, HTG4 and HTG15. PCR was carried out in a 9 700 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer) by an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 60 s. The thermal profile ended with a final extension at 72 °C for 60 min. PCR products were detected by capillary electrophoresis using an Applied Biosystems 310 DNA Sequencer with GENESCAN Analysis software (ABI), using the ROX 350 bp internal-size standard.

2.4. Statistical analyses

Allele frequencies (available from the authors on request) and mean heterozygosity values for each polymorphic locus were obtained using the BIOSYS-2 computer programme [38]. The test of genotype frequencies for deviation from the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was calculated using the exact test of the GENEPOP 3.1d computer programme [32], using the Markov-chain method [18]. Polymorphic information content (PIC) was calculated for each microsatellite locus according to Botstein *et al.* [9], and the probability of exclusion (PE) was determined for all informative markers [20].

The average expected heterozygosity for each population (H_S), the gene diversity in the total population (H_T), and the coefficient of gene differentiation G_{ST} [27] were estimated using the computer programme DISPAN [30], and tested by permutation test. Differences in average heterozygosities among breeds were assessed using the ANOVA test of the SAS® package [35].

Genetic distances and phylogenetic trees among populations were obtained with the distance measure D_A [29]. Takezaki and Nei [39] suggested the D_A distance for making phylogenetic trees when the interest of the study mainly focused on the topology rather than evolutionary time. Distance data was analysed with the neighbour-joining (NJ) method of clustering [34]. The NJ method produces only unrooted trees. For this reason we included the data for the Merens breed population as an outgroup to root the tree. The robustness of the dendrogram was evaluated by bootstrap resampling of loci (1 000 replicates). All these calculations were carried out using the DISPAN package [30].

Table I. Total number and range of observed alleles, average heterozygosity H_S and H_T, coefficient of differentiation G_{ST}, PIC and PE, in Spanish donkey breeds.

Microsatellite	No.A.[1]	S. Range[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
All loci			0.683 (±0.170)	0.658 (±0.147)	0.036*** (±0.023)		0.999

*** $P < 0.001$.

[1] Total number of observed alleles. –: Failed to amplify.

[2] Size range of the observed allele in bp.

[3] Polymorphism information content.

[4] Exclusion probability.

$_A$: Monomorphic.

3. RESULTS

The equine microsatellites were all well-amplified in the donkey, with the exception of locus ASB2, which failed to amplify. All amplified loci were polymorphic except HMS1, which was monomorphic (165 bp) in all breeds. The number of alleles varied between 3 (HMS5) and 15 (AHT4) (Tab. I), with generally little difference between the breeds (data not shown). The average gene diversity H_T [27] over all loci was 0.683 ± 0.170 while, for individual loci, it ranged from 0.278 (HMS5) to 0.907 (AHT5).

The average expected heterozygosity H_S across all loci in the total sample was 0.658 ± 0.147 and ranged from 0.336 (HMS5) to 0.852 (AHT5). The average coefficient of gene differentiation (G_{ST}) over the 13 loci was 0.036 ± 0.023 ($P < 0.01$). The G_{ST} values for single loci ranged from 0.014 for HTG15 to 0.109 for HMS5. The PIC and the exclusion probability (PE) are given in Table I. The combined probability of exclusion was 0.999, across the whole sample as well as for each breed.

Table II. Sample size, number of alleles per locus and heterozygosity (± standard errors) averaged over 13 microsatellites in 5 donkey populations.

Population	Mean sample size per locus	Mean No. of alleles per locus	Mean heterozygosity	
			Observed	Expected*
Andaluza	87	7.0 ± 1.0	0.532 ± 0.052	0.679 ± 0.034
Catalana	140	7.1 ± 1.0	0.528 ± 0.062	0.663 ± 0.055
Mallorquina	104	7.5 ± 0.9	0.570 ± 0.063	0.637 ± 0.054
Encartaciones	74	7.4 ± 1.0	0.564 ± 0.066	0.646 ± 0.059
Zamorano-Leonesa	108	7.3 ± 1.1	0.539 ± 0.058	0.684 ± 0.044
Means		7.2 ± 1.0	0.546 ± 0.060	0.654 ± 0.048

* Unbiased estimate [28].

Among Spanish donkeys the mean number of alleles per locus ranged from 7.0 in the Andaluza breed to 7.5 in the Mallorquina breed (Tab. II). The mean observed heterozygosity (H_O) showed a range of values from 0.528 in the Catalana breed to 0.570 in the Mallorquina breed. Average expected heterozygosities (H_E) ranged from 0.637 in the Mallorquina breed to 0.684 in the Zamorano-Leonesa breed, and were not significantly different. The number of private alleles varied among the five breeds: 1 in Andaluza (HMS6: 151 bp), 4 in Encartaciones (one in HTG4: 175 bp; AHT4: 146 bp; and two in HTG6: 98 and 100 bp), 2 in Mallorquina (HMS3: 160 bp; HTG15: 136 bp) and one in Zamorano-Leonesa (HTG4: 173 bp). Only one private allele showed a frequency $> 5\%$ (HTG6; 100 bp with a frequency of 10.8%, in the Encartaciones breed).

HWE was tested for all breed-locus combinations. Of the 65 contrasts, 48 tests gave significant deviations from HWE showing a significant heterozygote deficit. Only 17 tests showed agreement with HWE, corresponding to the Andaluza, Encartaciones and Mallorquina breeds for four microsatellites (HMS3, HMS5, HTG6 and VHL20; HMS3, HMS5, HTG10 and VHL20; and AHT4, HMS3, HMS5 and HMS6, respectively), the Zamorano-Leonesa breed for three microsatellites (HMS5, HTG10 and VHL20) and the Catalana breed for two microsatellites (HMS5 and HTG15). Only one of the microsatellites (HMS5) showed agreement with H-W proportions in all analysed populations.

The D_A distance, using 13 microsatellites, ranged between 0.057 and 0.093 for the Spanish donkey breeds (Tab. III). A neighbour-joining tree was constructed, and the reliability of the obtained tree was examined by 1 000 bootstrap replicates (Fig. 2). The most robust features of the topology were the Catalana-Mallorquina cluster (70% support) and the cluster (77% support) formed by Andaluza and the four black coated breeds (CAT, ENC, MALL and ZAM) which are all from the North of Spain.

Table III. Matrix of D_A genetic distance among five Spanish donkey breeds (Moroccan ass and horse).

	AND	CAT	MALL	ENC	ZAM	Horse
Moroccan	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

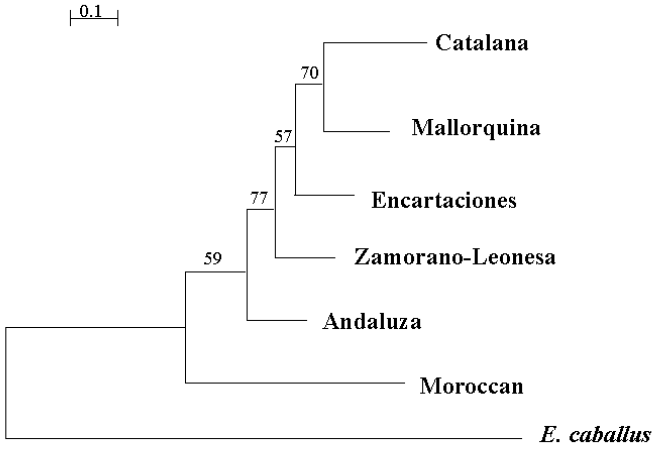


Figure 2. Dendrogram showing the genetic relationships among donkey breeds using the neighbour-joining method and the D_A genetic distance, measured with 13 microsatellite loci. The number at the forks indicate the percentage of group occurrence in a bootstrap resampling of 1 000 trees.

The low genetic distances among Spanish breeds indicated a close relationship among these populations. The phylogenetic tree was constructed based on the matrix of D_A values using the Merens horse breed as an outgroup, and the Moroccan ass breed as the reference population for the Spanish breeds.

4. DISCUSSION

The average number of alleles and the expected heterozygosities (H_E) were similar for all breeds, indicating that there are no appreciable differences in the level of genetic variability among the Spanish breeds. These results are comparable to the previous values reported in Catalonian donkeys [23] and the Baudet du Poitou breed [7].

Average genetic differentiation (G_{ST}) among the breeds was 3.6%, a relatively low but significant ($P < 0.01$) value. All loci were contributing to that differentiation. The global PE value of 0.999 for each breed makes it extremely unlikely that false parentage would not be recognised. These markers are therefore an effective tool in donkey parentage verification. The genetic relationships among the populations correspond with the geographical distribution of the breeds studied. The dendrogram (Fig. 2) groups all of the Spanish donkeys into one cluster (59% support).

Within the Spanish breeds, the four black coated populations (CAT, ENC, MALL and ZAM) form a cluster (77% support), supporting the hypothesis of a common ancestral past from *E. a. europeus*. The Catalana and Mallorquina breeds are the most closely related, supporting both the historic and the archaeological evidence that they show common ancestry [31, 33].

All sources agree that the Andaluza breed descended from the primitive ass of North Africa (*E. a. africanus*) which could have been introduced into the South of the Iberian Peninsula through the Straits of Gibraltar [3, 13, 15, 37]. However, our data fails to clearly position the Andaluza breed within our tree. Further investigations involving more European and African donkey populations, as well as the analysis of $_{mt}$DNA, which could show a possible introgression of African haplotypes into European populations would be useful to clarify this point. Nevertheless, we have concluded that the analyses of genetic markers such as microsatellite sequences are very valuable for the study of genetic variability in donkey populations and to contribute to the establishment of their own conservation plans [21].

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was made possible by the financial support of the CICYT (project AGF98–0503) and the DARP (Generalitat de Catalunya) ; we are also grateful to the Breed Associations of Spanish donkeys for their helpful co-operation and assistance during sample collection. Furthermore, we would like to thank Chuck Simmons for the English revision and A. Clop, H. Yahyaoui and R. Pena for suggestions on the manuscript.

REFERENCES

[1] Adametz L., Zootecnia General, Ed. Labor, Madrid, 1943.

[2] Anonymous, Recommendations of the FAO expert consultation, in: Hodges J. (Ed.), The management of global animal genetics resources, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 1992, pp. 1–24.

[3] Aparicio G., Zootecnia Especial. Etnología compendiada. Imprenta Moderna, Córdoba, 1960.

[4] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman G.G., Smith J.A., Struhl K., Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1987.
[5] Bailey E., Graves K.T., Cothran E.G., Reid R., Lear T.L., Ennis R.B., Synteny-mapping horse microsatellite markers using a heterohybridoma panel, Anim. Genet. 26 (1995) 80–111.
[6] Binns M.M., Holmes N.G., Holliman A., Scott A.M., The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use Thoroughbred parentage testing, Brit. Vet. J. 151 (1995) 9–15.
[7] Bellone R.R., Cothran E.G., Ketchum M.S., Genetic variation in the rare donkey breed, Baudet du Poitou, Anim. Genet. 29, (Suppl. 1) (1998) 17.
[8] Bodó I., The minimum number of preserved populations, in: Hodges J. (Ed.), The management of global animal genetic resources, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 1992, pp. 91–105
[9] Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, Am. J. Hum. Genet. 32 (1980) 314–331.
[10] Breen M., Downs P., Irvin Z., Bell K., Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalski's horse (*E. przewalskii*), Anim. Genet. 25 (1994) 401–405.
[11] Breen M., Lindgren G., Binns M.M., Genetical and physical assignments of equine microsatellites – First integration of anchored markers in horse genome mapping, Mamm. Genome 8 (1997) 267–273.
[12] Camac R.O., Introduction and Origins of the Donkey, in: Svendsen E.D. (Ed.), The professional handbook of the Donkey, 2nd edn., The Donkey Sanctuary, Sidmouth, Devon, 1989, pp. 1–10.
[13] Clutton-Brock J., A natural history of domestic mammals, Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
[14] Ellegren H., Johansson M., Sandberg K., Andersson L., Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse, Anim. Genet. 23 (1992) 133–142.
[15] Epstein H., Ass, mule and onager, in: Mason I.L. (Ed.), Evolution of domesticated animals, Longman, London and New York, 1984, pp. 174–184.
[16] García Dory M.A., Martínez S., Orozco F., Guía de campo de las razas autóctonas españolas, Alianza Editorial, Madrid, 1990.
[17] Guerin G., Bertaud M., Amigues Y., Characterisation of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS4, HMS5, HMS6, HMS7, and HMS8, Anim. Genet. 25 (1994) 62.
[18] Guo S.W., Thompson E.A., Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles, Biometrics 48 (1992) 361–372.
[19] Hancock J., Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms, in: Goldstein D., Schlotterer C. (Eds.), Microsatellites. Evolution and applications, Oxford University Press, New York, 1999, pp. 1–10.
[20] Jamieson A., The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members, Anim. Genet. 25 (1994) (Suppl. 1), 37–44.
[21] Jordana J., Folch P., The Catalonian donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed, Arch. Zootec. 47 (1997) 403–409.

[22] Jordana J., Folch P., Sánchez A., Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalonian donkeys, Bioch. Syst. Ecol. 27 (1999) 791–798.
[23] Jordana J., Folch P., Aranguren J.A., Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed, J. Anim. Breed. Genet. 118 (2001) 57–63.
[24] Lorenzo J., Conocimiento y conservación de las razas autóctonas: "El asno Zamorano-Leonés" estudio del estado actual de la raza en la provincia de Zamora; valoración general: Aspectos biopatológicos y funcionales, Tesis Doctoral, Universidad de León, Spain, 1997.
[25] Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L., Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites, Anim. Genet. 25 (1994) 19–23.
[26] Moazami-Goudarzi K., Laloë D., Furet J.P., Grosclaude F., Analysis of genetic relationship between 10 cattle breeds with 17 microsatellites, Anim. Genet. 28 (1997) 338–345.
[27] Nei M., Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 70 (1973) 3321–3323.
[28] Nei M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, Genetics 89 (1978) 583–590.
[29] Nei M., Tajima F., Tateno T., Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data, J. Mol. Evol. 19 (1983) 153–170.
[30] Ota T., DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis, Pennsylvania State University, University Park, PA, 1993.
[31] Payeras L., Falconer J., Races Autòctones de les Illes Balears, Govern Balear, Palma de Mallorca, 1998.
[32] Raymond M., Rousset F., GENEPOP (Version 3.1): Population genetics software for exact test and ecumenicism, J. Hered. 86 (1995) 248–249.
[33] Romagosa J.A., El Garañón Catalán, Tesis Doctoral, Universidad de Madrid, Spain, 1959.
[34] Saitou N., Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406–425.
[35] SAS® Institute Inc., SAS® User's Guide: Statistics. Version 6.12. Cary, NC, USA, 1996.
[36] Schmid M., Saitbekova C., Dolf G., Genetic diversity in Swiss cattle breeds, J. Anim. Breed. Genet. 116 (1999) 1–8.
[37] Sotillo J.L., Serrano V., Producción Animal 1. Etnología Zootécnica. Tebar-Flores, Madrid, 1985.
[38] Swofford D.L., Selander R.B., BIOSYS-2: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics (Release 2.0), University of Illinois, Urbana, Champaign, IL., 1999.
[39] Takezaki N., Nei M., Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA, Genetics 144 (1996) 389–399.
[40] Yanes G. J., El asno Zamorano-Leonés, una gran raza autóctona. Diputación de Zamora, Spain, 1999.
[41] Van Haeringen H., Bowling A.T., Stott M.L., Lenstra J.A., Zwaagstra K.A., A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20, Anim. Genet. 25 (1994) 207.

ANEXO 5.

Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers.

Manuscrito enviado a publicar a la revista Heredity

Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers.

JOSE ARANGUREN-MENDEZ [1,2] JORDI JORDANA [1] MARIANO GOMEZ [3]

[1]Unitat de Genètica i Millora Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain.

[2]Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción Animal. Maracaibo 4001-A. Venezuela.

[3]Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia. Avda. Lehendakari Aguirre, 9, 2º, 48014 Bilbao. Spain.

Correspondence: J. Jordana (Fax: 34-93-5812006; e-mail: **Jordi.Jordana@uab.es**)

Keywords: Donkey, extinction danger, population structure, *F*-statistics, hierarchical analysis, microsatellite.

Short running title**: Hierarchical population structure in Spanish donkey breeds.**

Summary

The hierarchical population structure of five, native-Spanish donkey breeds (Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones and Zamorano-Leonesa) has been studied by using *F*-statistics. In addition, 9 Moroccan asses and 24 Merens breed horses were included. Data came from 15 DNA microsatellites. The analysis showed that Spanish donkeys are substructured at both hierarchical levels studied, among breeds and within breed (subpopulations). In the whole population, the deficit of heterozygotes estimated was about 21%. The proportion of genetic variability attributable to differences between breeds, subpopulations within breeds, and within subpopulations was estimated to be 6.4%, 3.5% and 3.0%, respectively. The dendrogram obtained clearly showed that the Andaluza-Moroccan ass forms a separate cluster from the Northern-Spain breeds (Catalana, Encartaciones, Mallorquina and Zamorana-Leonesa). These racial groupings coincide with the groupings obtained from historical and archaeological data.

Introduction

The ass (*Equus asinus*), is a herbivorous animal of the order *Perissodactyla*, family *Equidae*. Was domesticated about 6,000 years ago, probably in either Egypt or Mesopotamia (Littauer & Crouwel, 1979). In Spain, the development of donkey populations was influenced by their extensive use for riding and as a beast of burden; it is useful as a pack animal. It is capable of carrying over 100 kg a day with little food. Another useful domestic animal, the mule, the hybrid offspring of a male donkey and female horse, is used for vineyard cultivation for which it is suitable (Aparicio, 1960).

The Spanish donkey breeds: Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones and Zamorano-Leonesa have suffered a substantial decrease in population size (Jordana & Folch, 1998) which might create high levels of inbreeding which may result in inbreeding depression, increasing the risk of breed extinction. Currently, the census population size of these five breeds is very low, and they are included in the Food and Agricultural Organization of the United Nation's (FAO) list of domestic animals to be preserved (FAO, DAD-IS http://fao.org/dad-is).

The objective of the present study is to characterize the genetic structure of five Spanish donkey populations in danger of extinction by using *F*-statistics analysis (Wright, 1965; Nei, 1977; Weir & Cockerham, 1984). *F*-statistics have proven to be a very useful tool in elucidating the pattern and extent of genetic variation residing within and among natural populations of animal and plant species.

Genetic characterisation is the first step in breed conservation programs and may have implications for future breeding strategies (Bjørnstad *et al*., 2000). Very little literature reporting microsatellite data in domestic donkeys exists (Breen *et al.,* 1994; Bellone *et al.*, 1998; Jordana *et al.*, 1999, 2001; Aranguren-Méndez *et al.*, 2001); for these reasons is understood the importance of this study.

The results of this analysis are expected to provide us with some insight for making decisions about the conservation of these breeds. These results will allow us to acquire knowledge about the degree of genetic differentiation that exists between breeds and subpopulations and of gene flow between them through the study and analysis of the *F*-statistics.

Materials and methods

Breeds studied and DNA collection

Genomic DNA was prepared from whole blood according to standard methods involving lysates of the washed white cells and phenol-cloroform-isoamylalcohol (25:24:1) extraction. The sample size and breeds involved were: 87 Andaluza (AND), 140 Catalana (CAT), 104 Mallorquina (MALL), 74 Encartaciones (ENC) and 108 Zamorano-Leonesa (ZAM) breeds. The area of main distribution of these indigenous Spanish breeds is shown in Figure 1. In addition, 9 Moroccan asses were used as genuine members of the *E. asinus africanus*, and 24 horses of the Merens breed (*E. caballus*) were used as an outgroup. To perform the intraracial analysis of the populations, the breeds were divided into 16 subpopulations, according to geographical criteria and/or areas of influence of certain breeders (Figure 1).

Microsatellite markers

The 15 equine microsatellite markers chosen for analysis were: AHT4, AHT5, ASB2, HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, HTG15 and VHL20. Primer sequences, reaction conditions and data collections (available from the authors on request) have been described previously by Aranguren-Méndez *et al.* (2001).

Statistical analyses

Population structure was analysed by means of *F*-statistics using Weir & Cockerham methods (1984), implemented in the FSTAT computer programme (Goudet, 2000). A hierarchical F_{ST} analysis was performed to determine the amount of variance

attributable to subpopulation substructure (Wrigth, 1978; Johannesen & Loeschcke, 1996). The hierarchical analysis was carried out using analysis of molecular variance (AMOVA) in the ARLEQUIN 2,000 package (Schneider *et al.,* 2000). AMOVA yields estimations of population structure at different levels of the specified hierarchy.

In order to test the significance of the different statistics for the null hypothesis of no differentiation at the corresponding level, permutation and resampling tests (jack-knifing and bootstrapping) were carried out as implemented in the previous programmes.

Additional Reynolds genetic distance (Reynolds *et al*., 1983), a measure based on F_{ST} values [D_R= -ln(1-F_{ST})], with neighbour–joining (NJ) method clustering (Saitou & Nei, 1987), was used to construct a dendrogram of breed relationships, using the PHYLIP package (Felsenstein, 1995). An unrooted consensus tree, evaluated by 1,000 bootstrap replicates, was obtained. The method of Slatkin (1993), implemented in GENEPOP, was used to assess the genetically effective migration rate ($M = N_e m$, the average number of migrants exchanged per generation).

Results

Thirteen of fifteen equine microsatellites investigated amplified well and were polymorphic in the donkey, except for locus ASB2, which failed to amplify, and HMS1, which was monomorphic (165 bp) in all breeds. The F_{ST}, F_{IT} and F_{IS} values, computed over all breeds and loci, were obtained. Levels of apparent breed differentiation were considerable and multilocus F_{ST} values indicate that around 4.1% of the total genetic variation could be explained by breed differences, the remaining 95.9 % corresponding to differences among individuals. Genetic differentiation among

breeds was highly significant (P< 0.001) for all loci. On average, individuals within breeds had a 17.8% (P<0.001) deficit of heterozygotes, whereas the total population had a 21.1% (P<0.001) deficit of heterozygotes.

Values for the *F*-statistics of the Spanish donkey populations at all hierarchical levels are presented in Table 1. The degree of genetic differentiation among subpopulations was highly significant for all breeds, oscillating from 1.3% for the Encartaciones breed to 5.8% for the Andaluza breed (P< 0.001), indicating the existence of a certain reproductive substructure within them all.

The hierarchical analysis of the Spanish donkey populations (Table 2) revealed that, as expected, most of the differentiation occurs among breeds with respect to the total population rather than among subpopulations within breeds, and within subpopulations; 0.064 *vs* 0.035, and 0.030, respectively. The differentiation among breeds in hierarchical analysis was 6.4%, rather than without using hierarchical analysis (4.1%).

Table 3 shows the total inbreeding estimate ($F \cong F_{IT}$) per breed, evaluated by hierarchical analysis. The whole loci showed values significantly different from zero, as well as the estimated average (P<0.001). The F_{IT} average, obtained from jackknifing over loci, ranged between 0.112 ± 0.049 and 0.232 ± 0.058 for the Mallorquina and Andaluza breeds, respectively.

The interbreed genetic distance, or F_{ST} estimates, below the diagonal, and gene flow (N_em) above the diagonal, between pairs of Spanish donkey breeds are shown in Table 4. After 1,000 permutations, performed with FSTAT, all F_{ST} calculated by pairwise breed combinations were significantly different from zero (P<0.001). Least differentiation was detected between Andaluza and Zamorano-Leonesa breeds and

Encartaciones-Mallorquina breeds (F_{ST}=0.031), and the most divergence was observed between Andaluza and Catalana breeds (F_{ST}=0.058). N_em represents the number of effective migrants exchanged per generation. The N_em values for breed pairs varied from 4.16 to 7.88 for the AND-CAT pair and the MALL-ENC pair, respectively.

Figure 2 shows a NJ tree based on Reynolds genetic distance (data not shown) relating the five Spanish donkey breeds studied, the Moroccan ass, and the Merens breed used as outgroup. The numbers at the nodes are bootstrapping values for 1,000 replicates of the 13 loci genotyped.

Discussion

Genetic differentiation among Spanish donkey breeds exists. All loci contributing to this differentiation with values moderately low and similar for all systems studied, but very significant (P<0.001), indicating a relatively high gene flow among the breeds studied. However, it is clear that most of the total genetic variation corresponds to differences among individuals (95.9%) and only less than five percent is due to differences among breeds. These values of total genetic differentiation (F_{ST}) among breeds are close to those found in other domestic species, for example: among river buffalo breeds (F_{ST}=0.038, Barker *et al.*, 1997), among Spanish horse breeds (F_{ST}=0.078, Cañon *et al.*, 2000), though slightly lower than those found in Norwegian horse breeds (F_{ST}=0.12, Bjørnstad *et al.*, 2000), in European cattle breeds (F_{ST}=0.11, MacHugh *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000) and among Spanish dogs (F_{ST}=0.099, Jordana *et al.*, 1992).

The results from the hierarchical analysis further show that populations of Spanish donkeys are substructured at different levels (Table 2). The differentiation

within breeds is only half of that between breeds (3.5% and 6.4%, respectively). This value was similar to that reported for other organisms: Spanish dogs (Jordana *et al.*, 1992), black-tailed dogs (Chesser, 1983) and house mice (Selander & Kaufman, 1975).

The total breed inbreeding estimate ($F \cong F_{IT;}$ Table 3) showed a significant deficit of heterozygotes ($P<0.001$) in all breeds. Consanguinity, which is produced by mating between relatives, can be one cause of loss of heterozygotes, but this deficit affects all or most of the loci in a similar way. AND, CAT and ZAM breeds showed 10 or 11 loci, of the total of 13, with a significant deficit of heterozygotes, therefore possibly being able to attribute this to this phenomenon (Table 3). Although in these breeds high and significant values of F_{ST} (Table 1) (0.058, 0.031 and 0.037, respectively), also suggest that a significant subpopulation structure (Wahlund's effect) exists within these populations. On the other hand, MALL and ENC breeds showed single deficit of heterozygotes in only 5 and 6 loci, respectively, this deficit not being able to essentially be attributed to the consanguinity.

We must remember that there are other factors that can also cause a lack of heterozygotes in the population (Nei, 1987). First, the locus can be under selection, the "genetic hitchhiking" effect, close to some morphological or productive trait of selective interest. Second, "null alleles" (non-amplifying alleles) may be present and lead to a false observation of excess homozygotes. Third, the presence of a population's substructure within the breed may lead to Wahlund's effect.

The reproductive substructure within the breed, in isolated units, would be a very feasible explanation to understand this high deficit of heterozygotes observed in the Spanish donkey populations. Nevertheless, two loci exist, concretely HTG4 and HMS7, which show a very significant deficit of heterozygotes in all breeds ($P <0.001$).

The most coherent interpretation to explain this deficit in those two markers is that these loci can be under selection (genetic hitchhiking effect) with some trait of selective interest, or the possible presence, not detected, of "null alleles" in these populations. Previous reports have indicated the occurrence of a "null allele" present in the HMS7 locus in the Quarter-horse equine breed (Bozzini *et al.*, 1997).

In the context of the conservation and maintenance of animal genetic variability, migration values (N_em) can be interpreted as the upper limit of the number of migrants per generation, which would allow the maintenance of the observed genetic differentiation among the breeds (Cañón *et al*., 2000). For example, an introgression rate of eight individuals per generation between the ENC and MALL breeds would maintain the estimated degree of genetic differentiation between these breeds. Similarly, when we compare the CAT and AND breeds, a gene flow between them greater than only 4 individuals per generation could mean a real threat for both breeds. A gene-flow strategy, which permits a greater introgression rate between genetically close populations rather than in more divergent ones, should be emphasised.

The dendrogram's topology (Figure 2) is very similar to that obtained by Aranguren-Méndez *et al.* (2001) using the D_A genetic distance (Nei, 1987) and the NJ algorithm. In this work, the four breeds of black coat from the North of Spain (CAT, ENC, MALL and ZAM) form a closed cluster (64% support), supporting the hypothesis of a common ancestral past from *E. asinus europeus.*

In this paper, unlike Aranguren-Méndez *et al*. (2001), the African origin of the Andaluza breed is clarified, which forms a cluster with the Moroccan ass, a genuine representative of the ancestral trunk of *E. asinus africanus*. This supports the thesis earlier stated by other authors about its African origin (Aparicio, 1960; Epstein, 1984;

Sotillo and Serrano, 1985). However, the low bootstrap value for this cluster (43% support) reflects the instability of the topology, so additional studies to confirm this hypothesis would be necessary.

Further investigations involving more European and African donkey populations, as well as the analysis of genetic variability of mtDNA, could look for a possible introgression of mtDNA haplotypes of African origin in these populations. This variability is not reflected in the nuclear genome, and it would be useful to clarify this point.

Nevertheless, this study contributes to the knowledge of genetic structure and molecular characterisation of endangered and small populations, such as the Spanish donkey breeds. It also shows how microsatellites can be used to establish the genetic relationships between donkey populations, and help to establish the planning for their conservation (Jordana & Folch, 1998; Jordana *et al*., 2001), as well as in order to integrate this information into the FAO Global Data Bank on Domestic Animal Diversity (DAD-IS).

Acknowledgements

This study was made possible by the financial support of the CICYT (project AGF98-0503) and the DARP (Generalitat de Catalunya); we are also grateful to the Breed Associations of the Spanish donkeys for their helpful co-operation and assistance during the sample collection. Also, we would like to thank Rosa Avellanet for his valuable comments on the manuscript, and Chuck Simmons for the English revision. The suggestions of the two referees were greatly appreciated.

References

APARICIO, G. 1960. Zootecnia Especial. Etnología compendiada. Imprenta Moderna Córdoba.

ARANGUREN-MENDEZ, J. A., JORDANA, J. AND GOMEZ, M. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol*., **33**, 433-442.

BARKER, J. S. F., MOORE, S. S., HETZEL, D. J. S., EVANS, S., TAN, S. G. AND BYRNE, K. 1997. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Anim.Genet*., **28**, 103-115.

BELLONE, R. R., COTHRAN, E.G. AND KETCHUM, M. S. 1998. Genetic variation in the rare donkey breed, Baudet du Poitou. *Anim. Genet*., **29,** (Suppl. 1), 17.

BJØRNSTAD, G., GUNBY, E. AND RØED, K. H. 2000. Genetic structure of Norwegian horse breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, **117**, 307-317.

BOZZINI, M., EGGLESTON-STOTT, M., DEL VALLE, A. AND ZIEGLE, Y. 1997. Addition of degenerate primer in multiplex PCRs corrects the equine microsatellite locus HMS7 null allele in the Quarter horse. Abstracts P50. Plant & Animal Genome V Conference.

BREEN, M., DOWNS, P., IRVIN, Z. AND BELL, K. 1994. Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalski's horse (*E. przewalskii*). *Anim. Genet.*, **25,** 401-405.

CAÑON, J., CHECA, M. L., CARLEOS, C., VEGA-PLA, J. L., VALLEJO, M. AND DUNNER S. 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet.*, **31**, 39-48.

CHESSER, R. K. 1983. Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. *Evolution,* **37**, 320-331.

EPSTEIN, H. 1984. Ass, mule and onager. In: Mason, I. L. (ed.) Evolution of domesticated animals. pp 174-184. Longman, London and New York.

FELSENSTEIN, J. 1995. PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.57c. Department of Genetics, University of Eashington, Seattle.

GOUDET, J. 2000. FSTAT Ver. 2.9.1. Computer package for PCs. Institute of Ecology, Biology Building, UNIL, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

JOHANNESEN, J. AND LOESCHCKE, V. 1996. A hierarchical analysis of genetic structure and variability in patchily distributed coexisting *Chiastocheta* species (Diptera: Anthomyiidae). *Heredity,* **76**, 437-448.

JORDANA, J., PIEDRAFITA, J., SANCHEZ, A. AND PUIG, P. 1992. Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds. *J. Hered.*, **83**, 367-374.

JORDANA, J. AND FOLCH, P. 1998. The Catalonian donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed. *Arch. Zootec.* **47**, 403-409.

JORDANA, J., FOLCH, P. AND SANCHEZ, A. 1999. Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalonian donkeys. *Bioch. Syst. Ecol.*, **27,** 791-798.

JORDANA, J., FOLCH, P. AND ARANGUREN, J. A. 2001. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed. *J. Anim. Breed. Genet*., **118**, 57-63

KANTANEN, J., OLSAKER, I., HOLM, L.-E., LIEN, S., VIKKI, J., BRUSGAARD, K., EYTHORSDOTTIR, E., DANELL, B. AND ADALSTEINSSON, S. 2000.

Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *J. Hered.*, **91**, 446-457.

LITTAUER, M. A. AND CROUWEL, J. H. 1979. Wheeled vehicles and ridden animals in the ancient near east. Brill, Leiden and Köln.

MACHUGH, D. E., LOFTUS, R. T., CUNNINGHAM, P. AND BRADLEY, D. G. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim. Genet.,* **29**, 333-340.

NEI, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet*., **41**, 225-233.

NEI, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.

REYNOLDS, J., WEIR, B. S. AND COCKERHAM, C. C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, **105**, 767-769.

SAITOU, N. AND NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*., **4**, 406-425.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. AND EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SELANDER, R. B. AND KAUFMAN, D. W. 1975. Genetic structure of populations of the brown snail (*Helix apersa*): I. Microgeographic variation. *Evolution,* **29**, 385-401.

SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution,* **47**, 264-279.

SOTILLO, J. L. AND SERRANO, V. 1985. Producción Animal 1, Etnología Zootécnica, Tebar-Flores, Madrid

WEIR, B. S. AND COCKERHAM, C. C: 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.

WRIGHT, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of populations: Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

Legends to tables and figures

Table 1. Genetic structure of the Spanish donkey breeds through an analysis of their subpopulations.

Table 2. Hierarchical F-statistics and variance components for Spanish donkey breeds with two subdivision levels.

Table 3. Total breed inbreeding estimated ($F \cong F_{IT}$) by hierarchical analysis in the Spanish donkey breeds.

Table 4. F_{ST} estimates (below the diagonal) as a measure of genetic distance between donkey breeds and the number of effective migrants per generation (N_em) (above the diagonal).

Figure 1. Geographical location of the Spanish donkey subpopulations and their reference codes (n is the sample size).

Figure 2. Neighbour-Joining dendrogram showing the genetic relationships among the Spanish donkey breeds, inferred through microsatellite data. This tree is based on Reynolds' genetic distance. The numbers at the nodes are values for 1,000 bootstrap resamplings of the 13 loci genotyped.

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

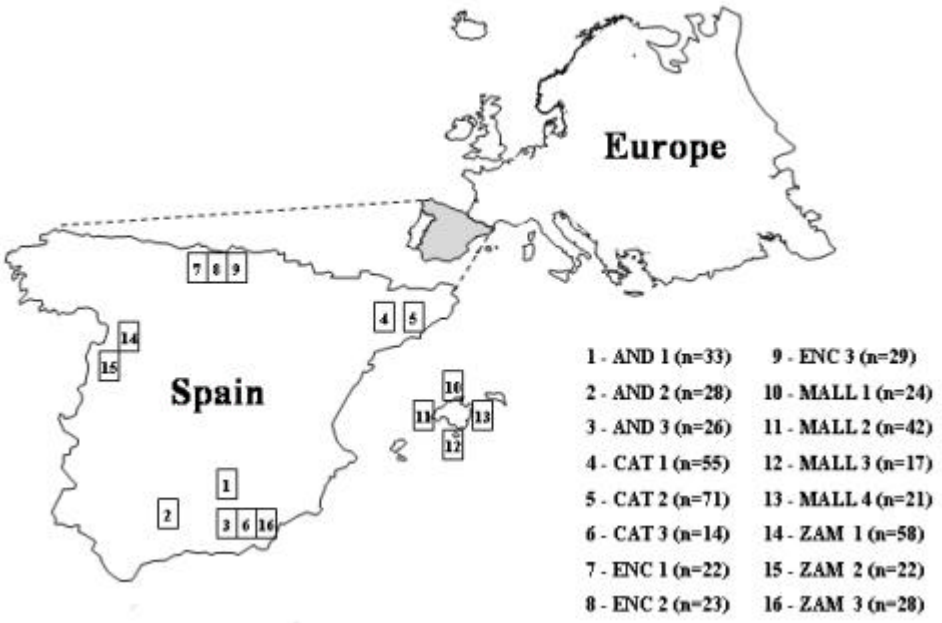
f, within-population inbreeding estimate; F, total inbreeding estimate; θ, measure of population differentiation
Standard deviation in parentheses estimate from jackknife over loci
*** P<0.001, from permutation tests in FSTAT programme
† 95% Confidence Interval

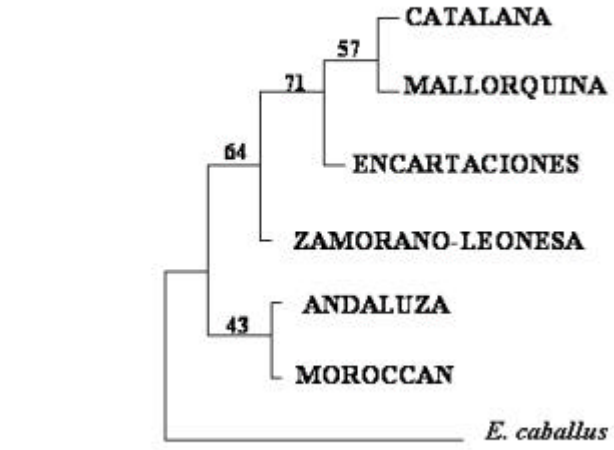
Sources of variation	**Variance** component	Percentage of variation	Fixation Indices (%)
Among breeds	0.133	2.96	6.4
Among subpopulations within breeds	0.153	3.41	3.5
Within subpopulations	4.208	93.63	3.0

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
Mean	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 from permutation tests in FSTAT programme

	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	


Europe
Spain
7
8
9
4
5
14
15
16
11
13
12
1
2
3
6
16
1 - AND 1 (n=33)
2 - AND 2 (n=28)
3 - AND 3 (n=26)
4 - CAT 1 (n=55)
5 - CAT 2 (n=71)
6 - CAT 3 (n=14)
7 - ENC 1 (n=22)
8 - ENC 2 (n=23)
9 - ENC 3 (n=29)
10 - MALL 1 (n=24)
11 - MALL 2 (n=42)
12 - MALL 3 (n=17)
13 - MALL 4 (n=21)
14 - ZAM 1 (n=58)
15 - ZAM 2 (n=22)
16 - ZAM 3 (n=28)


0.01
CATALANA
57
MALLORQUINA
71
ENCARTACIONES
64
ZAMORANO-LEONESA
ANDALUZA
43
MOROCCAN
E. caballus

ANEXO 6

Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds.

Manuscrito enviado a publicar a la revista *Journal of Animal Breeding and Genetics*.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain.

GENETIC CONSERVATION OF FIVE ENDANGERED SPANISH DONKEY BREEDS

By J. ARANGUREN-MENDEZ[1,2] J. JORDANA[1] M. GOMEZ[3]

Summary

The genetic diversity of most livestock species is being reduced, and it is not possible to preserve all of these livestock breeds. In order to preserve as much of the genetic diversity as possible, we must first have a robust method of measuring genetic diversity among breeds. Three different methods of study that graphically represent relationships among breeds are presented; Weitzman's method, principal component analysis (PCA) and a neighbor-joining tree with allele-sharing. Diversity was evaluated on the basis of 15 microsatellite markers typed over a total de 513 DNA samples collected from five Spanish donkey breeds. Breed differentiation was confirmed by the clustering based on the genetic distances between individuals, which essentially grouped all individuals in discrete clusters. The genetic distance among breeds was used to measure the global diversity of the set in breeds considered, and to evaluate the marginal loss of diversity attached to each breed. The Catalana breed appeared to be the most "unique" in the set considered. In addition to this, the usefulness of global evaluations of diversity using molecular markers to choose breeds is worthy of conservation.

Resumen

La diversidad genética en la mayoría de especies domésticas se está reduciendo, no siendo posible poder conservar todas esas razas domésticas. Para intentar preservar la máxima cantidad de diversidad genética, deberíamos disponer, en primer lugar, de un método preciso que nos midiera dicha diversidad entre razas. Presentamos aquí, tres diferentes métodos de estudio que representan gráficamente las relaciones existentes entre las razas; el método de Weitzman, el análisis de componentes principales (PCA) y el árbol "neighbor-joining" con alelos compartidos. La diversidad se evaluó a partir del análisis de 15 marcadores genéticos, de tipo microsatélite, sobre un total de 513 muestras de DNA obtenidas de cinco razas asnales españolas. La diferenciación entre razas se confirmó por el agrupamiento individual obtenido, basado en las distancias genéticas entre los individuos, que agrupó esencialmente a todos los animals de la misma raza en grupos discretos. La distancia genética entre las razas se utilizó para medir la diversidad global de todas ellas, y para evaluar la pérdida marginal de diversidad asociada a cada una. La raza Catalana aparece cómo la más "única" en el conjunto considerado. Las evaluaciones globales de diversidad, utilizando marcadores moleculares, resultan muy útiles para la elección de las posibles razas a conservar.

Introduction

In genetic conservation the main objective consists of preserving variability within populations under the hypothesis of correlation between genetic variation and the population's viability. When economic resources are scarce, it is important to prioritise populations for preservation, decisions of where to allocate resources or to establish preservation plans should be based on information that ensures, to the greatest degree possible, the future viability and success of the preserved populations and of the species (Falk, 1991).

Consequently, one of the first stages in the conservation programme of species consists of the evaluation of their genetic variability, their distribution among their populations, and the possible detection of rare alleles, as an indicator of populations with unique genetic variants (González-Candelas and Montolío, 2000).

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) has been mandated by its member nations to manage global animal genetics resources, and much important progress has been made in the last few years (http://www.fao.org/dad-is/). However, resources are limited, and priorities will have to be set for breed conservation, for breed development programmes and for evaluation studies (Barker, 1999).

This article presents the results of the analysis of microsatellite variability in five endangered Spanish donkey breeds (Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones and Zamorano-Leonesa breeds). Our main goals consist of studying the genetic diversity of the five populations of donkeys, through the analysis of three methods which study genetic variability, based on microsatellite data: Weitzman's diversity, the principal components analysis (PCA) and the allele-shared analysis.

Materials and methods

Population samples

Currently, the 5 Spanish donkey breed figures fit in the category of endangered breeds, proposed by the FAO Expert Consultation (FAO, DAD-IS http://fao.org/dad-is), as well as general information on those breeds, which may be found here. The number of individuals sampled was as follows: 87 Andaluza (AND), 140 Catalana (CAT), 104 Mallorquina (MALL), 74 Encartaciones (ENC) and 108 Zamorano-Leonesa (ZAM). In addition, 9 Moroccan asses (MOR) were included as a reference population. Donkey DNA was prepared from whole blood according to standard methods involving lysates of the washed white-cells and phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) extraction (Ausubel et al. 1987).

Microsatellite markers

Out of the 15 equine microsatellite markers used, 12 (ASB2, AHT4, AHT5, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, and VHL20) were included in a kit (Stock-Marks® for horses, Equine Paternity PCR Typing kit, PE Applied Biosystems Division; Foster City, CA), which was used with slight modifications in some PCR conditions. The other 3 markers (HMS1, HMS5 and HTG15) were obtained from the literature of equine markers (Breen et al. 1994). Primer sequences, reaction conditions and data collections have been described previously (Aranguren-Méndez et al. 2001).

Statistical analyses

Genetic distances can also be used to measure diversity, as proposed by Weitzman (1992, 1993). This approach has been implemented here to provide a further upward hierarchical representation of the breeds and to evaluate marginal losses of diversity due to various patterns of breed extinction, as advocated by Thaon d' Arnoldi et al. (1998).

Genetic distances between breeds were calculated based on allelic frequencies in each breed (available from the authors on request). Two measures of distances were used, namely the Reynolds' (Reynolds et al. 1983) and the standard Nei distances (Nei, 1972), taking into account the corrections needed for a small sample size (Nei, 1978).

Principal components analysis (PCA) was performed using the SAS procedure PRINCOMP (SAS, 1990) according to the recommendation of Cavalli-Sforza et al. (1994). A neighbor-joining (NJ) tree (Saitou and Nei, 1987), using individual animals as operational taxonomic units (OTUs), was constructed with a distance matrix derived from the simple allele-sharing statistic (Bowcock et al. 1994). The distance was obtained using the MICROSAT computer programme (Minch et al. 1995). The PHYLIP package (Felsenstein, 1995) was then used to construct the tree from the distance matrix.

Results

Table 1 gives the Reynolds and Nei standard genetic distances. The smallest values were obtained for the AND-ZAM and MALL-ENC pairs by Reynolds and Nei distances, respectively. The largest were between AND-CAT for both distances.

Weitzman's representation, based on Nei's standard distance, is shown in Figure 1, where the branch length for each breed can be read, approximately, measuring its relative contribution to the corresponding diversity function. A clear discrimination is observed between two groups, i.e., a) a first group constituted only of the Andaluza breed (South of Spain), and b) another group involving all breeds of black coat of the North of Spain (Catalana, Encartaciones, Mallorquina, and Zamorano-Leonesa breeds).

The marginal losses of diversity attached to each breed, which may be taken as a measure of their "uniqueness", are shown in Table 2, based on the two distances considered. On average, the highest and lowest losses of diversity are incurred with the extinction of the Catalana and the Encartaciones breeds, respectively. It can also be seen, in Table 2, that the loss of the Andaluza + Catalana + Encartaciones breeds induces a markedly higher loss than the sum of the corresponding individual breeds losses.

The first three principal factors in the principal components (PCs) analysis are plotted in Figure 2. The first PC accounts for 52.0% of the underlying variation, the second PC condenses 15.0% and the third PC accounts for 13.8% of the variation. The first component, which explain more than the half of the existent variation, clearly separates the Spanish donkey breeds from the Moroccan ass population, and within the Spaniards, grouping closely the Catalana and Mallorquina breeds, in a similar way to the obtained in other studies (Aranguren-Méndez et al. 2001).

Figure 3 shows a NJ phylogenetic tree, constructed from the simple allele-sharing distance between 109 individuals, 20 animals taken at random from each population of Spanish donkeys, except for the Moroccan ass population in which all 9 individuals were used. Of the 100 Spanish donkeys represented in the tree, only 11 were

not clustered with animals from the same population, and some of the breeds are very closely clustered. For example, all AND and ENC animals are found in discrete clusters. The other breeds showed a comparable level of clustering, as do the CAT and MALL breeds. The ZAM and Moroccan animals show a more fragmented pattern of clustering, with animals from these two populations split into a number of distinct groups spread over the tree.

Discussion

Three different methods of study and its graphic representation of breed genetic diversity are presented: Weitzman´s method, the principal component analysis (PCA) and the neighbor-joining tree with allele-sharing.

Weitzman's diversity defines the diversity expected after a given period of time based on the extinction probability of each element of the set considered. If *n* elements are endangered, 2^{nd} survival-extinction patterns may occur with given probabilities, and for each pattern the resulting diversity may be calculated (Thaon d' Arnoldi et al. 1998). Knowing the pairwise genetic distances and the risk status of a given set endangered breeds, as expressed through their respective probabilities of extinction, an order of priority for a cryopreservation programme could thus be established.

In this study an opportunity is given for evaluating the global diversity in the set of breeds considered, using Weitzman's approach (1992, 1993). Table 2 clearly shows the wide range of contributions of each breed to overall diversity, ranging from about 19.19% (Encartaciones breed) to 29.11% (Catalana breed). Based on these distances (Reynolds and Nei distances), the AND, CAT and ENC breeds altogether account for

80% of the total diversity, which is an indicator for the potential value to preserve these local endangered breeds in the maintenance of biodiversity. The loss of diversity caused by extinction in a set of breeds can be estimated by the sum of the ordinates in the nodes, which would disappear from the tree if the extinct breeds were to be removed, without any other change. Thus, just by looking at the table, it is obvious that the loss of the Catalana breed would cause the decrease of diversity three or four times greater than the loss of the Mallorquina or Encartaciones breeds. Although the microsatellite-based phylogeny and the Weitzman diversity tree (Fig. 1) showed some identical clusters, it should not be expected that they will give the same information (Barker et al. 2001).

However, the results and the conservation decisions that one could take of the Weitzman's diversity analysis based on genetic distances should be taken with caution, as recent studies seem to indicate that these methods could be inappropriate for within-species breed conservation, because they ignore within-breed variation (Caballero and Toro, 2002).

Multivariate analysis of microsatellite allele frequencies (PCA) has previously been shown to be a powerful tool to reveal the underlying evolutionary history and admixture among distantly related populations (Schmid et al. 1999; Stahlberger-Saitbekova et al. 2001). However, its use as a technique to discern relationships among closely related populations is questionable (MacHugh et al. 1998).

The used markers did not show any breed specific allele allowing simple identification of the breed and allocation of each one of the individuals as to its breed origin. However, the NJ tree of individuals is in very good agreement with its population's structure (Fig. 3). Of the 100 Spanish donkeys examined, 89 (89.0%) form discrete clusters that coincide with the breed of origin of the sample. The position of

eleven individuals (11.0%) is not clearly defined in the tree, and the Moroccan ass shows a more fragmented pattern of clustering. Within-breed, these samples tend to form subclusters and they correspond to their source subpopulations to a very high degree (data not shown). Previous studies, which have used a microsatellite allele-sharing distance among individual organisms, have revealed a similar level of clustering within a population to that observed in Fig. 3 (MacHugh et al. 1998; Laval et al. 2000). More precisely, using breed allelic frequencies to calculate the likelihood that an animal belongs to a given breed and then assigning the animal to the breed showing the largest likelihood (using Bayesian methods as proposed by Rannala and Mountain, 1997) allowed at 90.64% the animals to be correctly assigned (data not shown).

The apparent taxonomic distinctiveness of a breed may not necessarily mean that it carries genes that are adaptively unique, as forces other than selection may have been operating. For example, random drift can affect the genetic distances among populations. When we are selecting breeds for conservation it may be important not just to consider taxonomic distinctiveness or between-population variation, but also to take measures within population diversity (Blott et al. 1998; Caballero and Toro 2002). Such measures could be included into a diversity index and population selected for conservation on the basis of this index. On the other hand, there is a need for measuring the overall diversity of a set breeds, since prospective evaluations of diversity are required for defining appropriate conservation policies, as advocated by Weitzman (1993). In addition to this, the usefulness of global evaluations of diversity using molecular markers for the choice of breeds is worthy of conservation. We hope that this information and that reported previously (Aranguren-Méndez et al. 2001; Jordana et al.

2001) will significantly contribute to the establishment of a sensible preservation strategy for these populations.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Professor J.L. Foulley (INRA, Quantitative & Applied Genetics) for his advice on the approach for the Weitzman analysis. This study was made possible by the financial support of the CICYT (project AGF98-0503) and the DARP (Generalitat de Catalunya). We are also grateful to the Breed Associations of the Spanish donkeys for their helpful co-operation and assistance during the sample collection, and we would like to thank Chuck Simmons for the English revision.

References

Aranguren-Méndez J.; Jordana J.; Gómez, M., 2001: Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. Genet. Sel. Evol. **33**: 433-442.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, G.G.; Smith, J.A.; Struhl, K., 1987. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

Barker, J.S.F., 1999: Conservation of livestock diversity. AGRI. **25:** 33-43.

Barker, J.S.F.; Tan, S.G.;Moore, S.S.; Mukherjee, T.K.; Matheson, J.-L.; Selvaraj, O.S. 2001: Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (Capra hircus). J. Anim. Breed. Genet. **118**: 213-233.

Blott, S.C.; Williams, J.L.; Haley, C.S., 1998: Genetics relationships among European cattle breeds. Anim. Genet. **29:** 273-282.

Breen, M.; Downs, P.; Irvin, Z.; Bell, K., 1994: Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalski's horse (*E. przewalskii*). Anim. Genet. **25:** 401-405.

Bowcock, A.M.; Ruiz-Linares, A.; Tomfohrde, J.; Minch, E.; Kidd, J.R.; Cavalli-Sforza, L.L., 1994: High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature **368:** 455-457.

Caballero, A.; Toro, M.A., 2002: Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conserv. Genet. (In Press).

Cavalli-Sforza, L.L.; Menozzi, P.; Piazza, A., 1994: The history and geography of human genes, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Falk, D.A., 1991: Joining biological and economic models for conserving plant genetic diversity. In: Falk, D.A.; Holsinger, K.E. (eds), Genetics and conservation of rare plants. pp 209-224. Oxford University Press, New York.

Felsenstein, J., 1995: PHYLIP (Phylogeny Inference package), Version 3.57c. University of Washington, Seattle, WA.

González-Candelas, F.; Montolío, A., 2000: Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. J. Hered. **91:** 134-141.

Jordana, J.; Folch, P.; Aranguren, J.A., 2001: Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed. J. Anim. Breed. Genet. **118:** 57-63.

Laval, G., Iannuccelli N, Legault C.; Milan, D.; Groenen, M.; Guiffra, E.; Anderson, L.; Nissen, P.; Jorgensen, C. Beeckmann, P.; Geldermann, H.; Foulley, J.L.; Chevalet,

C.; Olliver, L., 2000: Genetic diversity of eleven European pig breeds. Genet. Sel. Evol. **32:** 187-203.

MacHugh, D.E.; Loftus, R.T.; Cunningham, P.; Bradley, D.G., 1998: Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellites markers. Anim. Genet. **29:** 333-340.

Minch, E.; Ruiz-Linares, A.; Goldstein, D.B.; Feldman, M.W.; Cavalli-Sforza, L.L., 1995: MICROSAT (version 1.4): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. WWW: http://lotka.stanford.edu/research.

Nei, M., 1972: Genetic distances between populations. Amer. Nat. **106:** 283-292.

Nei, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics **89:** 583-590.

Rannala, B.; Mountain, J.L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 9197-9221.

Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C., 1983: Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. Genetics **105:** 767-769.

Saitou, N.; Nei, M., 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406-425.

SAS., 1990: SAS/Stat User's guide, version 6, 4th edn. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Schmid, M.; Saitbekova, N.; Gaillard, C.; Dolf, G. 1999. Genetic diversity in Swiss cattle breeds. J. Anim. Breed. Genet. **116**: 1-8.

Stahlberger-Saitbekova, N.; Schläpfer, J.; Dolf, G. Gaillard, C. 2001. Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. J. Anim. Breed. Genet. **118**: 379-387.

Thaon d'Arnoldi, C.; Foulley, J.L.; Olliver, L., 1998: An overview of the Weitzman approach to diversity. Genet. Sel. Evol. **30:** 149-161.

Weitzman, M.L., 1992: On diversity. Quart. J. Econ. **107:** 363-405.

Weitzman, M.L., 1993: What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. Quart. J. Econ. **108:** 157-183.

Authors' Addreses:

[1]Unitat de Genètica i Millora Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain.

[2]Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción Animal. Maracaibo 4001-A. Venezuela.

[3]Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia. Avda. Lehendakari Aguirre, 9, 2º, 48014 Bilbao. Spain.

Corresponding author: Jordi Jordana

(Fax: +34-935812006; e-mail: **Jordi.Jordana@uab.es**)

Legends to tables and figures

Table 1. Reynolds' distance estimate (below the diagonal) and standard Nei genetic distance (above the diagonal) among five Spanish donkey breeds.

Table 2. Marginal losses of Weitzman's diversity in Spanish donkey breeds.

Figure 1. Dendrogram of relationships established by Weitzman's method using standard Nei distance among five Spanish donkey breeds.

Figure 2. Principal components analysis of allele frequencies from 13 microsatellite loci typed in seven populations from five Spanish donkey breeds, and one Moroccan ass breed. The first PC accounts for 52.0%, second PC condenses 15.0% and the third PC condenses 13.8% of the variation.

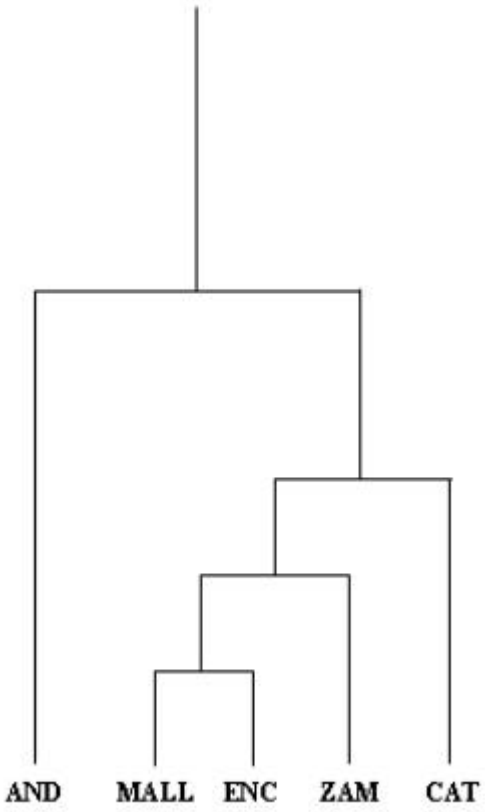
Figure 3. Neighbor-joining dendrogram constructed from allele-sharing distance among 109 individuals from five Spanish donkey breeds, and one Moroccan ass breed. Numbers to the right indicate the fraction of individuals of the breed.

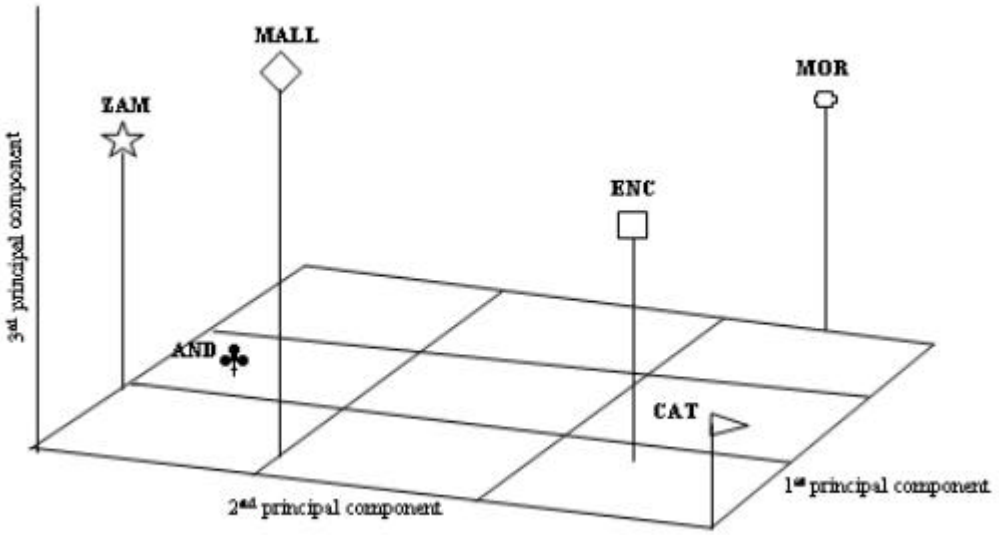
	Andaluza	Catalana	Mallorquina	Encartaciones	Zam-Leonesa
Andaluza	--------	**0.1324**	0.1074	0.0797	0.0737
Catalana	**0.0618**	--------	0.0801	0.0767	0.1140
Mallorquina	0.0561	0.0441	--------	*0.0597*	0.0702
Encartaciones	0.0452	0.0413	0.0379	--------	0.0723
Zamorano-Leonesa	*0.0372*	0.0537	0.0393	0.0407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

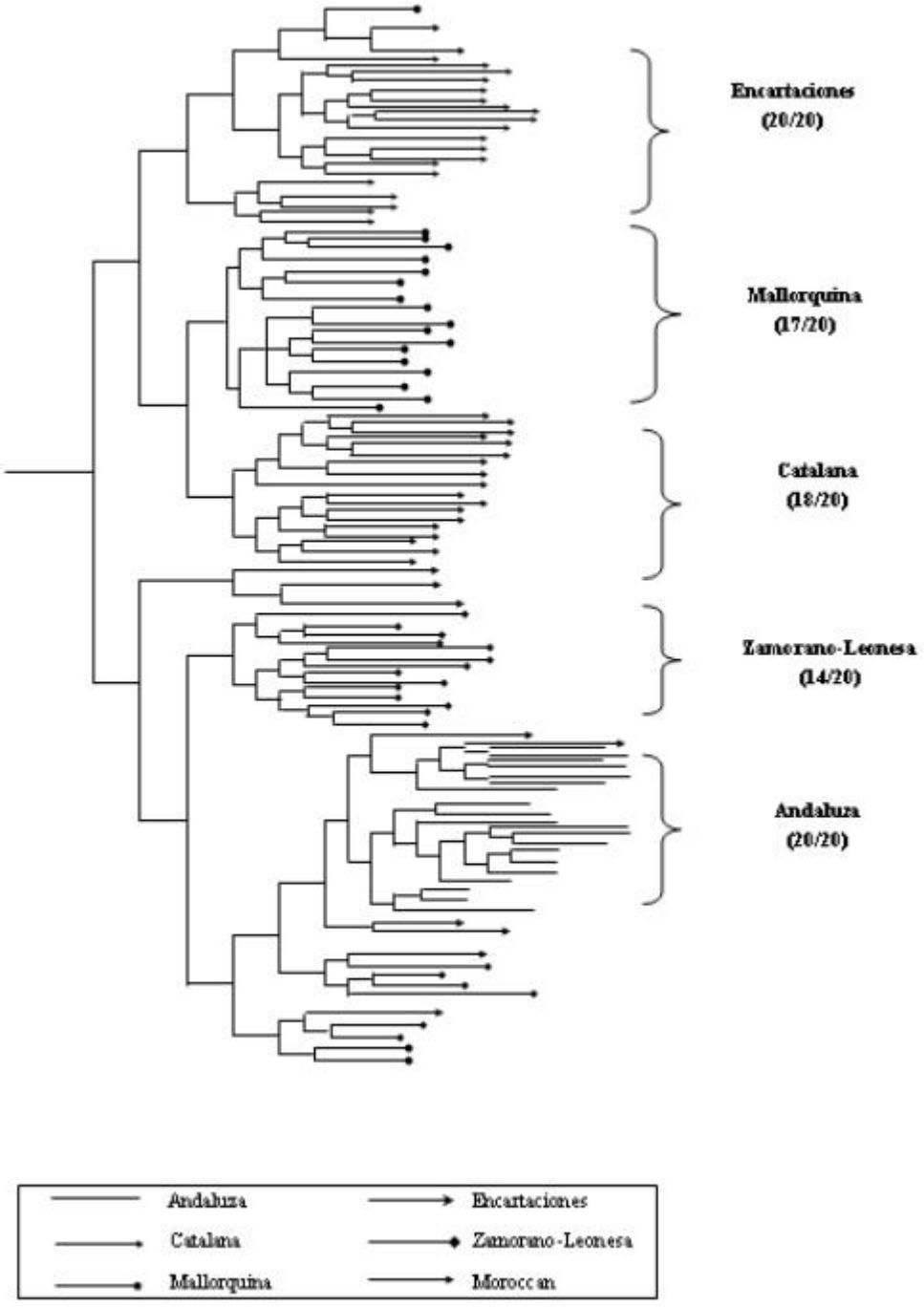
(greatest distances in bold; smallest distances in italics)

Breed loss (Q)	Reynolds distance: Diversity V(S\Q)	Reynolds distance: Absolute loss DV	Reynolds distance: DV/V (%)	Nei standard distance: Relative loss DV/V (%)	Nei standard distance: Diversity V(S\Q)	Nei standard distance: Absolute loss DV	Average: Relative loss DV/V (%)
None (0)	1810	0	0.00	0.00	3424	0	0.00
Andaluza (1)	1323	487	27.53	26.91	2460	934	28.15
Catalana (2)	1312	498	29.11	27.51	2373	1051	30.70
Mallorquina (3)	1403	407	20.16	22.49	2814	610	17.82
Encartaciones (4)	1431	379	19.19	20.94	2827	597	17.44
Zamorano-Leonesa (5)	1438	372	20.53	20.55	2722	702	20.50
(1) + (2)	786	1024	59.01	56.57	1320	2104	61.45
(2) + (4)	824	986	55.05	54.48	1520	1904	55.61
(1) + (4)	944	866	46.72	47.85	1863	1561	45.59
(1) + (2) + (4)	407	1403	78.20	77.51	723	2701	78.88
(2) + (3) + (5)	452	1358	75.88	75.03	797	2627	76.72

V(S\Q) = diversity after dropping Q from S; $\Delta V = V(S) - V(S\backslash Q)$ = absolute value.
$\Delta V/V$ = relative value (distance multiplied by 10,000)


AND
MALL
ENC
ZAM
CAT


MALL
MOR
ZAM
ENC
AND
CAT
3rd principal component
2nd principal component
1st principal component


Encartaciones
(20/20)
Mallorquina
(17/20)
Catalana
(18/20)
Zamorano-Leonesa
(14/20)
Andaluza
(20/20)
Andaluza
Catalana
Mallorquina
Encartaciones
Zamorano-Leonesa
Moroccan