Variación genética basada en el análisis de microsatélites en cuatro razas equinas del Pirineo occidental.

eman ta zabal zazu

universidad del país vasco — euskal herriko unibertsitatea

A. SOLIS, B. JUGO, F. RENDO, A. ESTONBA

Dpto. Biología Animal y Genética. Fac. Ciencias. Universidad del País Vasco. España

1. INTRODUCCION

Desde tiempos inmemoriales existen poblaciones de caballos salvajes en las montañas Cántabro-Pirenaicas, algunas de las cuales se mantienen aún hoy en día en estado salvaje o semisalvaje. Fenotípicamente son primitivos y robustos y están bien adaptados a su entorno.

Como parte de un proyecto más amplio sobre el análisis de la diversidad de las razas autóctonas Cántabro-Pirenaicas, se ha analizado el polimorfismo genético de 4 razas equinas:

* **Pottoka** (Pot), también llamado poney Vasco, se encuentra en las tres provincias de la Comunidad Autónoma Vasca, así como en el País Vasco Francés. Teniendo en cuenta el color de la capa y sus características morfológicas, pueden ser clasificados en tres secciones diferentes: A, B o C.
* **Jaca Navarra** (JN), también llamado poney Navarro, es una raza nativa localizada principalmente en Navarra. Aunque no se dispone aún del libro genealógico ya se ha puesto en marcha un Plan de Conservación.
* **Euskal Herriko Mendiko Zaldia** (EHMZ), conocido también con otros nombres como Caballo del País y Yegua de Monte, se encuentra principalmente en Araba. Para su análisis se han diferenciado cinco áreas: Cantábrica Alavesa, estribaciones del Gorbea, Llanada Alavesa, Valles Alaveses y Montaña Alavesa.
* **Burguete** (BU), se localiza en el noroeste de Navarra. Se originó a partir de cruzamientos entre hembras Jaca Navarra y machos de razas francesas.

En este trabajo se han planteado dos objetivos principales: en primer lugar la caracterización genética de estas poblaciones de caballos, con el fin de cuantificar la diversidad genética y sus relaciones filogenéticas. En segundo lugar la aplicación del análisis de microsatélites en la identificación individual y el análisis biológico de la paternidad. Ambos objetivos son necesarios para un correcto manejo de estas poblaciones.

Con el fin de conseguir estos objetivos hemos elegido marcadores de tipo microsatélite por su alto grado de polimorfismo y por la facilidad con la que pueden ser analizados mediante PCR. Además hay numerosos estudios que documentan la utilidad de los microsatélites para la estimación de la distancia genética entre poblaciones estrechamente relacionadas. Por último, son muy útiles también para el análisis individual y control de la paternidad.

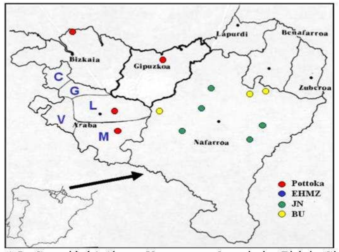

Figura 1. La Comunidad Autónoma Vasca con sus 3 provincias: Bizkaia, Gipuzkoa y Araba, y Navarra. Están indicados los puntos de muestreo.

Tabla 1. Razas analizadas, número de animales muestreados y tamaño poblacional estimado.

Raza	Localización	Nº de animales muestreados	Tamaño poblacional*	Libro genealógico
Euskal Herriko mendiko zaldia		166	4.500	Sí (1999)
	-Llanada Alavesa	58		
	-Valles Alaveses	22		
	-Montaña Alavesa	31		
	-Cantábrica Alavesa	9		
	-Gorbea	24		
	- Mixtos	22		
Burguete		13	5.200	No
Pottoka		146	1.141-2.000#	Sí (1995)
	- sección A	89		
	- sección B	41		
	- sección C	16		
Jaca Navarra		14	250	No
Pura raza		18		
TOTAL		357		

*Naturzale (1999) 14:157-165
Bizkaiko Foru Aldundia (1997), Carreras (1983)

Tabla 2 Microsatélites analizados y localización

Microsatélite	Cromosoma	Referencia
8plex		
VHL20	30	Van Haeringen (1994)
HTG4	9	Ellegren et al. (1992)
AHT4	24q14	Binns et al. (1995)
HMS7	1	Guérin et al. (1994)
HTG6	15q26-27	Ellegren et al. (1992)
HMS6	4	Guérin et al. (1994)
HTG7	4	Marklund et al. (1994)
HMS3	9	Guérin et al. (1994)
4plex		
AHT5	6	Binns et al. (1995)
ASB2	15q21.3-23	Breen et al. (1997)
HTG10	21	Marklund et al. (1994)
HMS2	10	Guérin et al. (1994)

Tabla 3. Número medio de alelos por locus (MNA), heterocigosidad observada y esperada, contenido de información de polimorfismo (PIC) y probabilidad de exclusión.

RAZA	N	MNA	H_O	H_E	PIC	EXCL.
EHMZ	144	10.50	0.739	0.755	0.722	0.999954
EHMZmix	22	5.92	0.684	0.670	0.610	0.999020
Burguete	13	4.67	0.723	0.670	0.601	0.998929
Pottokak A	71	8.58	0.739	0.762	0.728	0.9999959
Pottokak B	35	7.83	0.655	0.751	0.707	0.999920
Pottokakmix	16	7.67	0.748	0.764	0.709	0.99928
Jaca Navarra	14	5.83	0.750	0.735	0.671	0.992173
Pura raza	18	4.25	0.625	0.651	0.575	0.998010

Tabla 4. Probabilidad en cadena de Markov sobre las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Las celdas de color gris claro indican desviación significativa a un nivel de p≤0.05 y las celdas de color gris oscuro, una desviación significativa de p≤0.01.

	MZC	MZG	MZL	MZM	MZV	POT A	POT B	MZX	POT X	BU	JN
AHT4	.9572	.6254	.1606	.8772	.7574	.1893	.1320	.4001	.5188	.2707	.7041
AHT5	.7715	.5618	.3579	.9791	.3236	.4628	.5427	.1186	.0529	.3664	.5745
ASB2	.8182	.5889	.9018	.4444	.6945	.5418	.3243	.5973	.1797	.7213	.2937
HMS2	.2586	.6563	.8069	.2507	.7461	.5216	.8412	.2814	.5902	.6288	.5141
HMS3	.4341	.3028	.5455	.8243	.5468	.0000	.0392	.0322	.9663	.7657	.3207
HMS6	.5273	.0756	.1630	.5600	.8684	.8875	.0724	.5230	.4287	.8041	.6809
HMS7	.6364	.4440	.2212	.9131	.0454	.1978	.0817	.0290	.2833	.9612	.6106
HTG10	.8877	.4556	.5842	.7891	.2511	.0227	.0000	.0762	.4237	.7811	.5913
HTG7	.4108	.7996	.5779	.5648	.3445	.1251	.3685	.7674	.4200	1	.6171
HTG4	.7514	.7380	.3818	.0218	.2716	.4408	.9178	1	.9616	.5055	.1575
HTG6	.1602	.4143	.1513	.8460	.0003	.1956	.6723	.2983	.2995	1	.4807
VHL20	.7514	.6335	.8881	.3141	.2960	.2078	.1308	.5127	.5441	.6333	.9206

Tabla 5. Estadísticos F y su significación por locus en las razas analizadas. Significación: * 0.05>p>0.01; ** 0.01>p>0.001; *** p<0.001.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
AHT4	0.043 ±0.043	0.024 ± 0.044	0.020 ± 0.008
AHT5	0.018 ± 0.023	0.013 ± 0.022	0.005 ± 0.005
ASB2	0.077 ± 0.034	0.039 ± 0.029***	0.039 ± 0.013***
HMS2	-0.011 ± 0.031	-0.015 ± 0.029	0.004 ± 0.005
HMS3	0.097 ± 0.048*	0.062 ± 0.036***	0.036 ± 0.019***
HMS6	0.046 ± 0.039	0.018 ± 0.037*	0.028 ± 0.013***
HMS7	0.017 ± 0.037	0.002 ± 0.037	0.015 ± 0.011**
HTG10	0.135 ± 0.039***	0.126 ± 0.040***	0.011 ± 0.007**
HTG7	0.028 ± 0.026	-0.010 ± 0.034	0.038 ± 0.013***
HTG4	0.039 ± 0.024	0.028 ± 0.024	0.012 ± 0.007
HTG6	0.089 ± 0.037*	0.072 ± 0.037**	0.018 ± 0.008***
VHL20	0.058 ± 0.026	0.039 ± 0.025**	0.020 ± 0.007***
All loci	0.052 ± 0.011***	0.032 ± 0.011***	0.021 ± 0.003***

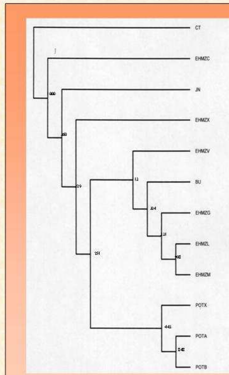

Figura 2. Arbol UPGMA entre poblaciones de caballos Cántabro-Pirenaicos. Están incluidos los individuos de pura raza.

2. MATERIALES Y METODOS

RAZAS

Han sido analizados un total de 339 animales pertenecientes a cuatro razas nativas (ver tabla 1). Estos animales fueron muestreados evitando el parentesco entre animales en la medida de lo posible. Se ha incluido una pequeña muestra de 18 individuos de pura raza a modo de referencia.

ANALISIS DE MICROSATELITES

El DNA fue extraído de sangre total siguiendo protocolos standard. Los microsatélites analizados y las condiciones de PCR fueron las descritas en el protocolo de Stock Marks para caballos, Equine Paternity PCR Typing Kit (ver tabla 2). Para la estandarización de nuestra nomenclatura se utilizaron como referencia las muestras del Comparison Test de 1999, cuyo genotipado ha sido verificado en el Congreso de la International Society of Animal Genetics en Julio de 2000.

ANALISIS ESTADISTICO

* La heterocigosidad esperada, contenido de información de polimorfismo (PIC) y probabilidades de exclusión han sido estimados mediante el programa CERVUS (T. Marshall, 1998).
* El test para la desviación del equlibrio de Hardy-Weinberg fue llevado a cabo mediante la versión 1.2 del programa GENEPOP (Raymond and Rausset, 1995). Este método utiliza un test exacto del equilibrio de HW y además, para combinaciones de loci/población con 5 o más alelos, utiliza un algoritmo en cadena de Markov, para obtener una estima imparcial de la probabilidad exacta de que el equilibrio sea rechazado erroneamente.
* La diferenciación genética entre poblaciones fue analizada en todos los loci mediante los valores Fst (Weir and Cockerham, 1984), utilizando el programa FSTAT (Goudet, 1995) y su significación estadística fue testada utilizando un test de permutación.
* El árbol filogenético fue elaborado utilizando el método UPGMA basado en la distancia de Nei (Nei, 1972), también llamada distancia Ds. La robustez del árbol fue evaluada llevando a cabo un bootstrap de 1000 iteraciones mediante el paquete estadístico PHYLIP (Felsestein, 1989).

3.RESULTADOS

· En la tabla 3 se representan algunos parámetros estimados para cada población: número medio de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada y PIC. No existen grandes diferencias entre las poblaciones analizadas. La mayor variabilidad fue encontrada en la raza EHMZ y los valores más bajos en cambio, en las poblaciones con menor número de individuos, indicando que deben ser analizados más animales para poder realizar una comparación adecuada. El valor medio de PIC puede considerarse altamente informativo (PIC>0.5).

· Seis poblaciones están en equilibrio para todos los marcadores analizados, pero no las cinco restantes (ver tabla 4.). El marcador HMS3 no está en equilibrio en tres poblaciones, HMS7 y HTG10 en dos y HTG4 y HTG6 en una.

· Respecto a la distribución de la variación genética observada dentro y entre las razas, el 2% de la variabilidad puede ser atribuida a las diferencias entre razas (Fst medio= 0.02, p<0.001) (ver tabla 5).

· La robustez del árbol (figura 2) fue medida mediante un bootstrap de 1000 iteraciones. Los números muestran el número de veces que fue encontrado un nodo concreto en los 1000 árboles bootstrap. Tal y como esperábamos, los Pottokas de las secciones A y B aparecen agrupados en 848 árboles de los 1000. Por otro lado, en cuanto al análisis comarcal de la raza EHMZ, la mayoría de las muestras de esta raza se agrupan, (excepto EHMZC, que cuenta con un pequeño tamaño muestral). Al conjunto de comarcas de EHMZ se une también la raza Burguete, pero en este caso es necesario un estudio con un tamaño de muestra mayor para poder clarificar esta agrupación. El grupo que presenta mayor distancia con respecto a todas las poblaciones restantes corresponde al grupo formado por caballos pura sangre.

4. CONCLUSIONES

* En concordancia con otras investigaciones nuestros resultados indican que, en general, la variabilidad de los loci microsatélite en estas poblaciones es tan elevada como la de otras poblaciones analizadas con los mismos microsatélites, siendo estos marcadores una herramienta útil en estudios poblacionales y en controles de paternidad.

* Estos resultados no pueden considerarse definitivos, ya que en las razas Jaca Navarra y Burguete no se ha analizado el número adecuado de individuos. En este momento estamos realizando un muestreo para completar el número de animales analizados en dichas razas.

Pretendemos, por tanto, extender nuestro análisis con más animales y ampliar el número de microsatélites analizados, con la intención de obtener una visión completa de la estructura genética y relaciones filogenéticas de estas razas equinas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y apoyo de Koldo Gotzon Pérez de la Diputación Foral de Araba, Jon Agirre de SERGAL, Iñigo Agirre de la Diputación Foral de Gipuzkoa, Alberto Pérez de Munain de ITG-Ganadero, e Iñaki Intxausti e Iñigo Pascual de la Diputación Foral de Bizkaia. Gracias también a el Dr. J.L.Vega-Plá por la ayuda ofrecida en la estandarización de la nomenclatura de los microsatélites y a todos los criadores de caballos por su colaboración. Este estudio ha sido subvencionado por la UPV/EHU y por el Departamento de Industria del Gobierno Vasco y las asociaciones de ganaderos Ardiekin, Lurgintza y SERGAL.