

UTILIZACIÓN DE MARCADORES DE ADN (MICROSATÉLITES) EN POBLACIONES DE ANIMALES DOMÉSTICOS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.

José A. Aranguren-Méndez¹ y Jordi Jordana²

1.- Prof. Asociado. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Actualmente realizando estudios de Doctorado en la Universidad Autónoma de Barcelona. mail joseatilio.aranguren@campus.uab.es

2.- Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. Programa de Conservación de Especies. mail Jordi.Jordana@uab.es

Durante los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones ha tomado 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 un patrimonio de inestimable valor. La pérdida de diversidad genética merma nuestra capacidad para mantener y mejorar la producción y productividad pecuarias y la agricultura sostenible, y reduce la aptitud para hacer frente a 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 encuentran en países desarrollados (FAO, 1995). La importancia e interés de la conservación de razas, se puede resumir en cuatro aspectos: el primero de ellos es de orden genético-productivo, ya que la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad

de las poblaciones, la cual permite la adaptación a diferentes ambientes, algunas veces adversos; el segundo 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; el tercero de orden histórico-cultural, dado que la conservación de determinadas razas representan un patrimonio genético de un país y como historia viva y paralela al desarrollo de la población humana; y el cuarto 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 (Simons, 1984; Anonymous, 1992).

El principal objetivo que se persigue en un programa de conservación de animales vivos “*in situ*”, es el MANTENIMIENTO DE LA MÁXIMA CANTIDAD DE DIVERSIDAD GENÉTICA con el MÍNIMO INCREMENTO POSIBLE DE CONSANGUINIDAD POR GENERACIÓN.

Para ello una de las primeras etapas de un programa de conservación de razas, consiste 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 indiquen la presencia de variantes genéticas únicas (González-Candelas y Montolio, 2000).

Uno de los principales problemas que afectan a las 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.

Desde el punto de vista práctico, para llevar a cabo los objetivos planteados anteriormente, lo ideal sería poder contar con la información genealógica (registros) y una vez analizada, calcular los llamados índices de Índice de Conservación Genética (CGI), o lo que es lo mismo el número efectivo de fundadores (f_e), que nos dan un indicio de la variabilidad genética ancestral retenida por un individuo, así como con las estimaciones de consanguinidad (f) ya sea a partir de las matrices de parentesco o por análisis directo de las consanguinidades individuales. Una vez obtenido esto, proponer entonces los apareamientos más óptimos entre los individuos, para intentar retener la máxima variabilidad genética en las futuras generaciones.

En resumen, con la información disponible podríamos entonces llevar a cabo un programa de conservación, maximizando el tamaño efectivo de población o número efectivo de reproductores (N_e), para asegurar que tantos animales como sea posible contribuyan con descendientes a la siguiente generación, para así garantizar que el incremento de la consanguinidad por generación sea mínimos (Jordana y Folch, 1998). Para ello, se ha de llevar a cabo tres objetivos teóricos: **a)** igualar la relación (ratio) de sexo, a la hora de su contribución a la próxima generación ($N_m \approx N_f$), evitando las fluctuaciones en el tamaño de población, procurando que el mayor número de familias contribuyan con descendientes, siendo lo ideal que cada macho (semental) contribuyera con una descendencia macho y cada hembra (vientre) con una descendencia hembra a la próxima generación; **b)** estandarizar el tamaño de familia, minimizando su varianza (σ^2_k) y **c)**

incrementar el intervalo generacional, alargando para ello, la vida reproductiva de los reproductores.

Sin embargo, cuando los registros genealógicos no son fiables o simplemente no existen, se deberían buscar otras estrategias, que nos permitieran prevenir ese riesgo de pérdidas. En la actualidad, muchos de estos estudios sobre conservación de razas se basan en los análisis genéticos, a través del uso marcadores moleculares de ADN. Entre estos marcadores se cita el uso de los microsatélites o “*short-sequence repeat tandem*” (SSRT).

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (figura 1). Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994), ya que: son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son cien por cien fiables, repetitivos y automatizables, tal y como se puede apreciar en la Figura 2.



Figura 1. Microsatélites. Ejemplo de un di-nucleótido A-C(n)

Es por ello que la FAO (Barker y col. 1993) propuso un programa global para el manejo de los recursos genéticos de los animales domésticos usando dicha metodología, recomendando el análisis de 50 individuos no emparentados por raza (25 machos y 25 hembras) y un mínimo de 25 microsatélites.

Desde el desarrollo de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) por Mullis y col. (1986), que consiste en 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) y con el uso de dos secuencias cortas e informativas de oligos, denominados “*primers*” que resultan ser específicos de la región de interés y que garantizan que sólo esa parte, y ninguna otra, va a amplificar, se han ido desarrollando una serie de técnicas para realizar estudios de variabilidad genética en las especies animales.

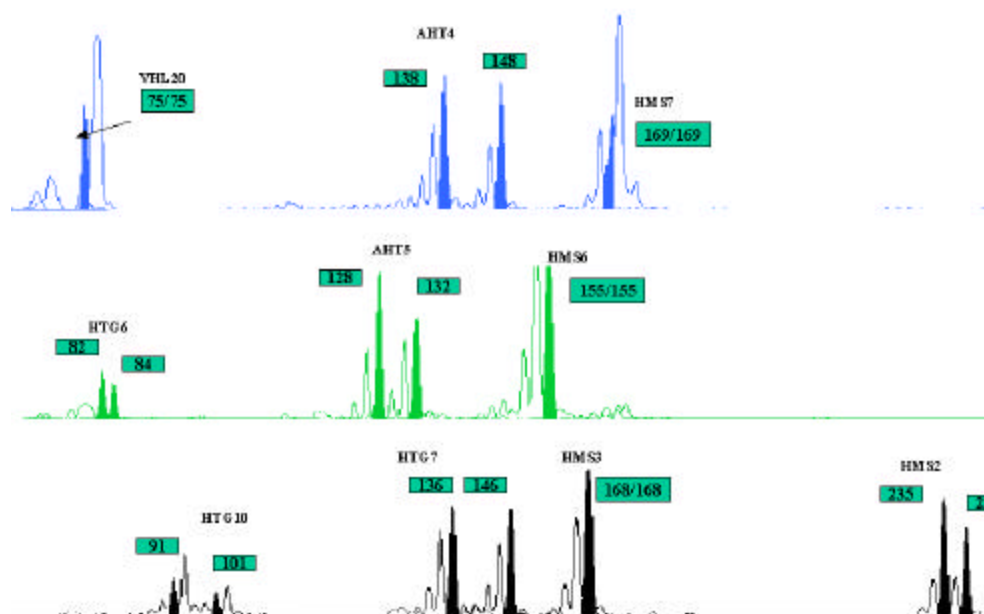


Figura 2. Microsatélites de caballos amplificados es muestras de Asnos Españoles. (Automatización de la leyenda).

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: 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.

El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos. Para elegir el tipo de marcador a utilizar, éste debe presentar, además de las características anteriormente descritas, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductividad y precisión, no presencia de alelos “nulos”, información del genotipo transferiblemente rápida, no limitado únicamente a muestras sanguíneas frescas, que no requiera grandes cantidades de ADN, y que presenten una segregación independiente con los otros marcadores al ser combinados en la prueba.

Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio, son 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 investigados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una muy buena aproximación de la filogenia (Takezaki and Nei, 1996). Probablemente este es el campo en el cual han sido más extensamente utilizados, mientras que su otro gran campo de acción ha sido para

la construcción de mapas genéticos (proyecto del genoma humano y diferentes proyectos de mapas en animales domésticos).

En los estudios de genética poblacional, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, y obtener datos poblacionales, calcular las frecuencias alélicas, y a partir de estas estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock y col. 1994; Ponsuksili y col. 1999).

La diversidad o variabilidad genética se puede definir como “la habilidad 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). Y pueden ser medidos, a través de una gran diversidad de estadísticos que cuantifican la variabilidad genética y resumen la información a términos más manejables. Cada uno de ellos aprecia diferentes aspectos de la variabilidad y su utilidad práctica estará en función del propósito del estudio.

Si lo que pretendemos es analizar las diferencias existentes dentro de las poblaciones, la variabilidad detectada por medio de microsatélites se convierte en un instrumento eficaz de estudio e información. Esto puede hacerse de diversas formas, pero se utiliza generalmente la tasa o índice de contenido polimórfico (PIC), número medio de alelos por locus, la heterocigosidad, la probabilidad de exclusión (PE), etc. (ejemplo en Tabla I).

Si el objetivo es comparar la diferenciación existente entre poblaciones, se estima entonces la divergencia evolutiva entre ellas, sobre la base de sus frecuencias génicas. Para ello, resulta más indicado el uso de los índices de distancia genética que permiten establecer comparaciones y determinar sus relaciones filogenéticas y los análisis de la

estructura de la población, mediante el uso de los F-estadísticos (Wright, 1965; Nei, 1977; Weir y Cockerham, 1984); análisis este que permite determinar el déficit o exceso de heterocigotos en la población (es).

Tabla I. Número total y rango de los alelos observados, Heterocigosidades (H_S y H_T), coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}), PIC y PE, en razas de Asnos españoles.

Microsatélite	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
HT5	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 (± 0.17)	0.658 (± 0.14)	0.036*** (± 0.023)		0.999

*** P<0.001

Tomado de Aranguren-Méndez y col. 2001.

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.

Son muchos los ejemplos de estudios de variabilidad y distancias genéticas entre poblaciones cercanas. En mamíferos se han usado tanto para programas de conservación en

especies en peligro de extinción (Ali y col.1999; Aranguren-Méndez y col. 2001), como para el estudio del origen geográfico de diversas poblaciones humanas (Bowcock y col. 1994).

Las medidas de distancias genéticas entre poblaciones proveen información muy importante acerca de las relaciones genéticas existentes entre razas y/o líneas, ayudando a seleccionar y priorizar aquellas a ser conservadas. Existen actualmente diversas distancias genéticas que pueden ser utilizadas para este fin; sin embargo, se han realizado análisis de simulación para ver cual de ellas se ajustan mejor a los estudios con microsatélites (Takezaki y Nei, 1996; Nagamine y Higuchi, 2001). Los resultados indicaron que las mejores distancias, utilizando microsatélites, resultaron ser la distancia “ D_A ” de Nei (, Nei y col. 1983) y la distancia de cuerda (D_C , Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), ambas con el algoritmo neighbor-joining (NJ) como método de reconstrucción filogenética; y cuando el principal interés fuera la correcta asignación de la topología. Mientras que, la distancia estándar de Nei (D_S , Nei, 1972) y la distancia $(\delta\mu)^2$ de Goldstein y col. (1995), serian de elección cuando el principal interés fuera la estimación de los tiempos evolutivos. Esto es debido al patrón de mutación que presentan los microsatélites.

Existe otra distancia, que a pesar de no haber sido utilizada para estos fines, desde el punto de vista práctico podría ser de muy buena ayuda a la hora de establecer o asignar los parentescos entre los individuos, cuando se desconoce la información genealógica. Esta distancia denominada “Alelos compartidos” (alleles shared; D_{AS} Bowcock y col, 1994), se basa en la agrupación de individuos de acuerdo a su parecido, por el hecho de compartir una mayor o menor cantidad de alelos (Figura 3). A pesar de no ser cien por ciento fiable, ya que dos individuos pueden compartir uno o varios alelos y no ser parientes; sin embargo,

desde el punto de vista teórico, podría ser de gran ayuda para establecer uno de los objetivos de los programas de conservación, como es el de planificar apareamientos con el mínimo de consanguinidad. Actualmente ya se comienzan a dislumar los primeros trabajos al respecto.

Diferentes autores (Bjørnstad y Røed, 2001; Eding y Meuwissen, 2001) han reportado el cálculo de las estimaciones de parentesco entre y dentro de poblaciones a partir de marcadores genéticos, mostrando una alta correlación entre las asignaciones de parentesco a través de pedigrí y las asignadas por el método de los alelos compartidos.



Figura 3. Ejemplo de un árbol filogenético utilizando la distancia D_{AS} y el algoritmo NJ. Cada individuo es tomado como una unidad taxonómica operativa (cada color representa una raza diferente)

Para finalizar, indicar que cuando, escogemos razas para ser conservadas, es muy importante además de considerar sus características taxonómicas, peculiaridades fenotípicas o variaciones entre poblaciones, tomar en cuenta otras medidas de diversidad,

sobre todo dentro de la población, y para la cual los estudios con microsatélites nos aportan una gran información al respecto.

Bibliografía consultada

- Ali, S., Azfer, M.A., Bashamboo, A., Mathur, P.K., Malik, P.K., Mathur, V.B., Raha, A.K., and Ansari, S. 1999. Characterization of a species-specific repetitive DNA from a highly endangered wild animal, *Rhinoceros unicornis*, and assessment of genetic polymorphism by microsatellite associated sequence amplification (MASA). *Gene* **228**(1-2) 33-42.
- Anonymous. 1992. Recommendations of the FAO expert consultation. In: The management of global animal genetic resources (Hodges, J. ed.) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 1-24.
- Aranguren-Méndez, J., Jordana, J., Gómez M. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* **33** (4) 243-252.
- Barker, J.S.F., Bradley, D. G., Fries, R., Hill, W.G., Nei, M. and Wayne, R.K. 1993. An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Animal Production and Health Division, Rome.
- Bjørnstad, G. and Røed, K.H. 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horse assessed by microsatellite markers. *Anim. Genet.* **32** (2) 59-65.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J. Minch, E., Kidd, J. R., and Cavalli-Sforza, L. L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455-457.
- Cavalli-Sforza, L.L. and Edwards, W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J. Human. Genet.* **19**, 233-257.
- Cheng H. H. and Crittenden, L.B. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* **73**:539-546.
- Eding, H., Meuwissen, T. H. 2001. Marker-Based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *J. Anim. Breed. Genet.* **118** (3) 141-159.
- FAO 1995. World watch list for Domestic Animal Diversity. 2nd Ed. FAO, Rome.
- Goldstein, D.B., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L. and Feldman, M.W. 1995. An evaluation of genetic distance for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**, 463-471.
- González-Candelas, F. and Montolio A. 2000. Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. *J. Hered.* **91**, 134-141.
- Jordana, J. and Folch, P. 1998. The Catalanian donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed. *Arch. Zootec.* **47**, 403-409.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nagamine, Y., Higuchi, M. 2001. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *J. Anim. Breed. Genet.* **118** (3) 101-109.
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *Amer. Nat.* **106**, 283-292.

- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. *Ann. Hum. Genet.* **41**, 225-233.
- Nei, M., Tajima, F. and Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* **19**, 153-170.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schmoll, F., Horst P., and Schellander, K. 1999. Comparison of Multilocus DNA fingerprints and Microsatellites in an Estimate of Genetic Distance in Chicken. *J. Hered.* **90**(6) 656-659.
- Simons, D. L. 1984. Conservation of animal genetic resources. A review. *Livest. Prod. Sci.* **11**, 23-36.
- Rochambeau, H., Fournet-Hanocq, F. and Vu Tien Khang, J. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* **49**. 77-93.
- Takezaki, N. and Nei, M. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**, 389-399.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 395-420.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.