

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL CROMOSOMA Y EN LAS SEIS RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS PARA TRES MARCADORES MICROSATÉLITE

Ferrando, A., Casas, M. y Jordana, J.¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V; 08193-Bellaterra (Barcelona). Jordi.Jordana@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los marcadores nucleares autosómicos y los mitocondriales han sido los más ampliamente utilizados para estudios filogenéticos, filogeográficos y en todo lo referente a los procesos de domesticación de las especies domésticas. El análisis de la variabilidad del cromosoma Y también ha sido utilizado, aunque en menor medida, para trazar la historia de los linajes paternos en muchas de estas especies (ver por ejemplo, Kantanen et al., 2009; Meadows et al., 2006; Wallner et al., 2004). Sin embargo, existen pocos datos sobre la diversidad del cromosoma Y en el asno doméstico (*Equus asinus*). Wallner et al. (2004) identificaron seis loci microsatélite específicos de la región no recombinante del cromosoma Y (Eca.YH12, Eca.YA16, Eca.YP9, Eca.YM2, Eca.YE1, Eca.YJ10) en caballos domésticos (*Equus caballus*). No obstante, no detectaron ningún polimorfismo tras analizar 32 razas equinas. Estos autores amplificaron con éxito tres de esos marcadores (Eca.YE1, Eca.YM2 y Eca.P9) en otras especies equinas –incluida el asno–, detectando polimorfismos inter-específicos, así como algunos polimorfismos intra-específicos. En la especie que nos ocupa, el asno, hallaron la existencia de al menos dos haplotipos, por la presencia de dos alelos en el locus Eca.YM2.

Dado que ese estudio sólo incluía muestras de tres asnos, el objetivo del presente trabajo ha sido explorar la diversidad existente en los loci Eca.YE1, Eca.YM2 y Eca.YP9 en un número mayor de individuos, incluyendo machos de las seis razas asnales españolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de 75 machos de las siguientes razas asnales: Andaluza (N=4), Balear (N=10), Catalana (N=27), Asno de las Encartaciones (N=6), Majorera (N=18) y Zamorano-Leonesa (N=10). En los casos en los que se disponía de registros genealógicos de los machos muestreados, se escogieron aquéllos procedentes de diferentes familias paternas.

Se amplificaron los loci microsatélite, de tipo dinucleotídico, Eca.YE1, Eca.YM2 y Eca.YP9 (GenBank Acc. No. BV005725-7) de la parte no recombinante del cromosoma Y con los marcadores descritos por Wallner et al. (2004). Los loci Eca.YM2 y Eca.YP9 fueron amplificados en una misma reacción en cadena de la polimerasa (PCR-1) mientras que Eca.YE1 fue amplificado por separado (PCR-2). Las PCRs incluyeron 1x buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.125 mM de cada dNTP, 0.084-0.117 µM de cebadores, 0.3 U (PCR-1) o 0.75 U (PCR-2) de AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 60 ng de ADN, en un volumen final de 15 µl. Los cebadores incluyeron un marcaje con un fluorocromo (NED o 6-FAM). Los programas de los termocicladores, para ambas PCRs, empezaron con una desnaturalización de 10 minutos a 95°C. La PCR-1 continuó con 10 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos de hibridación a 62°C y descendiendo 1°C por ciclo, y 1 minuto a 72°C, seguidos de 25 ciclos adicionales de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C. En cambio, la PCR-2 continuó con 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 40 segundos a 59°C y 90 segundos a 72°C. Ambos ciclos de amplificación finalizaron con un paso a 72°C durante 30 minutos. Los productos de PCR amplificados fueron separados por electroforesis en un secuenciador automático ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems), incluyendo un marcador interno de tamaño de los fragmentos. El tamaño de los alelos fue analizado con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Todas las amplificaciones incluyeron DNA control de una hembra para verificar la posible presencia de fragmentos amplificados inespecíficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 75 machos analizados presentaron el mismo alelo para los loci Eca.YE1 (191 pb) y Eca.YP9 (196 pb). En cambio, se detectó un polimorfismo en el locus Eca.YM2, con dos

alelos posibles. Los dos alelos se diferenciaron en dos pares de bases (Figura 1), que se corresponden con una unidad repetitiva del microsatélite. Casi todos los machos presentaron el mismo haplotipo, caracterizado por la presencia del alelo de 110 pb en el locus Eca.YM2, excepto un individuo de la raza Asno de las Encartaciones que tenía el alelo de 112 pb (ver Tabla 1).

Wallner et al. (2004) también detectaron un solo polimorfismo en el locus Eca.YM2 entre los tres asnos de su estudio. Probablemente se trate de los dos mismos alelos detectados en los asnos españoles, aunque sería necesaria una muestra control para confirmarlo. Ling et al. (2010) lograron amplificar los seis loci microsatélite del cromosoma Y descritos por Wallner et al. (2004) en 30 machos de asno doméstico procedentes de China. Sin embargo, todos ellos presentaron el mismo haplotipo.

Es posible que la variabilidad del cromosoma Y de los asnos domésticos sea baja, como consecuencia de una pérdida de diversidad durante el proceso de domesticación. No obstante, tal y como sugieren Wallner et al. (2004) en los caballos, no se puede descartar que la baja variabilidad sea debida a un barrido selectivo. Cualquier presión selectiva en uno de los genes de la región no recombinante del cromosoma Y afecta a la variabilidad del resto de loci ligados a él. Será preciso analizar un mayor número de loci específicos de cromosoma Y así como de asnos domésticos en un rango geográfico más extenso para definir si esta baja variabilidad es generalizada, tanto a lo largo del cromosoma Y como en el conjunto de la especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kantanen, J., Edwards, C. J., Bradley, D. G., Viinalass, H., Thessler, S., Ivanova, Z., Kiselyova, T., Činkulov, M., Popov, R., Stojanović, S., Ammosov, I. & Vilki, J. 2009. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity* 103: 404-415
- Ling, Y., Ma, Y., Guan, W., Cheng, Y., Wang, Y., Han, J., Jin, D., Mang, K. & Mahmut, H. 2010. Identification of Y chromosome genetic variations in Chinese indigenous horse breeds. *J. Hered.* 101: 639-643
- Meadows, J. R. S., Hanotte, O., Drögemüller, C., Calvo, J., Godfrey, R., Coltman, D., Maddox, J. F., Marzanov, N., Kantanen, J. & Kijas, J. W. 2006. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. *Anim. Genet.* 37: 444-453
- Wallner, B., Piumi, F., Brem, G., Müller, M. & Achmann, R. 2004. Isolation of Y chromosome-specific microsatellites in the horse and cross-species amplification in the genus *Equus*. *J. Hered.* 95: 158-164.

Agradecimientos: Agradecemos el soporte recibido por parte del *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural (DAR)* de la Generalitat de Catalunya, para la realización de estos estudios.

Tabla 1. Haplotipos del cromosoma Y en las seis razas asnales españolas para tres marcadores microsatélite. N, número de machos.

Raza	N	Haplotipos (tamaño de los alelos en pares de bases)			Porcentaje
		Eca.YM2	Eca.YE1	Eca.YP9	
Andaluza	4	110	191	196	100%
Balear	10	110	191	196	100%
Catalana	27	110	191	196	100%
Asno de las Encartaciones	5	110	191	196	83,3%
Majorera	1	112	191	196	16,6%
Majorera	18	110	191	196	100%
Zamorano-Leonesa	10	110	191	196	100%
TOTAL	74	110	191	196	98,6%
	1	112	191	196	1,4%

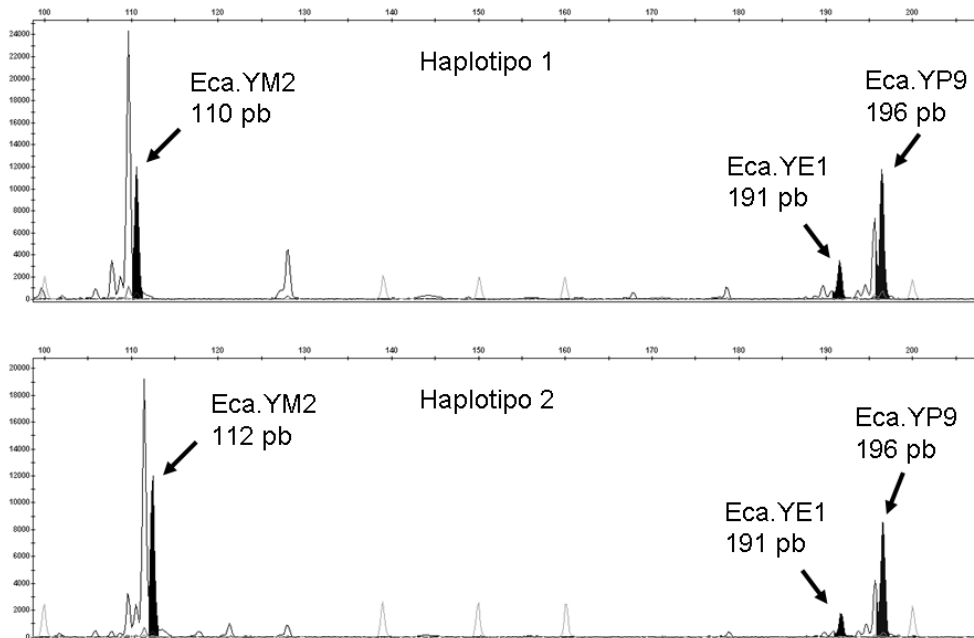


Figura 1. Análisis del tamaño de los alelos de los tres marcadores microsatélite en dos individuos. Se puede observar la presencia de dos haplotipos definidos por la existencia de un polimorfismo en el locus Eca.YM2.

ANALYSIS OF Y CHROMOSOME GENETIC VARIABILITY OF SIX SPANISH DONKEY BREEDS WITH THREE MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT: Y chromosome markers have been used in large studies about domestication in different species such as cattle, sheep and horses. However, there is little information about genetic variability of the Y chromosome of domestic donkey. In this study we analysed three microsatellite markers (Eca.YM2, Eca.YE1 and Eca.YP9) from the non-recombinant region of the Y chromosome of 75 males from six Spanish donkey breeds. We found a polymorphism at locus Eca.YM2, with the presence of two alleles. Thus, only two different haplotypes were detected among the three loci. All but one individual, a male from the “Asno de las Encartaciones” breed, shared the same haplotype.

Keywords: *Equus asinus*, STR.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL CROMOSOMA Y EN LAS SEIS RAZAS ASNALES ESPAÑOLAS PARA TRES MARCADORES MICROSATÉLITE

Ferrando, A., Casas, M. y Jordana, J.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V; 08193-Bellaterra (Barcelona). Jordi.Jordana@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los marcadores nucleares autosómicos y los mitocondriales han sido los más ampliamente utilizados para estudios sobre los procesos de domesticación. El análisis de la variabilidad del cromosoma Y también ha sido utilizado para trazar la historia de los linajes paternos en muchas especies domésticas (ver por ejemplo, Kantanen *et al.*, 2009; Meadows *et al.*, 2006; Wallner *et al.*, 2004). Sin embargo, existen pocos datos sobre la diversidad del cromosoma Y en el asno doméstico (*Equus asinus*). Wallner *et al.* (2004) identificaron y amplificaron tres marcadores específicos de la parte no recombinante del cromosoma Y (Eca.YE1, Eca.YM2 y Eca.P9) en el asno y hallaron la existencia de al menos dos haplotipos, por la presencia de dos alelos en el locus Eca.YM2. Dado que ese estudio sólo incluía muestras de tres asnos, el objetivo del presente trabajo ha sido explorar la diversidad existente de estos tres *loci* en machos de las seis razas asnales españolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de 75 garañones no emparentados de las seis razas asnales españolas: Andaluza (N=4), Balear (N=10), Catalana (N=27), Asno de las Encartaciones (N=6), Majorera (N=18) y Zamorano-Leonesa (N=10). Se amplificaron los *loci* Eca.YE1, Eca.YM2 y Eca.YP9 (Wallner *et al.* 2004). Todas las amplificaciones incluyeron DNA control de una hembra. Los productos de PCR amplificados fueron separados por electroforesis en un secuenciador automático ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos fue analizado con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó un único polimorfismo en el locus Eca-YM2 (110 y 112 pb, Figura 1) en un solo individuo (Tabla 1). Wallner *et al.* (2004) también detectaron un único polimorfismo en el *locus* Eca.YM2. Ling *et al.* (2010) lograron amplificar seis *loci* microsatélite del cromosoma Y descritos por Wallner *et al.* (2004) en 30 machos de asno doméstico de China sin encontrar ninguna variabilidad.

La escasa variabilidad del cromosoma Y de los asnos domésticos podría ser consecuencia de una pérdida de diversidad durante el proceso de domesticación o de un barrido selectivo.

Raza	N	Haplotipos (alelos en pares de bases)			Porcentaje
		Eca.YM2	Eca.YE1	Eca.YP9	
Andaluza	4	110	191	196	100%
Balear	10	110	191	196	100%
Catalana	27	110	191	196	100%
Asno de las Encartaciones	5	110	191	196	83,3%
Majorera	1	112	191	196	16,6%
Zamorano-Leonesa	18	110	191	196	100%
TOTAL	74	110	191	196	98,6%
	1	112	191	196	1,4%

Tabla 1. Haplotipos del cromosoma Y en las seis razas asnales españolas para tres marcadores microsatélite. N, número de machos.

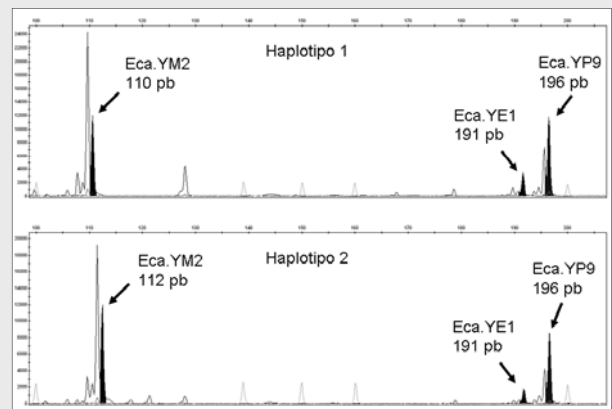


Figura 1. Análisis del tamaño de los alelos de los tres marcadores microsatélite en dos individuos. Se puede observar la presencia de dos haplotipos definidos por la existencia de un polimorfismo en el locus Eca.YM2.

CONCLUSIONES

Será preciso analizar un mayor número de *loci* específicos del cromosoma Y así como un mayor número de razas domésticas para corroborar si esta baja variabilidad es generalizada a lo largo del cromosoma Y, y en el conjunto de la especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kantanen, J., Edwards, C. J., Bradley, D. G., *et al.* 2009. *Heredity* 103: 404-415
- Ling, Y., Ma, Y., Guan, W., *et al.* 2010. *J. Hered.* 101: 639-643
- Meadows, J. R. S., Hanotte, O., Drögemüller, C., *et al.* 2006. *Anim. Genet.* 37: 444-453
- Wallner, B., Piumi, F., Brem, G., *et al.* 2004. *J. Hered.* 95: 158-164.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el soporte recibido por parte del *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural (DAR)* de la Generalitat de Catalunya, para la realización de estos estudios.