

COMUNICACIÓN

DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE PONIS ESPAÑOLES: RESULTADOS PRELIMINARES

GENETIC VARIABILITY IN TWO SPANISH HORSE POPULATIONS: PRELIMINARY RESULTS

Checa, M.L.¹, J.L. Vega², M.A. García-Atance¹, M. Vallejo¹ y S. Dunner¹

¹Laboratorio de Genética Molecular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid. España.

²Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Cría Caballar. 14071 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Équido. Distancia genética. Frecuencia alélica. Heterocigosis. Polimorfismo.

ADDITIONAL KEYWORDS

Equine. Genetic distance. Allelic frequency. Heterozygosity. Polymorfism.

RESUMEN

Para el estudio de la variabilidad genética de tres poblaciones diferentes de caballos, Asturcón, Pottoka y Pura Sangre Inglés (PSI), habiéndose constituido esta última como población de referencia, se ha analizado la distribución de las frecuencias alélicas de 10 STR (Short Tandem Repeat) *loci* equinos. La variabilidad genética encontrada en las razas de ponis es superior a la del PSI y solo uno de los *loci* analizados se desvía significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg ($\alpha = 0,01$) en las poblaciones de Asturcón y Pottoka. El valor F_{ST} estimado (0,054) muestra una divergencia significativa entre Asturcón y Pottoka, asimismo la distancia genética calculada entre ambas poblaciones es inferior comparada a la que tienen ambas con respecto al PSI.

SUMMARY

The genetic variability has been analyzed

through the allelic frequencies distribution of ten STR (Short Tandem Repeat) equine *loci* of three different horse populations, Asturcón, Pottoka and Thoroughbred (PSI), which is considered as an outgroup. The genetic variability found in the pony breeds is higher than for PSI and only one of the ten *loci* analyzed is significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($\alpha = 0.01$) in Asturcón and Pottoka populations. The F_{ST} value (0.054) shows a significant divergence between Asturcón and Pottoka, besides the genetic distance calculated between both populations is very lower compared to their relation with PSI.

INTRODUCCIÓN

En España existen siete razas de ponis, cinco distribuidas en la zona cantábrica peninsular, Asturcón, Pottoka, Jaca Navarra, Faco Gallego y Losino, y otras dos razas situadas en el

Arch. Zootec. 47: 169-174. 1998.

archipiélago Balear (el poni Mallorquín y el Menorquín). La teoría más difundida sitúa el origen del grupo de ponis asentados en el norte de España en los caballos que los celtas introdujeron en la península Ibérica durante el siglo VIII a. de C. El asentamiento de estas poblaciones en zonas geográficas más o menos aisladas ha dado lugar a diferenciaciones genéticas que tradicionalmente han sido observadas a nivel morfológico, siendo las diferencias fenotípicas las utilizadas inicialmente para caracterizar e incluso relacionar taxones desde un punto de vista evolutivo. Con el paso del tiempo han surgido otro tipo de caracteres, los marcadores genéticos, no influenciados por la selección y capaces de detectar un mayor nivel de variabilidad, con los que se pueden establecer de forma más fidedigna las relaciones filogenéticas entre especies, razas o variedades, así como caracterizar de forma más precisa a cada individuo. Aunque en la actualidad se siguen empleando los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos para este tipo de propósitos, desde que Litt y Luty (1989) y Weber y May (1989) descubrieron que en el genoma existen unas secuencias del tipo di-, tri- o tetranucleótidos repetidas en tándem con una longitud generalmente inferior a 400 pares de bases, denominadas STRs (Short Tandem Repeat) o microsatélites, éstas se han convertido en una herramienta muy valiosa para el estudio de poblaciones con el fin de conocer la variabilidad genética. Y además en el caso de tratarse de poblaciones en peligro de extinción es posible establecer estrategias de apareamientos que minimizando la consanguinidad permiten mejo-

res protocolos de conservación (Amos *et al.*, 1993; Inoue y Takenaka, 1993; Morsch y Leibenguth, 1993; Dunner *et al.*, enviado a publicar).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos sobre la distribución de la variabilidad genética establecida a partir de 10 microsatélites en dos poblaciones de ponis españoles, Asturcón y Pottoka, en relación a la población de referencia PSI, los cuales se integrarán más adelante con los obtenidos en el resto de poblaciones de ponis españoles citados con anterioridad. La aplicación de estos marcadores podría proporcionar una información muy útil para conocer la proximidad relativa entre todas estas razas, así como la posibilidad de establecer programas de manejo reproductivo que mejoren la situación de aquellas cuyo censo es muy reducido.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Se obtuvieron muestras de sangre de forma aleatoria de 3 poblaciones, de dos razas de ponis españoles, Asturcón y Pottoka, y como población de referencia el PSI. Los tamaños de muestra empleados fueron: Asturcón (50), Pottoka (40), PSI (60).

TÉCNICAS MOLECULARES

A partir de las muestras de sangre se extrajo el ADN genómico por extracción fenólica y se amplificaron los microsatélites seleccionados de acuerdo con la lista del ISAG (1996) (**tabla I**). El producto resultante de la amplificación PCR (Polymerase Chain Reaction) se sometió a electroforesis

VARIABILIDAD GENÉTICA EN PONIS ESPAÑOLES

en geles de poliacrilamida (19:1) y posterior tinción con plata (Bassam *et al.*, 1991). La asignación de los alelos se estableció tomando como referencia individuos que habían sido previamente consensuados (ISAG, 1996) para cada uno de los *loci* utilizados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tras conocer el genotipo de cada uno de los animales para los 10 *loci* estudiados, se calcularon las *frecuencias alélicas* dentro de cada población y a partir de ellas se calcularon los parámetros estimativos de la variabilidad genética: *PIC* (*Polymorphism Information Content*) (Botstein *et al.*, 1980), *Heterocigosis* (*H*) (Ott, 1992), *NEA* (*Número Efectivo de Alelos*) (Kimura y Crow, 1964) y *NMA* (*Número Medio de Alelos*), por *locus* y su media. Las diferencias de *H* y *NEA* entre las tres poblaciones se calcularon utilizando el test de Wilcoxon (Snedecor y Cochran 1978; Estoup *et*

al. 1995) usando la versión 6 del paquete informático SAS (SAS Institute 1989).

La heterogeneidad existente en las frecuencias alélicas entre poblaciones para cada *locus* y en conjunto, y la desviación de los marcadores con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones, se calcularon mediante una χ^2 de Pearson utilizando el paquete informático BIOSYS-1 (Swofford y Selander 1981).

Para conocer la estructura genética existente entre y dentro de las dos poblaciones de ponis se calcularon los F-estadísticos de Wright (1969) usando el método de Weir y Cockerham (1984) el cual incorpora el tamaño de las muestras y el número de subpoblaciones. Las distancias genéticas entre las distintas poblaciones se calculó utilizando la distancia genética (*D*) de Nei (1972).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los microsatélites fueron polimórficos en las tres poblaciones, con un *PIC* medio máximo de 77,0 (Pottoka) y medio mínimo de 67,7 (PSI) (valores no presentados) y un número de alelos medio máximo de 7,2 (Pottoka) y medio mínimo de 5,3 (PSI) (**tabla II**).

En la **tabla II** se presentan los valores de *H* de las dos poblaciones de ponis y el *PSI*, por *locus* y su media. Al comparar los valores de las tres muestras utilizando el test de Wilcoxon, únicamente entre *PSI* y Pottoka existen diferencias para un nivel de significación empírico del 0,06 p.100.

A pesar de que no existen diferen-

Tabla I. Características de los microsatélites empleados en el trabajo. (Characteristics of the microsatellites used in the study).

	Rango de Alelos	Referencia
HTG4	120-140	Ellegren <i>et al.</i> 1992
HTG6	80-107	"
HTG7	118-130	Marklund <i>et al.</i> 1994
HTG10	92-112	"
HMS2	218-238	Guerin <i>et al.</i> 1994
HMS3	149-172	"
HMS6	157-171	"
HMS7	172-188	"
VHL20	86-106	Van Haeringen <i>et al.</i> 1994
ASB2	154-168	GenBank, Accesion X93516

Tabla II. Heterocigosis (H), NEA (Número Efectivo de Alelos), NMA (Número Medio de Alelos), por locus y media para las dos razas de ponis (Asturcón y Pottoka), y la población de referencia (PSI). Significación de la desviación con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg. (Heterozygosity (H), NEA (Effective Number of Alleles), NMA (Mean Number of Alleles), by locus and mean for the two pony breeds (Asturcón and Pottoka), and the outgroup population (PSI). Significance of the deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium).

	ASTURCÓN			POTTOKA			PSI		
	H (p.100)	NEA (NMA)	H -W	H (p.100)	NEA (NMA)	H -W	H (p.100)	NEA (NMA)	H -W
HTG4	72,4	3,6 (5)	ns	65,0	2,9 (6)	ns	57,3	2,3 (5)	ns
HTG6	52,4	2,1 (7)	ns	65,1	2,9 (6)	ns	63,0	2,7 (5)	ns
HTG7	63,5	2,7 (4)	ns	68,2	3,1 (4)	ns	63,4	2,7 (4)	ns
HTG10	79,5	4,9 (8)	ns	83,0	5,9 (9)	ns	80,7	5,2 (7)	ns
HMS2	83,1	5,9 (9)	ns	82,5	5,7 (7)	ns	48,2	1,9 (4)	ns
HMS3	76,1	4,2 (9)	**	81,8	5,5 (8)	**	67,0	3,0 (6)	ns
HMS6	61,7	2,6 (5)	ns	79,7	4,9 (6)	ns	62,8	2,7 (5)	ns
HMS7	73,7	3,8 (6)	ns	75,6	4,1 (7)	ns	78,3	4,6 (5)	ns
VHL20	82,4	5,7 (8)	ns	86,3	7,3 (10)	ns	71,8	6,6 (4)	ns
ASB2	80,4	5,1 (7)	ns	82,7	5,8 (9)	ns	84,9	3,5 (8)	ns
MEDIA	78,8 ^{ab}	4,2 (6,8)		83,9 ^a	4,9 (7,2)		72,7 ^b	3,6 (5,3)	

ns: No Significativo, **p<0,01.

En las medias, letras distintas indican diferencias significativas.

cias significativas en los valores finales medios de H y NEA entre Pottoka y Asturcón, el análisis de heterogeneidad de las frecuencias alélicas muestra diferencias significativas ($\alpha=0,01$) entre las tres subpoblaciones. Estas diferencias son debidas en buena medida al hecho de que hay alelos presentes en unas poblaciones y no otras, y demuestran una diferenciación entre las poblaciones. Un ejemplo: PSI: HMS6, alelo P* (171pb)=0,45, Asturcón: HMS2, alelo R* (234pb)=0,11.

*Denominación de los alelos establecida en ISAG (1996).

Ninguno de los loci se desvía significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg ($\alpha=0,01$), excepto Pottoka y Asturcón en el caso del locus HMS3, que muestran un exceso de homocigotos para este marcador.

La distribución de la diversidad genética presente en las dos razas de ponis se analizó por medio de los estadísticos de Wright (1969). En todos los casos los valores obtenidos fueron significativamente diferentes de 0 y positivos. El valor de F_{IS} que mide el defecto de heterocigotos como consecuencia del aislamiento reproductivo el cual lleva a un cruzamiento no aleatorio de

VARIABILIDAD GENÉTICA EN PONIS ESPAÑOLES

Tabla III. Distancia genética (D) de Nei (1972) y estadísticos F de Wright (1969). (Genetic distance of Nei (1972) and F of Wright).

	Distancias genéticas	
	ASTURCIÓN	POTTOKA
POTTOKA	0,226	-
PSI	0,616	0,455
	Estadísticos F de Wright	
F_{IS}	0,043*	0,045*
F_{ST}	0,054*	
F_{IT}	0,096*	

*Significativo. $p < 0,05$

los animales, indica que el 4,4 p.100 de los homocigotos se deben a esta causa. El valor F_{ST} que estima la divergencia que existe entre las dos razas como consecuencia de la deriva genética fue de 0,054, lo que indica que únicamente el 5,4 p.100 de la variabilidad genética existente es debida a diferencias entre las dos poblaciones, y el 94,6 p.100 restante se debe a diferencias entre individuos. F_{IT} cuyo valor fue de 0,096 da idea de la pérdida de variabilidad

BIBLIOGRAFÍA

- Amos, B., C. Schlotterer and D. Tautz. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 260: 670-672.
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 80: 81-84.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Gen.*, 32: 314-331.
- Ellegren, H., M. Johansson, K. Sandberg and L. Andersson. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Gen.*, 23: 133-142.

genética que existe como consecuencia de las dos causas anteriores, y en este caso se reparte proporcionalmente entre F_{ST} y F_{IS} .

El resultado de las distancias genéticas entre las poblaciones son demostrativas de que las dos poblaciones de ponis están menos alejadas entre sí que con respecto al PSI (tabla III).

En conclusión puede decirse que las dos poblaciones de ponis incluidas en este estudio preliminar, Asturcón y Pottoka, muestran diferencias significativas entre ellas (F_{ST} y análisis de heterogeneidad de las frecuencias alélicas significativos) permitiendo considerarlas en la actualidad como dos razas que, aunque cercanas filogenéticamente, poseen rasgos genéticos diferentes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el soporte financiero del trabajo a ACPRA (Asociación de Criadores de Ponis de Raza Asturcón), a la Consejería de Asturias y Caja de Asturias, así como a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Grant nº agf-95-064).

- Estoup, A., L. Garnery, M. Solignac *et al.* 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: 679-95.
- Guerin, G., M. Bertaud and Y. Amigues. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites. *Anim. Gen.*, 25: 62.
- Inoue, M. and O. Takenaka. 1993. Japanese macaque microsatellite PCR primers for paternity testing. *Primates*, 34: 37-45.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- Litt, M. and J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.*, 44: 397-401.
- Marklund, S., H. Ellegren, S. Erikson, K. Sandberg and L. Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Gen.*, 25: 19-23.
- Morsch, G. and F. Leibenguth. 1993. DNA fingerprinting of the roe deer, *Capreolus capreolus*. L. *Comp. Biochem Phys.*, 104B: 229-233.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- Ott, J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Gen.*, 51: 283-290.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1978. *Statistical Methods*, 6th edn. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Swofford, D.L. and R.B. Selander. 1989. BIOSYS-1: a computer program for the analysis of the allelic variation in population genetics. Release 1.7 Illinois Natural History Survey (Swofford D.L., ed.) Champaign, Illinois, 1-43.
- Van Haeringen, H., A.T. Bowling, M.L. Stott, J.A. Lenstra and K.A. Zwaagstra. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus VHL20. *Anim. Gen.*, 25: 207.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.*, 44: 388-396.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol.*, 38: 1358-1370.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the Genetics of Population*, Vol. IV. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press. Chicago.