

## Análisis de la variabilidad y relaciones filogenéticas de las razas equinas autóctonas españolas de aptitud cárnica a partir del ADN mitocondrial

P.J. Azor\*, M.D. Gómez\*, F. Romero\*, J. Jordana\*\*, M.E. Alonso\*\*\*, M. Valera\*\*\*\*

\* Grupo de Investigación MERAGEM. Dpto. Genética. Universidad de Córdoba. Edif. Mendel. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba. España.

\*\* Dpto. de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona.

\*\*\* Dpto. de Producción Animal. Universidad de León.

\*\*\*\* Dpto. Ciencias Agroforestales. EUITA. Universidad de Sevilla.

E-mail: ge2azorp@uco.es

### Resumen

Se han estudiado la variabilidad y relaciones genéticas de las cuatro poblaciones equinas de aptitud cárnica de España de protección especial (41 muestras) (Burguete (BUR): 10, Jaca Navarra (JAC): 11, Hispano Bretón (HB): 10 y Agrupación Hiperométrica del Pirineo (AHP): 10) a través del estudio del ADN mitocondrial (ADNmt). Se han encontrado 15 haplotipos en las 4 razas analizadas determinados por la existencia de 19 posiciones polimórficas de las cuales 18 han sido posiciones informativas parsimoniosas y 1 no informativa (singleton). La diversidad haplotípica (Hd) ha oscilado entre 0,758 del AHP y 0,993 del BUR siendo el valor medio de todas las razas de 0,929 (SD = 0,016). La raza JAC ha presentado el mayor valor de diversidad nucleotídica (0,023). Casi la totalidad de los haplotipos encontrados los han compartido las razas analizadas excepto el haplotipo 8 que sólo lo ha presentado la AHP, el haplotipo 10 la raza BUR, los haplotipos 13 y 14 el HB y el haplotipo 15 la raza JAC. No se ha encontrado un agrupamiento claro de las poblaciones analizadas, lo que confirma los múltiples orígenes maternos previamente indicado por varios autores. No obstante, al haberse encontrado haplotipos específicos en las 4 poblaciones analizadas se deben tenerlos en cuenta a la hora de llevar a cabo los planes de conservación.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, Razas de caballos de carne, Carne de caballo, Variabilidad genética

### Summary

#### Genetic variability and phylogenetic relationships of the autochthonous horse breed for meat production based on mitochondrial DNA

We have studied the genetic variability and relationships of four endangered Spanish equine populations for meat production using mitochondrial DNA (mtDNA) (41 horses, 30 of them belong to Burguete (BUR), Hispano Bretón (HB) and Agrupación Hiperométrica del Pirineo (AHP) populations and the other 11 samples belong to Jaca Navarra (JAC) breed. Fifteen haplotypes were found and 19 polymorphic sites were detected, eighteen of them were parsimony informative sites and the other one was a singleton. Haplotypic diversity (Hd) ranged from 0.758 of AHP to 0.993 of BUR breed. The average Hd value was 0.929 (SD = 0.016). The JAC breed presented the highest nucleotide diversity value (0.023). Most of haplotypes found have been shared by the four horse populations except haplotype 8 that only was presented by AHP population, haplotype 10 by BUR, the haplotypes 13 and 14 by HB and haplotype 15 by JAC breed. A clear group of horses belong to the same population were not shown. These results confirm the multiple maternal origin previously shown by other authors. However we have found haplotypes specific of each breed that is important to take in account in their conservation programmes.

**Key words:** Mitochondrial DNA, Horse breeds, Horse meat, Genetic variability

## Introducción

La producción de carne de caballo en España está limitada a 4 poblaciones equinas. Estas poblaciones son la raza JAC, el HB, el BUR y la AHP. Las tres primeras se encuentran reconocidas en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como razas de autóctonas de Protección Especial. La raza JAC y el Caballo de BUR se encuentran en la Comunidad Autónoma de Navarra y el HB en Castilla-León. La AHP se encuentra principalmente en Cataluña y Pirineo Catalán y, actualmente, no se encuentra reconocida como raza. No obstante, cualquier animal de otra raza puede ser destinado para este fin. Estudios realizados utilizando marcadores moleculares del ADN nuclear han mostrado que estas cuatro poblaciones equinas y sobre todo las tres reconocidas como razas, se encuentran muy próximas genéticamente e incluso ha habido en algunos casos un elevado flujo de genes de unas a otras (Azor *et al.*, 2007). El ADNmt ha demostrado su utilidad tanto en el análisis de la estructura poblacional como en los estudios históricos, biogeográficos y filogenéticos equinos (Kavar *et al.*, 1999; Bowling *et al.*, 2000; Vilá *et al.*, 2001; Royo *et al.*, 2005; Luís *et al.*, 2006). En este trabajo nos planteamos determinar las relaciones genéticas existentes entre ellas y analizar si pudiesen tener un origen materno ancestral común.

## Material y Métodos

Se han utilizado 41 animales de las 4 poblaciones equinas del norte de España de aptitud cárnica (11 animales de la raza JAC, 10 de la raza BUR, 10 de la raza HB y 10 de la AHP). Se ha utilizado como referencia el fragmento correspondiente a la secuencia completa publicada del ADNmt (nº de acce-

so X79547) y como outgroup la de la especie *E. asinus* (nº de acceso X97337).

El ADN genómico fue extraído a partir de sangre entera mediante el método de Salting out (Miller *et al.*, 1988) utilizando proteinasa K para la digestión. En algunos casos y cuando las muestras eran pelo se utilizó fenol cloroformo.

La amplificación de las secuencias se llevó a cabo en un termociclador de gradiente Mastercycler de la marca Eppendorf®. Los cebadores utilizados fueron: directo 3'-ACCATCAACACCCAAAGCTG-5' y reverso 3'-CCTGAGAAAGAACCAGATG-5' lo que ha amplificado una secuencia de una longitud de 394 nucleótidos de la región control del ADNmt. Este fragmento se corresponde con las posiciones nucleotídicas 15.468-15.861 en referencia a la secuencia completa del ADN mt (Xu y Árnason, 1994) con número de acceso en el GenBank X79547. Para la amplificación se utilizó un volumen de mezcla final de 25 µl que contenía aproximadamente 10 ng de ADN total, 0,5 mM de cada primer, 0,1 mM de dNTPs y 1 U de Taq polimerasa (BioTools, B & M Labs, Madrid, España) en 20 mM de Tampón de PCR y 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. El protocolo de amplificación consistió en un primer paso de desnaturalización a 96 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 s a 59,9 °C y 1 minuto a 72 °C, con un paso de elongación de 5 minutos a 72 °C en el último ciclo. Los productos amplificados fueron purificados usando las enzimas Exonucleasa (Roche) (1 U) y Fosfatasa alcalina (Biolabs) (1 U). El protocolo térmico consistió en 30 min a 37 °C seguido de 15 min a 80 °C. La comprobación del tamaño de los productos se estimó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando como marcador de tamaño Dominión MBL® (0-1000 pb).

La mezcla de la reacción de secuenciación (BigDye™ Terminador) contenía una mezcla

preparada de Big Dye, buffer de secuenciación 5x, entre 1 y 50 ng de producto de PCR, 5 pmol de cebador (el mismo utilizado para la amplificación) y agua milliQ en un volumen final de 10  $\mu$ L. El protocolo térmico consistió en un paso de desnaturalización inicial a 96 °C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C para la hibridación y 2 minutos de extensión de 60 °C. Para la purificación de los productos de la reacción de secuenciación se utilizó EDTA (125 mM) y etanol al 100% y al 70%. Posteriormente se resuspendieron en 10  $\mu$ L de formamida. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en ambos sentidos en un secuenciador automático capilar ABI 3130 (Applied Biosystems).

Todas las secuencias analizadas fueron chequeadas una a una para la detección de las mutaciones usando el programa informático *Sequencher 4.14* (Gene Codes corporation). A continuación se realizó un alineamiento múltiple con el software *ClustalW* (Thompson et al., 1994) utilizado por el programa informático *BioEdit v.7.0.8.0* (Hall, 1999) y se realizó un análisis para estimar las relaciones evolutivas de las razas analizadas utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) a partir de la distancia *p*. El nivel de confianza se comprobó mediante remuestreo de los datos usando Bootstrapping. Los análisis filogenéticos fueron realizados con el software *MEGA 4.0* (Tamura et al., 2007), utilizando 1000 repeticiones. Se han calculado varios estimadores de la variabilidad haplotípica y nucleotídica en las cuatro razas de aptitud cárnica utilizando el programa informático *DnaSP 4.20.2* (Rozas et al., 2003): Número de haplotipos (*h*), Diversidad haplotípica (*Hd*) (Nei (1987), Número de posiciones polimórficas (*S*) (posiciones informativas parsimoniosas (*PIP*) en los sitios en los que al menos hay dos nucleótidos diferentes y uno de ellos en una frecuencia muy alta y posiciones no informativas (*PNi*) que contienen al menos dos nucleótidos diferentes todos ellos en altas frecuencias, Número medio de diferencias nucleotídicas (*k*) entre cada par de secuencias de la muestra (Tajima, 1983) y Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

vas (*PNi*) que contienen al menos dos nucleótidos diferentes todos ellos en altas frecuencias, Número medio de diferencias nucleotídicas (*k*) entre cada par de secuencias de la muestra (Tajima, 1983) y Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

## Resultados y discusión

La comparación de las cuatro razas analizadas junto a la secuencia de referencia utilizada ha determinado la existencia de 19 posiciones polimórficas de las cuales 18 han sido posiciones informativas parsimoniosas y 1 no informativa (singleton). Estas han determinado la existencia de 15 haplotipos (tabla 1).

En la tabla 2 se recogen los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de las secuencias obtenidas para la región D-Loop en cada una de las 4 poblaciones analizadas. Los valores de diversidad haplotípica encontrados han sido en todas las razas analizadas elevados, alcanzando el valor máximo la raza BUR. La diversidad haplotípica (*Hd*) ha oscilado entre 0,758 del AHP y 0,993 del BUR siendo el valor medio de todas las razas de 0,929 (SD = 0,016). La raza JAC ha presentado el mayor valor de diversidad nucleotídica (0,023). Casi la totalidad de los haplotipos encontrados los han compartido las razas analizadas, excepto el haplotipo 8 que sólo lo ha presentado la AHP, el haplotipo 10 la raza BUR, los haplotipos 13 y 14 el HB y el haplotipo 15 la raza JAC.

En la figura 1 se representan en un árbol mediante el método NJ las relaciones filogenéticas de los 41 caballos analizados junto a la secuencia de referencia y a la secuencia de un asno para la región control del ADNmt. En esta figura se puede apreciar que no existe un agrupamiento claro de las poblaciones

Tabla 1. Haplotipos encontrados en las razas equinas españolas de aptitud cárnica  
 Table 1. Haplotypes found in Spanish equine breeds for meat production

Haplotipos		Animales/haplotipo
	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	
	4 4 4 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	
	9 9 9 3 3 4 8 9 0 0 0 0 1 2 3 4 5 5 6	
	4 5 6 4 9 3 5 7 1 2 3 4 7 6 5 9 0 9 6	
Hap_1	T T A C A C G A T C T G T A C A A T G	Hap_1: 4 REF, BUR (2), JAC (1)
Hap_2	C C G T . . A . . T C A . . . G . . .	Hap_2: 3 AHP (1) JAC (2)
Hap_3	C C G T . . . . . T C . . . . G . . .	Hap_3: 6 AHP (2), BUR (2), HB (1), JAC (1)
Hap_4	C C G T . . A . . T C . . . . G . . .	Hap_4: 4 AHP (3), BUR (1)
Hap_5	C C G T . . A . . . C . . . . G . . .	Hap_5: 4 AHP (1), HB (3)
Hap_6	. C . . . . . T . . C . . . . C .	Hap_6: 3 AHP (1), JAC (2)
Hap_7	. C . . . . A . . . . . . . . G . A	Hap_7: 2 AHP (1), JAC (1)
Hap_8	C C G T . . . . . T C A . . . G . . .	Hap_8: 1 AHP (1)
Hap_9	. C . . . . A . C T . . . . . . . .	Hap_9: 6 BUR (2), HB (3), JAC (1)
Hap_10	. C . . . . . T . A . . . . . . . .	Hap_10: 1 BUR (1)
Hap_11	. C . . . . A . . . . . G . . G . A	Hap_11: 4 BUR (1), HB (1), JAC (2)
Hap_12	. C . . . . A . . . . . . . . . A	Hap_12: 1 BUR (1)
Hap_13	. C . . . T . G . T . . . . T . G . A	Hap_13: 1 HB (1)
Hap_14	. C . . . T A G . T . . . . T . G . A	Hap_14: 1 HB (1)
Hap_15	. C . . G . A G . T . . . . . G . .	Hap_15: 1 JAC (1)

REF: Secuencia de referencia (X79547), HAP: Haplotipo, AHP: Agrupación Hiperométrica del Pirineo, BUR: Burguete, HB: Hispano Bretón; JAC: Jaca Navarra. Entre paréntesis se muestra el número de animales de cada raza.

REF: Reference sequence ((X79547), HAP: Haplotipe, AHP: Agrupación Hiperométrica del Pirineo, BUR: Burguete, HB: Hispano Bretón; JAC: Jaca Navarra. Number of animal per breed per haplotype are shown in brackets.

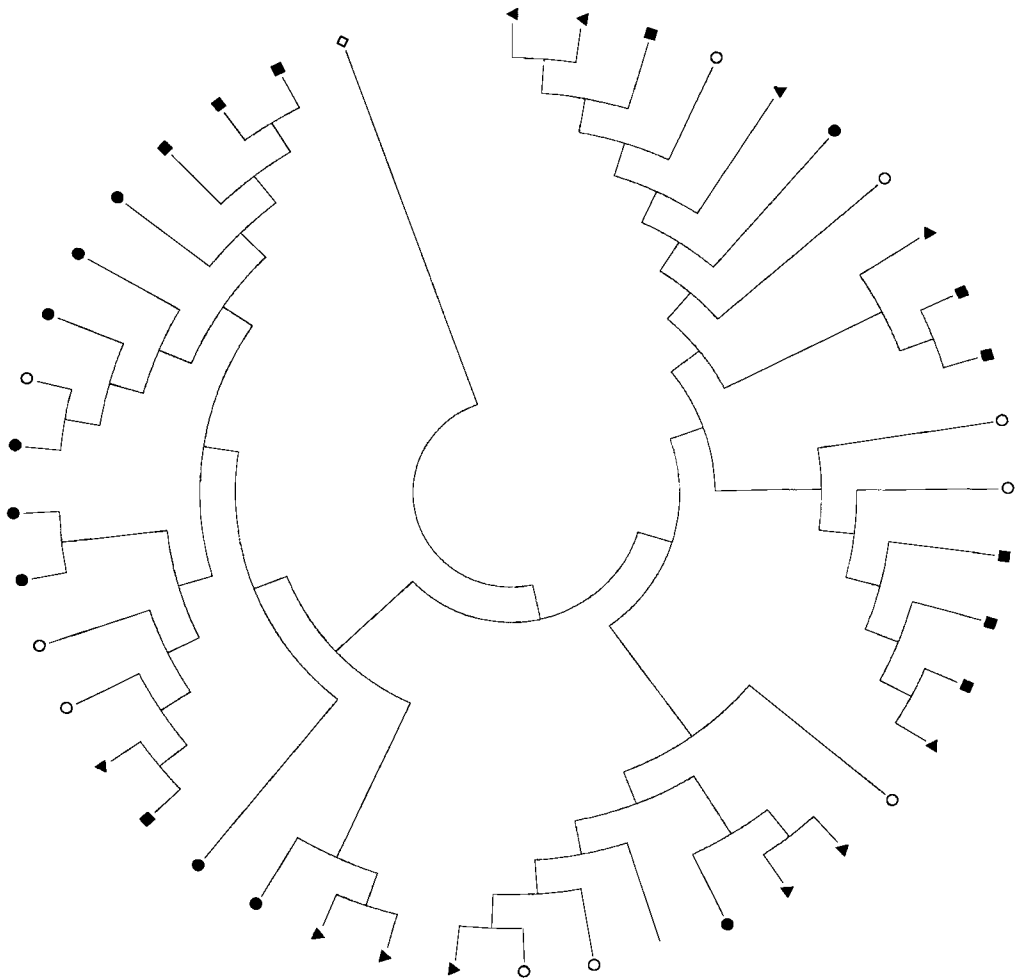
Tabla 2. Parámetros de variabilidad en el ADN mitocondrial en las razas equinas españolas de aptitud cárnica

Table 2. Mitochondrial genetic variability parameters in Spanish equine breeds for meat production

Raza	N	Variabilidad Haplotípica				Variabilidad nucleotídica			
		h	Hd	S	PIP	PNI	k	$\pi$	
JAC	11	8	0,945	17	13	4	6,182	0,02351	
BUR	10	7	0,993	21	14	7	7,917	0,01984	
AHP	10	6	0,758	9	5	4	2,394	0,01516	
HB	10	6	0,844	21	18	3	7,732	0,02138	

H: número de haplotipos, Hd: Diversidad haplotípica, S: número de sitios variables, PIP: Posiciones informativas parsimoniosas, PNI: posiciones no informativas o singletons, K: número medio de diferencias nucleotídicas,  $\pi$ : Diversidad nucleotídica.

H: Number of haplotypes, Hd: haplotypic diversity, S: S: number of polymorphic sites; PIP: Parsimony informative sites, PNI: Singletons; K: average number of nucleotide differences;  $\pi$ : nucleotide diversity.



▲: Jaca Navarra; ●: Agrupación Hipermétrica del Pirineo; ○: Burguete; ■: Hispano Bretón; ◇: E. asinus.

Figura 1. Árbol filogenético calculado mediante el algoritmo del vecino más próximo utilizando la distancia p perteneciente a 41 animales de las cuatro poblaciones de caballos de carne estudiadas. Se ha utilizado la secuencia de la especie *E. asinus* y la secuencia completa del ADNmt del caballo (sin marca en la figura) utilizada de referencia.

*Figure 1. Phylogenetic tree constructed using the neighbour-joining algorithm based in the p-distance of 41 individual belong to four horse meat Spanish populations. E. asinus sequence and reference of DNAm horse sequence (without mark in the picture) was also used.*

analizadas y que la especie asnal se separa claramente de la especie equina. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por diversos autores (Royo et al., 2005; Luís et al., 2006).

La alta variabilidad encontrada en la región hipervariable del ADNmt de las razas equinas analizadas en este trabajo, como si de una especie no domesticada se tratara, confirma los múltiples orígenes maternos pre-

viamente indicados por varios autores (Vilá et al., 2001; Hill, et al., 2002; Jansen et al., 2002; Mirol et al., 2002; Lopes et al., 2005; Royo et al., 2005), por lo que su domesticación fue a partir de distintas fuentes. El examen de la diversidad poblacional equina a nivel del ADNmt ha revelado una consistente ausencia de estructura geográfica correspondiéndose muy pocos de los haplotipos con razas. No obstante, al haberse encontrado haplotipos específicos en las cuatro poblaciones analizadas, deben ser tenidos en cuenta a la hora de llevar a cabo los planes de conservación.

### Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen la colaboración prestada por el ITG-ganadero de Navarra y al Proyecto de investigación RZ2004-00023-00-00 "evaluación de los recursos genéticos equinos de aptitud cárnica en peligro de extinción: caracterización, desarrollo de estrategias que minimicen el parentesco y la erosión genética y diseño y creación de un banco de germoplasma".

### Bibliografía

- Azor PJ, Gómez MD, Alonso ME, Jordana J, Pérez De Muniaín A, Valera M, 2007. Genetic characterization of endangered Spanish horse breeds for meat production. 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Dublin. Ireland.
- Bowling AT, Del Valle A, Bowling M, 2000. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Anim. Genet.*, 31,1-7.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- Hill EW, Bradley DG, Al-Barody M, Ertugul O, Splan RK, 2002. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Anim. Genet.*, 33, 287-294.
- Jansen T, Forster P, Levine MA, Oelke H, Hurles M, 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *PNAS*, 99, 10905-10910.
- Kavar T, Habe F, Brem G, Dovc P, 1999. Mitochondrial sequence variation among the 16 maternal lines of the horse breed. *Anim. Genet.*, 30, 423-30.
- Lopes MS, Mendonça D, Cymbron T, Valera M, Costa-Ferreira J, da Câmara Machado A, 2005. The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Anim. Genet.*, 36, 196-202.
- Luís C, Bastos-Silveira C, Cothran EG, Oom MM, 2006. Iberian origins of New World horse breeds. *J. Hered.*, 97, 107-113.
- Mirol PM, Peral García P, Vega-Pla JL, Dulout FN, 2002. Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. *Anim. Genet.*, 33, 356-363.
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Royo LJ, Álvarez I, Beja-Pereira A, Molina A, Fernández I, Jordana J, Gómez E, Gutiérrez JP, Goyache F, 2005. The origins of the Iberian horses assessed via mitochondrial DNA. *J. Hered.*, 96, 663-669.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-460.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, 22, 4673-4680.

Vilà C, Leonard JA, Götherstroöm A, Marklund S, Sandberg K, Lindén K, Wayne RK, Ellegren H, 2001. Widespread origin of domestic horse lineages. *Science* 291, 474-477.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)