

# ANÁLISIS PRELIMINAR DE LAS SECUENCIAS DEL CITOCROMO B Y ARNr12s EN DOS POBLACIONES DE PONI CÉLTICO DE ASTURIAS

L.J. Royo<sup>1\*</sup>, I. Álvarez<sup>1</sup>, I. Fernández<sup>1</sup>, J.P Gutiérrez<sup>2</sup>, J.L. Martínez<sup>3</sup>, E. Gómez<sup>1</sup> y F. Goyache<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203 Gijón (Asturias);

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria

<sup>3</sup>Citometría e Inmunotecnología, Universidad de Oviedo, OVIEDO.

\*e-mail: [ljroyo@serida.org](mailto:ljroyo@serida.org)

## INTRODUCCIÓN

La recuperación del Poni de raza Asturcón llevada a cabo por la asociación de criadores ACPRA (<http://www.asturcones.com/>) se ha basado fundamentalmente en individuos de capa negra. Recientemente se ha planteado la necesidad por parte de la Asociación de Criadores "García Dory" de la toma de medidas urgentes de protección sobre la población conocida como "Caballos de Corro" de Asturias, Asturcón Occidental o Asturcón Castaño. Esta población ha sido descrita repetidas veces en tratados etnológicos durante todo el siglo XX (Sotillo y Serrano, 1985), existiendo grandes evidencias históricas de que hasta mediados del siglo pasado constituía la población de poni céltico mayoritaria en Asturias (Álvarez Llana, 1995). El proyecto RZ03-011, financiado por el INIA, prevé la caracterización de ambas poblaciones de Poni Asturcón, al objeto de poder recomendar, a las asociaciones de ganaderos y administraciones públicas, estrategias coordinadas de conservación y gestión de ambas poblaciones.

El ADN mitocondrial proporciona la información molecular más utilizada en estudios sobre el origen, domesticación y difusión de las especies ganaderas y, por supuesto, también de caballos (Vilà et al., 2001; Jansen et al., 2002). En un estudio previo (Royo y col., 2004) hemos secuenciado un fragmento de la región de control de la replicación del ADN mitocondrial en animales pertenecientes a dos poblaciones equinas asturianas: poni Asturcón y Caballo de Corro de Asturias.

La región de control de la replicación del ADN mitocondrial es un fragmento de alta tasa de mutación, utilizable para evaluar relaciones genéticas estrechas entre poblaciones e individuos (Ishida y col., 1995). En la presente comunicación estudiamos información proveniente de la secuenciación de otras zonas del ADN mitocondrial: Citocromo B (CitB) y del ARN ribosomal 12s (ARNr12s), tratando de estimar su capacidad informativa para relacionar poblaciones cercanas. Estas regiones muestran una tasa de evolución más lenta (Mindell y Honeycutt 1990; Oakenfull y col., 2000).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionó al menos un individuo representativo de cada uno de los haplotipos de *D-loop* presentes en cada población estudiada de poni asturiano (8 individuos de la población de poni asturcón y 5 de la población castaña; ver

Tabla 1). Se amplificó por PCR un fragmento del CitB y otro del ARNr12s, siguiendo protocolos estándar y utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2. La secuenciación de los fragmentos de PCR se llevó a cabo en un equipo ALFexpressII (Amersham Biosciences), utilizando el protocolo de secuenciación con oligonucleótidos marcados (Thermosequenase Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). Se obtuvo la secuencia de los 13 animales elegidos entre los nucleótidos 14302-14730 del CitB; y 508-921 del ARNr12s, tomando como referencia para su numeración la secuencia con número de acceso: X79547 (Xu y Arnason, 1994).

Los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron usando el programa MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001).

Tabla 1. Haplotipos de ADN mitocondrial encontrado en los animales muestreados no emparentados de las poblaciones equinas asturianas.

Haplotipo	Asturcón	Caballo de Corro
H1	4	8
H2		2
H3	1	
H4	1	
H5	1	
H6		1
H7	2	
H8	1	3
H9	1	
H10	1	
Nº Individuos	12	14
Nº Haplotipos	8	4

- Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar los fragmentos descritos del Citocromo B y ARNr 12s.

oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Horse-citB-up	CCTCAAATTTTCATCATGATG
Horse-citB-dn	TGATGAAGGGTAGGATGAAGTG
Horse-12s-up	ACGATAGCTAAGACCCAAACTG
Horse-12s-dn	AAGGAGGGTGACGGGCGGTGTG

## RESULTADOS

En el caso de la secuencia del CitB, hemos encontrado 7 polimorfismos en 401 bases secuenciadas, distribuidos en 8 haplotipos diferentes (Tabla 3). Un mismo haplotipo (CitB-H3) resultó ser el más frecuente en ambas poblaciones de poni céltico asturiano. En la población de poni Asturcón encontramos 7 haplotipos diferentes y sólo 3 en el caballo de Corro. En el caballo Asturcón

encontramos 5 haplotipos exclusivos, y solo uno en la población castaña (Caballo de Corro).

En el caso de la secuencia del ARNr12s, encontramos 3 polimorfismos en 414 bases secuenciadas, dando lugar a 3 haplotipos diferentes. El mismo haplotipo (12s-H1), resultó ser el más frecuente en ambas poblaciones de ponis asturianos, siendo la de Caballo de Corro monomórfica para este haplotipo. En el poni Asturcón se han encontrado otros 2 haplotipos más.

La diversidad haplotípica fue, en ambos casos (Citocromo B y ARNr12s), mayor en la población de poni Asturcón que en la población de Caballo de Corro (0,88-0,60 respectivamente para el caso del Citocromo B; y 0,38-0,20 respectivamente en el caso de ARNr-12s).

-Tabla 3. Haplotipos de Citocromo B. Se detallan las posiciones nucleotídicas (desde la 14352 a la 14672) en que se encuentran los sitios variables que definen los haplotipos, el número de haplotipos (N) y la diversidad haplotípica (k) encontrada en las poblaciones analizadas.

		Asturcón	Caballo de Corro
	1111111		
	4444444		
	3445566		
	5275527		
	2483682		
CitB-H1	TTCTTAG	1	
CitB-H2	C.....	1	
CitB-H3	C...G.	2	3
CitB-H4	CC...A	1	1
CitB-H5	C...G.	1	
CitB-H6	..T....	1	
CitB-H7	C..C.G.	1	
CitB-H8	C...CG.		1
	N	7	3
	k	0,875	0,6

- Tabla 4. Haplotipos encontrados en la secuencia del ARNr12s. Se detallan las posiciones nucleotídicas (desde la 738 a la 859) en que se encuentran los sitios variables que definen los haplotipos, el número de haplotipos (N) y la diversidad haplotípica (k) encontrada en las poblaciones analizadas.

		Asturcón	Caballo de Corro
	788		
	355		
	889		
12s-H1	TTA	5	5
12s-H2	.C.	2	
12s-H3	C.G	1	
	N	3	1
	k	0,375	0,2

## DISCUSIÓN

Las poblaciones equinas asturianas de poni Asturcón y Caballo de Corro se diferencian fundamentalmente en la capa: mayoritariamente castaña en el Caballo de Corro y prácticamente en su totalidad negra en el poni Asturcón. La capa negra en caballos tiene carácter recesivo respecto de la capa castaña (Rieder et al., 2001), lo que explicaría tanto su fijación en el poni Asturcón como su aparición en el Caballo de Corro. Esto podría considerarse un reflejo de la historia común que han mantenido ambas poblaciones equinas (Álvarez Sevilla, 1999) y de la ausencia de selección para el color en Caballo de Corro, lo que permitiría la manifestación de la capa negra en esta población.

Para caracterizar genéticamente ambas poblaciones de poni, se secuenció un fragmento de la región de control del ADN mitocondrial (Royo y col., 2004). El estudio de la región de control de la replicación del ADN mitocondrial permitió encontrar una gran diversidad de haplotipos de ADNmt, señalando la existencia de un número elevado de líneas maternas diferentes en la formación de las dos poblaciones, lo que concuerda con estudios previos en la especie equina (Vilà et al., 2001; Jansen et al., 2002). Aunque la diversidad haplotípica es mayor en el Asturcón, el número de haplotipos que comparten ambas razas es muy alto. Estos datos se pueden ver en la Tabla 1.

En regiones hipervariables como la de control de la replicación del ADN mitocondrial es posible que distintos sucesos de mutación se produzcan en un mismo sitio. Por ese motivo, la información obtenida a partir de esa secuencia puede enmascarar la historia de la población estudiada. En concreto, poblaciones que han sufrido un cuello de botella reciente (caso del poni Asturcón) pueden presentar una gran variabilidad nucleotídica y haplotípica. Esta situación, ha ido previamente descrita en otras poblaciones equinas de pocos efectivos como la Exmoor (Jansen et al., 2002),

Por esas razones, puede ser conveniente estudiar otras regiones del ADN mitocondrial con una menor tasa de evolución, donde los múltiples sucesos de mutación en una misma posición sean menos probables. El estudio de este tipo de secuencias de menor variabilidad puede complementar la información obtenida en el *D-loop* permitiendo llegar a conclusiones más precisas.

La diversidad nucleotídica encontrada en las secuencias del ARNr12s es muy baja (3 posiciones variables en 414 nucleótidos secuenciados), y por tanto no parece suficiente para realizar estudios de diversidad en poblaciones cercanas. Sin embargo, los resultados obtenidos de la secuenciación del CitB, parecen ajustarse a lo encontrado previamente en la región de control de la replicación del ADN mitocondrial. La población de poni Asturcón presentó, para el CitB una mayor diversidad haplotípica que la de Caballo de Corro. Esta diversidad se acerca más a lo esperable a partir de la historia reciente de estas poblaciones. Nuestros resultados señalan que la secuenciación del CitB puede ser útil para estudiar poblaciones cercanas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto INIA RZ03-011, y para su realización se ha contado con el acuerdo y colaboración de la Asociación de Criadores "García Dory" y de la Asociación de Criadores de Poni de raza Asturcón (ACPRA).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ LLANA, J. 1995. Morfología y caracteres raciales. En 'Asturcones', Álvarez Llana, J., Álvarez Sevilla, A. and Jáuregui Campos, J. Eds. Caja de Asturias Ed. 3-93 pp.

ÁLVAREZ SEVILLA J.A., 1999. Protohistoria y ganadería. En El Ganado vacuno del Tronco Castaño, pp.11-18, Imprenta Narcea S.L., Granda-Siero (Asturias).

ISHIDA, N., OYUNSUREN, T., MASJHIMA, S., MUKOYAMA, H., SAITOU, N. 1995. Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus *Equus* with special referente to the phylogenetic relationship between Przewalski's wild horse and domestic horse. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 180-188.

JANSEN, T., FORSTER, P., LEVINE, M.A., OELKE, H., HURLES, M. ENFREW, C., WEBER, J. AND OLEK, K. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *PNAS*, 99: 10905-10910.

KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. AND NEI, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics*, 17:1244-1245.

MINDELL, D.P., HONEYCUTT, R.L. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 541-566.

OAKENFULL. E.A., LIM, H.N., RYDER, O.A. 2001. A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of *Equus*. *Conservation Genetics* 1: 341-355.

RIEDER, S., TAOURIT, S., MARIAT, D., LANGLOIS, B., AND GUÉRIN, G. 2001. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R) and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*. 12, 450-455.

ROYO, L.J., ÁLVAREZ, I., GUTIÉRREZ, J.P., FERNÁNDEZ, I., GÓMEZ, E., GOYACHE, F. 2004. Variabilidad en el ADN mitocondrial de dos poblaciones de poni céltico de Asturias. VI Congreso Ibérico sobre los Recursos Genéticos Animales, en Ponte da Lima (Portugal).

SOTILLO J.L. Y SERRANO V. 1985. Producción Animal I. Etnología Zootécnica. Ediciones Tebar-Flores, Madrid, Spain.

VILÀ, C., LEONARD, J.A, GÖTHERSTOÖM, A., MARKLUND, S., ANDBERG, K., LINDÉN, K., WAYNE, R. K. AND ELLEGREN, H. 2001. Widespread origin of domestic horse lineages. *Science* 291, 474–477.

XU, X., ARNASON, U. 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 148, 357-362.