

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA RAZA BOVINA MALLORQUINA PARA PROPÓSITOS DE CONSERVACIÓN

Genetic Diversity Measures of Local Cattle Majorcan Breed for Conservation Purposes

José Aranguren-Méndez^{1,2}, Jordi Jordana¹, Rosa Avellanet¹ y Miquel Torrens³

¹Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Dpto. de Ciencia Animal y de los Alimentos. 08193 Bellaterra. Barcelona-España. Mail: Jordi.Jordana@uab.es ²Universidad del Zulia. Facultad de Veterinaria. Dpto. Prod. e Ind. Animal, Aptdo. 4005-A Maracaibo-Venezuela. E-mail: Atilio.Aranguren@uab.es; aarangur@iamnet.com ³Veterinario Ejercicio libre. c/. Gabriel Miró, 11. 07011 Palma de Mallorca. España

RESUMEN

De acuerdo a los últimos informes de la FAO, los recursos genéticos disponibles a nivel mundial se encuentran en un dramático estado de descenso. Cada mes se pierden aproximadamente unas seis razas domésticas, con la consecuente pérdida de genes para adaptación a ciertos ambientes únicos. En este trabajo se ha estudiado la variabilidad genética de la raza bovina Mallorquina a través del análisis de 15 marcadores de ADN de tipo microsatélite. Para ello se muestrearon 26 individuos, 12 de ellos de la variedad castaña clara y los 14 restantes de la castaña oscura. Los niveles de variabilidad genética fueron muy similares para las dos variedades, y comparables a los obtenidos para otras razas, tanto españolas como europeas. El valor de diferenciación genética (F_{ST}) entre las dos variedades fue bajo (0,3%), indicándonos la existencia de un elevado flujo de genes entre los dos grupos, lo que conllevaría a una gran similitud genética entre ellas. Por otra parte, los valores de F_{IS} y F_{IT} obtenidos fueron del 1,9% y 1,6 %, estadísticamente no diferentes de cero, mostrando por tanto dicha población equilibrio genético de Hardy Weinberg. La probabilidad de exclusión (PE) fue del 99,9%, lo que permite utilizar estos sistemas de marcadores como una buena herramienta para la identificación individual y la verificación de paternidades. El dendrograma obtenido, representación diagramática de las relaciones genéticas existentes entre las razas, muestra una clara separación entre las poblaciones bovinas españolas peninsulares y las dos variedades de mallorquinas (Isla de Mallorca). Para finalizar, y a modo de resumen o conclusión, indicar que las dos variedades de la raza (castaña clara y castaña oscura) representan una misma entidad genética, por lo que en

futuros programas de conservación ambas variedades deberían ser tomadas en cuenta.

Palabras clave: Bovino, recursos genéticos, extinción, microsatélite, variabilidad genética.

ABSTRACT

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), animal genetic resources available throughout the world are in dramatic state of decline. This results in the disappearance of substantial numbers of local animal populations, and the consequent loss of their ability to adapt genetically to their local environments. This study analyzes the genetic variability and structure of a limited rare population, a local beef cattle breed from Majorca Isle (Spain): the *Mallorquina* breed, based on the analysis of 15 microsatellites. A total of 26 individuals, grouped according to coat color, were sampled: 12 from the red *Mallorquina* variety and 14 from the black *Mallorquina* variety. The genetic relationships between these subpopulations and five other Spanish cattle breeds were analyzed and compared. The levels of genetic variability were very similar for the two varieties, and comparable to those obtained in other Spanish and Europeans breeds. The value of genetic differentiation (F_{ST}) between the two varieties was low (0.3%), indicating the existence of high gene flow between the two groups, and great genetic similarity between them. On the other hand, the values obtained for F_{IS} and F_{IT} were 1.9% and 1.6%, with no statistical difference of zero, showing in this population, Hardy Weinberg equilibrium. The probability of exclusion (PE) was 99.9%, which allows us to utilize these markers as a good tool for individual identification and parentage testing. Genetic distance and the dendrogram results obtained show a clear separation between the peninsular Spanish bovine populations and the two Majorcan

varieties (Majorca Isle). Lastly, and as a summary or conclusion, it is important to indicate that the two varieties of the Majorcan breed studied represent the same genetic entity, and so in futures programs of conservation both varieties should be kept in mind.

Key words: Bovine, genetic resources, extinction, micro-satellite, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

La raza bovina mallorquina es un germoplasma local de aptitud cárnica, localizada en la isla de Mallorca (España), al noreste de la Península Ibérica en el Mar Mediterráneo (FIG. 1). Aunque esta considerada como única raza, existen dos variedades claramente diferenciadas dentro de la misma, siendo su principal distintivo el color de la capa; existiendo la variedad de capa castaña clara o rubia y la variedad de capa castaña oscura, esta última de más reciente origen. [28].

Morfológicamente es una raza clasificada como subeumétrica, de perfil convexo o subconvexo y de proporciones longilineas. Afectada por un marcado dimorfismo sexual, llegando a pesar la hembra entre 300 a 350 kg y alrededor de 450 kg los machos [27]. A pesar de su reducido peso, en comparación a otras razas especializadas, presenta una característica que la hace especial, y es su gran rusticidad y adaptación al medio ambiente de la isla, constituyéndose como un elemento indispensable para el control biológico de la vegetación ambiental natural y así poder evitar posibles incendios forestales, ya que en la isla no se cuenta con herbívoros silvestres de mediana o gran talla que pudiesen realizar este control de forma natural.

La raza Mallorquina, según baremo de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), se encuentra catalogada en el estatus de raza crítica en grave peligro de extinción [1], dado que actualmente existen poco más de 90 hembras reproductoras y unos 15 machos (<http://www.fao.org/dad-is>). Sin ningún tipo de acción y con este tamaño efectivo de población tan reducido, sería casi imposible prevenir las continuas pérdidas genéticas en futuras generaciones [6].

Según algunos autores [27, 28] el origen de esta raza podría ser de orden difilético. En primer lugar se cita un ancestro a partir del Tronco Turdetano (bovino rojo convexo) y otro segundo, de una influencia más contemporánea, que se correspondería con ancestros del Tronco Castaño ultraconvexo africano, atribuyéndose a este último el ser responsable de un mayor peso genético en la formación de los bovinos mallorquines actuales.

En la conservación de los recursos genéticos, el principal objetivo consiste en preservar la variabilidad dentro de las poblaciones, bajo la hipótesis de existencia de correlación en-



FIGURA 1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ISLA DE MALLORCA DENTRO DEL CONTINENTE EUROPEO.

tre la variación genética y la viabilidad de la población. Por ello, la necesidad de cuantificar dicha diversidad (variabilidad), para así poder realizar una mejor y más acertada política de conservación [36]. Consecuentemente, una de las principales etapas de un programa de conservación, consiste en la evaluación de la diversidad genética y su distribución en la población [2, 12].

En los últimos años, la FAO, ha propuesto para el manejo de los recursos genéticos, metodologías moleculares para el análisis de los *loci* microsatélites [4]. Los microsatélites son un tipo de marcador de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten aleatoriamente en el genoma, hasta unas 60 veces, y están considerados como una de las más poderosas herramientas para estudios genético-poblacionales [5].

Los microsatélites, debido a su propia naturaleza, presentan ciertas características que los hacen ser marcadores de elección para estudios de genética de poblaciones. Estas son: primero, se encuentran ampliamente distribuidos por todo el genoma; segundo, exhiben un alto grado de polimorfismo y tercero, son fácilmente automatizables, con la posibilidad de amplificación múltiple de hasta más de 5 *loci* en una simple reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction-Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de múltiples cargas de hasta más de 15 *loci*, por línea de análisis, en algunos sistemas optimizados [5]. Adicionalmente, y dado que se asumen como neutros a la selección, la diversidad genética observada es consecuencia únicamente de la deriva genética y la mutación.

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 [21, 23]. Al perderse las razas, se pierden los genes que poseen, y el mayor problema 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 ge-

nética, a la productividad en un ambiente determinado, o así son portadoras de algunos genes mayores interesantes y valiosos en los momentos actuales o en el futuro.

Uno de los principales problemas que afectan a estas poblaciones minoritarias, son los apareamientos entre individuos emparentados, que se traducen genéticamente en un incremento de la consanguinidad (homocigosis) con la consiguiente depresión consanguínea, es decir 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 [17].

Los principales objetivos de este artículo, son estudiar la variabilidad genética en la raza Mallorquina a través del análisis de un conjunto de microsatélites, y evaluar el grado de diferenciación genética existente entre estas dos variedades y otras razas de la península Española, todo ello enmarcado como punto de inicio para la futura puesta en marcha de un programa de conservación genética de esta raza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 26 vacas mallorquinas, pertenecientes a un rebaño producto de un programa de recuperación de la raza que se inició en 1982 por parte del PRAM (Patronato de Razas Autóctonas de Mallorca), y que contó en sus inicios con la reagrupación del poco ganado existente en ese momento en la Isla, procedente de diferentes explotaciones ganaderas. Actualmente dicho rebaño, que se corresponde con el mayor núcleo de la raza, se encuentra pastoreando en el Parque Natural de "S'Albufera" de Mallorca, propiedad del Gobierno Balear. Del total de individuos muestreados, 12 correspondían a la variedad castaña clara y los otros 14 a la variedad castaña oscura. El ADN se extrajo a partir de glóbulos blancos, de acuerdo al método estándar que incluye el lisado celular y la extracción con la mezcla de fenol:cloroformo:isoamiloalcohol, en una proporción 25:24:1 [3].

Marcadores microsatélites

Los 15 marcadores microsatélites utilizados fueron: CSSM66, ETH10, ETH152, ETH225, ETH3, HEL1, HEL5, HEL9, ILST5, INRA23, INRA35, INRA37, INRA5, INRA63 y TGLA44. Las secuencias de los cebadores ("primers") y las condiciones de las reacciones de PCR pueden apreciarse en la TABLA I. Todos los *loci*, excepto el TGLA44, están incluidos en la "European Concerted Action AIRE2066 list".

Condiciones de la PCR múltiplex

Los 15 microsatélites fueron amplificados en tres múltiplex, usando cebadores marcados fluorescentemente. La primera múltiplex incluyó a los microsatélites CSSM66, ETH225,

HEL5, INRA23, INRA35 e INRA5; la segunda a ETH10, ETH3, HEL1, ILST5, INRA37 y TGLA44; mientras que, la tercera, fue conformada por los microsatélites ETH152, HEL9 e INRA63.

Las PCR múltiplex fueron llevadas a cabo en una reacción final de 15 l, conteniendo 30 ng de ADN (genómico), 200 M de dNTP (nucleótidos), 0,5 l de la enzima polimerasa (Amplitaq Gold; 5 U/l), 1,5 mM de $MgCl_2$ y 0,20 M de cada uno de los cebadores. Para ello se utilizó un termociclador (PE 9700), al cual se le proporcionó un programa térmico consistente en una desnaturalización inicial y activación de la enzima polimerasa a 95°C durante 12 minutos, seguido de 29 ciclos, conformados a 93°C por 1 min., 55°C por 1 min. y 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Los productos amplificados de PCR fueron analizados mediante electroforesis capilar, con un secuenciador automático de ADN Applied Biosystems 3100 (ABI 3100), e interpretados posteriormente mediante el software de análisis GENESCAN, utilizando para ello un marcador estándar de tamaños con fluorescencia TAMRA 350.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas (disponibles por parte de los autores, previa solicitud) y los valores medios de heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O), para cada uno de los *loci* polimórficos, fueron obtenidas usando el programa BIOSYS-2 [32]. El test de frecuencias genotípicas para la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), fue calculado utilizando un test exacto mediante el programa GENEPOP 3.1 [29], usando el método de la Cadena de Markov.

Así mismo, se calculó el índice de contenido polimórfico (PIC) usando la metodología de Botstein y col. [7] y la probabilidad de exclusión (PE) de cada uno de los marcadores y la combinada para el conjunto de los *loci* analizados, según las recomendaciones de Jamieson [15]. La estructura genético-poblacional se analizó mediante los F-estadísticos (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} ; [35]), implementados en el programa FSTAT [13]. Para el estudio de la relaciones genéticas entre las subpoblaciones, y la posterior construcción del dendrograma, se utilizó la distancia D_A de Nei [25] y el algoritmo NJ -neighbour-joining method- [30], usando para ello el programa DISPAN [26]. Como referencia y entronque para el diseño de las relaciones filogenéticas de la raza Mallorquina, se utilizó la información de las frecuencias génicas de otras razas españolas (Avileña, Bruna dels Pirineus, Morucha, Pirenaica y Retinta) procedentes del trabajo realizado por Cañón y col. [9].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los marcadores amplificaron correctamente y fueron polimórficos en la raza Mallorquina. El número de alelos detectados por *locus* osciló de 2, para los microsatélites ILST5 e INRA5, a 9 en el microsatélite EHT3 (TABLA II), sin diferen-

TABLA I
SECUENCIAS DE LOS CEBADORES, LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA¹ Y REFERENCIA
DE LOS 15 MICROSATÉLITES UTILIZADOS.

Locus	Secuencias (5' – 3')	1Crom.	Referencia bibliográfica
CSSM66	F: ACA CAA ATC CTT TCT GCC AGC TGA R: AAT TTA ATG CAC TGA GGA GCT TGG	14	[31]
ETH 10	F: GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA R: CCTCCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	5	[31]
ETH 152	F: TAC TCG TAG GGC AGG CTG CCT G R: GAG ACC TCA GGG TTG GTG ATC AG	5	[10]
ETH 225	F: GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T R: ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	9	[10]
ETH 3	F: GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G R: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G	19	[10]
HEL 1	F: CAA CAG CTA TTT AAC AAG GA R: AGG CTA CAG TCC ATG GGA TT	15	[20]
HEL 5	F: GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA R: AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC	21	[20]
HEL 9	F: CCC ATT CAG TCT TCA GAG GT R: CAC ATC CAT GTT CTC ACC AC	8	[20]
ILSTS 5	F: GGA AGC AAT GAA ATC TAT AGC C R: TGT TCT CTG AGT TTG TAA GC	10	[8]
INRA 23	F: GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC R: TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	3	[33]
INRA 35	F: ATC CTT TGC AGC CTC CAC ATT G R: TTG TGC TTT ATG ACA CTA TCC G	16	[33]
INRA 37	F: GAT CCT GCT TAT ATT TAA CCA C R: AAA ATT CCA TGG AGA GAG AAA C	4	[33]
INRA 5	F: CAA TCT GCA TGA AGT ATA AAT AT R: CTT CAG GCA TAC CCT ACA CC	12	[34]
INRA 63	F: ATT TGC ACA AGC TAA ATC TAA CC R: AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G	18	[33]
TGLA 44	F: AAC TGT ATA TTG AGA GCC TAC CAT G R: CAC ACC TTA GCG ACT AAA CCA CCA	2	[11]

cias significativas entre las dos variedades de la raza (datos no mostrados). El promedio de diversidad genética (H_E), sobre todos los *loci*, fue de 0,618 0,033, mientras que para cada *locus* individualmente osciló entre 0,278 en el microsatélite INRA5 y 0,758 en el microsatélite ETH3. El PIC y la PE por *locus* se muestran en la TABLA II, siendo la PE combinada del 99,9%, confirmando que el conjunto de marcadores genéticos resulta eficaz, tanto para la identificación individual como para la verificación de paternidades.

Con respecto al PIC, la mayoría de los *loci* pueden ser considerados como polimórficos, con excepción de los microsatélites ILST5, INRA35 e INRA5, en los cuales su valor estuvo bastante por debajo del límite <0,5. Obviando estos casos, el rango estimado de PIC osciló entre 0,485 (INRA63) y 0,734 (ETH3); esta elevada diversidad génica está

en concordancia con otros trabajos previamente reportados en bovinos [9, 19, 22, 24].

Así mismo, los demás estadísticos de variabilidad genética (heterocigosidades observadas y esperadas, así como el número de alelos por *locus*) fueron similares para las dos variedades de la raza Mallorquina, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($P>0,05$), indicando que no existen diferencias a este nivel entre ambas. Estos niveles de variabilidad genética fueron comparables, asimismo, a los obtenidos en otras razas bovinas europeas [9, 19].

El análisis de la identificación de alelos reveló poca o nula diferencia entre las dos variedades de la raza mallorquina (FIG. 2). Aunque se presentaron algunos alelos en una sola de las dos variedades, éstos siempre lo hicieron a frecuencias bajas, indicándonos, posiblemente, que este hecho sea producto,

TABLA II
DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA RAZA BOVINA MALLORQUINA

Locus	Nº Alelos	Rango	HE	HO	PIC	PE
CSSM66	5	181-199	0,686	0,669	0,625	0,422
ETH225	5	139-151	0,661	0,648	0,598	0,389
ETH3	9	97-127	0,758	0,738	0,734	0,571
HEL5	5	149-169	0,670	0,692	0,631	0,458
HEL9	5	151-163	0,667	0,655	0,604	0,402
ILST5	2	184-186	0,464	0,464	0,356	0,178
INRA23	5	197-213	0,538	0,527	0,598	0,390
INRA35	3	102-110	0,440	0,426	0,376	0,204
INRA37	4	124-136	0,538	0,530	0,493	0,308
INRA5	2	139-143	0,278	0,263	0,245	0,123
INRA63	3	175-183	0,575	0,567	0,485	0,284
TGLA44	4	164-172	0,643	0,639	0,578	0,372
Media	4,4 ± 0,4		0,618 ± 0,033	0,608 ± 0,046		0,999

único y exclusivamente, del reducido número de individuos disponibles para su análisis.

La TABLA III muestra la estructura poblacional de la raza Mallorquina a través de los F-estadísticos, computados sobre las dos variedades y todos los *loci*. El valor promedio de diferenciación genética (F_{ST}), nos indica que no existen diferencias entre las dos variedades, ya que tan sólo un 0,3% del total de la varianza genética puede ser atribuible a diferencias entre las variedades (siendo además este valor, no estadísticamente diferente de cero; $P>0,05$), correspondiendo, por tanto, el 99,7% restante a diferencias entre los individuos. Esto nos confirma, que muy posiblemente sean tan sólo uno o pocos genes, entre ellos posiblemente los que codifican para el color de la capa u otras características, los máximos responsables de las diferencias observadas entre estas dos variedades, ya que el resto del genoma parece ser bastante similar entre ellas. Como promedio, cada una de las dos variedades presentó un 1,9% de déficit de heterocigotos, siendo el déficit promedio de la población global del 1,6%, estadísticamente no significativo en ambos casos ($P>0,05$).

El bajo valor de F_{ST} (0,3%) nos indica que existe un elevado flujo génico entre las dos subpoblaciones, habiendo jugado la migración génica (intercambio de reproductores) un importante papel de ecualizador genético entre las dos variedades. Resultados e interpretaciones similares de flujo génico intrarracial, en poblaciones bovinas, fueron obtenidos en la raza Bruna dels Pirineus [16] y en la raza Alberes [18].

Una posible explicación, a que esta población de reducido tamaño censal se halle en equilibrio genético de Hardy-Weinberg, podría deberse al hecho de que dicho rebaño (Parque Natural de S'Albufera) se ha ido constituyendo, desde 1982 hasta la actualidad, por parte del PRAM y el Gobierno Balear, a partir de la reagrupación de individuos, coincidentes con el

TABLA III
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL
MEDIANTE LOS F-ESTADÍSTICOS

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
CSSM66	-0,173	-0,153	0,017
ETH10	0,003	-0,018	0,020
ETH152	0,129	0,145	0,018
ETH225	-0,145	-0,135	0,009
ETH3	0,361***	0,360***	0,002
HEL1	-0,242	-0,252	0,008
HEL5	-0,014	-0,037	0,023
HEL9	-0,322	-0,310	0,009
ILST5	-0,206	-0,244	0,031
INRA23	0,025	0,034	0,009
INRA35	0,327**	0,331**	0,005
INRA37	0,096	0,094	0,002
INRA5	-0,233	-0,153	0,065
INRA63	0,289	0,272	0,023
TGLA44	0,255*	0,227*	0,037
Media	0,019 0,059	0,016 0,058	0,003 0,058

prototipo racial, de diferentes propietarios de diversos lugares de la Isla [27, 28]. Posiblemente, la poca relación de parentesco existente entre ellos, y la más probable aleatorización de los apareamientos, ha comportado que esta reducida población de vacas mallorquinas muestre un nulo nivel de consanguinidad, indicado por la ausencia de déficit de heterocigotos que hemos obtenido en el presente estudio con los 15 marcadores analizados. El elevado déficit de heterocigotos que

FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA LOS 15 MICROSATÉLITES EN LAS DOS VARIEDADES DE LA RAZA BOVINA MALLORQUINA

muestran los *loci* ETH3 e INRA35 en las dos subpoblaciones (TABLA IV), se debe muy probablemente a la presencia de alelos nulos no detectables en estos marcadores, tal y como ha sido reportado en otros trabajos [14, 19].

Confirmar esta posibilidad es difícil, ya que se considera un alelo como nulo cuando no puede ser amplificado, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del cebador. Su determinación sería posible si se presentara en homocigosis, ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese *locus*. Sin embargo, la existencia de dichos alelos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable, como sería nuestro caso.

La TABLA V muestra los valores de distancia genética entre las dos variedades de la raza Mallorquina y otras cinco razas bovinas españolas incorporadas en el estudio. El rango de distancias osciló entre 0,048 (ambas variedades de Mallorquina) y 0,324 (Retinta y Mallorquina var. clara). Las dos variedades de la raza Mallorquina muestran valores superiores a 0,25 con todas las razas peninsulares, siendo el valor máximo entre estas últimas no superior a 0,13. Estos resultados muestran, a grandes rasgos, la separación de las razas en dos grandes grupos: las poblaciones peninsulares y la población isleña.

El dendrograma obtenido a partir de la distancia D_A y el algoritmo NJ se observa en la FIG. 3, y en él se muestran las relaciones existentes entre las dos variedades de la raza Mallorquina y las otras cinco razas de la Península Ibérica (datos obtenidos a partir de Cañón y col.[9]). Las razas peninsulares forman un grupo extremadamente consistente (100% confianza) y perfectamente diferenciado del grupo o cluster que conforman las dos variedades de la raza Mallorquina.

A la vista de los resultados se darían dos posibles interpretaciones: la primera de orden filogenético, que indicaría el gran aporte genético de origen africano de la raza Mallorquina a partir de ancestros del Tronco Castaño ultraconvexo, origen que no tiene ninguna de las otras cinco razas analizadas. El dendrograma mostraría claramente el diferente origen de las razas peninsulares y de la raza isleña Mallorquina.

Sin embargo, cabe destacar otra posible interpretación. Sabemos que, a nivel taxonómico de raza, se hace extremadamente difícil realizar aseveraciones filogenéticas, debido fundamentalmente al poco tiempo que ha transcurrido en la evolución independiente de estas poblaciones. Por tanto, la disposición obtenida de las diferentes razas en el árbol podría llevarnos a malinterpretaciones evolutivas, ya que, y tal como se ha comentado en la introducción, parece ser que también existió un aporte genético inicial del Tronco Turdetano (bovino rojo convexo), con representantes en este estudio como las razas Pirenaica, Bruna dels Pirineus o la Retinta. Filogenéticamente, la raza Mallorquina podría estar relacionada con este tronco ancestral, y sin embargo el dendrograma obtenido nos estaría indicando lo contrario.

TABLA IV
ESTIMACIONES DE CONSANGUINIDAD (FIS) EN LAS DOS
VARIEDADES DE LA RAZA MALLORQUINA

<i>Locus</i>	Castaña Clara	Castaña Oscura
CSSM66	-0,287	-0,070
ETH10	-0,140	0,137
ETH152	0,238*	0,021
ETH225	-0,165	-0,130
ETH3	0,198*	0,395***
HEL1	-0,089	-0,222
HEL5	-0,301	0,221*
HEL9	-0,274	-0,368
ILST5	0,154	-0,529
INRA23	0,078	-0,016
INRA35	0,283**	0,350***
INRA37	-0,149	0,274*
INRA5	-0,048	-0,247
INRA63	0,313***	0,268*
TGLA44	0,389***	0,137
Media	0,003 0,066	0,036 0,067

*P<0,05 **P <0,01 ***P <0,001

No podemos desechar esta posibilidad, ya que al fin y al cabo, con el estudio genético de los marcadores microsatélites utilizados estamos analizando las similitudes o divergencias genéticas existentes entre poblaciones en la actualidad, y en el caso de la raza Mallorquina podría haber actuado de forma muy importante la deriva genética. Ésta, a través de fenómenos de "cuellos de botella" e incluso de "efectos fundadores" (no debemos olvidar que se empezó a recuperar la raza a partir de muy pocos individuos [28]), habría actuado sobre las frecuencias génicas, provocando la gran disimilitud actual de las mismas que existe entre la raza Mallorquina y las peninsulares. Esta gran diferenciación entre ambos grupos (100% de replicaciones bootstrap) se habría ido incrementando a lo largo de los años, debido a la ausencia de migraciones génicas (aislamiento reproductivo o ausencia de intercambio de reproductores entre la Isla y la Península). Estudios adicionales que incluyeran un mayor número de razas (a ser posible de diferentes troncos), así como el análisis del polimorfismo del ADN mitocondrial, podrían ser de ayuda para clarificar este punto.

CONCLUSIONES

Las dos variedades de la raza (castaña clara y castaña oscura) representan una misma entidad genética, por lo que para futuros programas de conservación, ambas variedades

TABLA V
DISTANCIA GENÉTICA (D_A) ENTRE CINCO RAZAS BOVINAS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA Y LAS DOS VARIEDADES DE LA RAZA MALLORQUINA

Razas	Avileña	Bruna	Morucha	Pirenaica	Retinta	C. Clara
Bruna	0,111					
Morucha	0,108	0,086				
Pirenaica	0,118	0,088	0,121			
Retinta	0,087	0,106	0,107	0,094		
C. Clara	0,321	0,299	0,285	0,276	0,324	
C. Oscura	0,307	0,256	0,282	0,274	0,290	0,048

Máxima distancia en negrita; mínima distancia en *italica*.

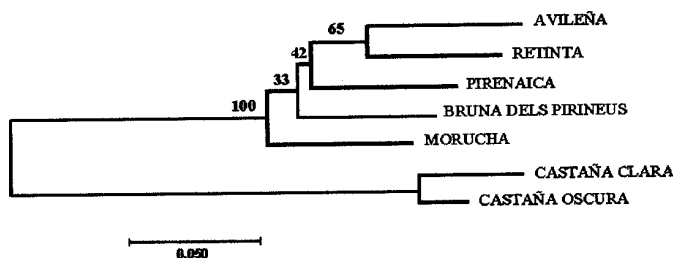


FIGURA 3. DENDROGRAMA CON D_A Y NJ DE LAS DOS VARIEDADES DE LA RAZA MALLORQUINA Y SU RELACIÓN CON OTRAS RAZAS BOVINAS ESPAÑOLAS DE LA PENÍNSULA (LOS VALORES DE LAS BIFURCACIONES REPRESENTAN LOS PORCENTAJES DE REPLICACIONES BOOTSTRAP).

deberían ser tomadas en cuenta. Los marcadores microsatélites son una herramienta de gran utilidad para los estudios de variabilidad genética en poblaciones de animales domésticos, y el estudio de los mismos puede contribuir de forma muy eficaz a la puesta en marcha y a la futura gestión de los programas de conservación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANONYMOUS. Recommendations of the FAO expert consultation, In: Hodges, J. (Ed.), **The management of global animal genetics resources**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 1-24 p. 1992.
- [2] ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; GÓMEZ, M. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. **Genetics, Selection and Evolution**. 33: 433-442. 2001.
- [3] 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.
- [4] BARKER, J.S.F. Conservation of livestock diversity. **Animal Genetic Resources Information**. 25: 33-43. 1999.
- [5] BEAUMONT, M.A.; BRUFORD, M.W. Microsatellite in conservation genetics. In: Goldstein, D.; Schöterer, C. (Eds.). **Microsatellite evolution and applications**. Oxford University Press, New York, 165-182 p. 1999.
- [6] BODÓ, I. The minimum number of preserved populations. In: Hodges, J. (Ed.), **The management of global animal genetics resources**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 91-105 p. 1992.
- [7] BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. 32: 314-331. 1980.
- [8] BREZINSKY, L.; KEMP, S.J.; WOMACK, J.; TEALE, A.J. A panel of bovine microsatellite genetic markers, In: **Proceedings of the XXII Conference on Animal Genetics**. Interlaken, Switzerland, International Society for Animal Genetics. 1992.
- [9] CAÑON, J.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I.; CARLEOS, C.; CARRETERO, Y.; DUNNER, S.; FERRAN, N.; GARCIA, D.; JORDANA, J.; LALOË, D.; PEREIRA, A.; SÁNCHEZ, A.; MOAZAMI-GOUDARZI, K. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. **Genetics, Selection and Evolution**. 33: 311-332. 2001.
- [10] FRIES, R.; EGGEN, A. WOMACK, J.E. The bovine genome map. **Mammalian Genome**. 4: 405-428. 1993.
- [11] GEORGES, M.; MASSEY, J. Polymorphic DNA markers in bovidae. **World Intellectual Property Org Geneva**. Wo. Publi. No. 92/1302. 1992.
- [12] GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; MONTOLÍO, A. Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. **Journal of Heredity**. 91: 134-141. 2000.

- [13] GOUDET, J. **FSTAT Ver. 2.9.1. Computer package for PCs**. Institute of Ecology, Biology building, UNIL, CH-1015 Lausanne, Switzerland. 2000.
- [14] PETERSEN, A., BENDIXEN, C. Null-alleles in the standard set of *loci* for cattle parentage control. **Congress ISAG. Animal Genomics: Synthesis of past, present and future directions**. July Atlanta, USA. 22-26/07. pp. 89. 2000.
- [15] JAMIESON, A. The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. **Animal Genetics**. 25: 37-44. 1994.
- [16] JORDANA, J.; PIEDRAFITA, J.. The "Bruna dels Pirineus" (Pyrenean brown breed): a genetic study of a rare cattle breed in Catalonia (Spain). **Biochemical Systematics and Ecology**. 24: 485-498. 1996
- [17] JORDANA, J.; FOLCH, P.; ARANGUREN, J.A. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. 118:57-63. 2001.
- [18] JORDANA, J.; PIEDRAFITA, J.; CARRE, X. ; MARTELL, A. Conservation genetics of an endangered Catalanian cattle breed ("Alberes"). **Genetics and Molecular Biology**. 22: 387-394. 1999
- [19] KANTANEN, J.; OLSAKER, I.; HOLM, L.; LIEN, S. VILKKI, J.; BRUSGAARD, K.; EYTHORSDDOTTIR, E.; DANELL, B.; ADALSTEINSSON. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. **Journal of Heredity**. 6: 446-457. 2000.
- [20] KAUKINEN, J.; VARVIO, S.L. Eighth polymorphic bovine microsatellites. **Animal Genetics**. 24: 148. 1993.
- [21] LAND, R.B. Genetic resources requirements under favourable production marketing systems: priorities and organisation. **3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. Lincoln, USA. Univ. of Nebraska. Vol XII 486-491 p. 1986.
- [22] MACHUGH, D.E., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellites markers **Animal Genetics**. 29: 333-340. 1998.
- [23] MAIJALA, K.; CHEREKAEV, A.V.; DEVILLARD, J.M.; REKLEWSKI, Z.; ROGNONI, G.; SIMON, D.L.; STEANE, D.E. Conservation of animal genetic resources in Europe. Final report of an E.A.A.P. working party. **Livestock Production Science**. 11: 3-22. 1984.
- [24] MOAZAMI-GOUDARZI, K., LALOË, D., FURET, J.P., GROSCLAUDE, F. Analysis of genetic relationship between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. **Animal Genetics**. 28, 338-345. 1997.
- [25] NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, T. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**. 19: 153-170. 1983.
- [26] OTA, T. **DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis**, Pennsylvania State University, University Park, PA. 1993.
- [27] PAYERAS, L.; FALCONER, J. **Races autòctones de les Illes Balears**. Govern Balear. Palma de Mallorca, España. 445 pp. 1998.
- [28] PUIGSERVER, G.; LLITERES, B.; BARCELÓ, T. Criterios a seguir en la selección de la raza Bovina Mallorquina con relación a su filogénesis. **Archivos de Zootecnia**. 49: 63-69. 2000.
- [29] RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 3.1): Population genetics software for exact test and ecumenisms. **Journal of Heredity**. 86: 248-249. 1995.
- [30] SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 4: 406-425. 1987.
- [31] STEFFEN, P.; EGGEN, A.; DIETZ, A.B.; WOMACK, J.E.; STRANZINGER, G.; FRIES, R. Isolation and mapping of polymorphic microsatellite in cattle. **Animal Genetics**. 24: 121-124. 1993.
- [32] SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **BIOSYS-2: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systematics**. (release 2.0). University of Illinois. Urbana. Champaign. 1999.
- [33] VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LÉPINGLE, A.; VELMALA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S.L.; MARTIN, P.; LEVÉZIEL, H.; GUERIN, G. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. **Mammalian Genome**. 5: 288-297. 1994.
- [34] VAIMAN, D.; OSTA, R.; MERCIER, D.; GRAS, C.; LEVEZIEL, H. Characterization of five new bovine dinucleotide repeats. **Animal Genetics**. 23: 537-541. 1992.
- [35] WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. 38: 1358-1370. 1984.
- [36] WEITZMAN, M.L. On diversity. **The Quarterly Journal of Economics**. 107: 363-405. 1992.