ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 212-216

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

L.J. Royo*, I. Álvarez*, I. Fernández*, J.P. Gutiérrez, J.L. Martínez***, E. Gómez*, F. Goyache***

* SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203 Gijón (Asturias). E-mail: ljroyo@serida.org

** Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria

*** Citometría e Inmunotecnología, Universidad de Oviedo, Oviedo

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 urgentes medidas de protección sobre la población conocida como "Caballos de Corro" de Asturias, Asturcón Occidental o Asturcón Castaño. Esta población de animales 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 era 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 ADNmt proporciona la información molecular más utilizada en estudios sobre el origen, domesticación y difusión de las especies de ganado doméstico y, por supuesto, también en 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 ADNmt en animales pertenecientes a dos poblaciones equinas asturianas: 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 nos proponemos estudiar la información proveniente de la secuenciación de otras zonas del ADN mitocondrial: Citocromo B (CitB) y del ARN ribosomal 12s (ARNr12s); caracterizadas por tener una tasa de evolución más lenta (MINDELL y HONEYCUTT, 1990; OAKENFULL y col., 2000).

El objetivo de la presente comunicación es, por lo tanto, evaluar la capacidad informativa de las secuencias del CitB y ARNr12s

equino para establecer relaciones entre poblaciones cercanas.

Material y métodos

Se seleccionó al menos un individuo representativo de cada uno de los haplotipos de *D-loop*, presentes en cada población de poni asturiano estudiada (8 individuos de la población de poni asturcón y 5 de la población castaña; ver cuadro 1). Se amplificó por PCR un fragmento del Citocromo B y otro del ARNr12s siguiendo protocolos estándar, utilizando los oligonucleótidos mostrados en el cuadro 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 CitocromoB; 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 mediante el uso del programa MEGA 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001).

Cuadro 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	
N° Individuos	12	14
N° Haplotipos	8	4

Cuadro 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	CCTCAAATTTCATCATGATG
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 7 haplotipos diferentes (cuadro 3). Un mismo haplotipo (CitB-H3) resultó ser el más frecuente en las dos poblaciones de poni céltico asturiano. En la población de poni Asturcón encontramos 6 haplotipos diferentes y sólo 3 en el caballo de Corro. En el caballo Asturcón encontramos 4 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, es en ambos casos (Citocromo B y ARNr 12s) es mayor en la población de poni Asturcón que en la población de Caballo de Corro: 0,75-0,60 respectivamente para el caso del Citrocromo B; y 0,38-0,20 respectivamente en el caso de ARNr-12s.

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 para el poni Asturcón. La capa negra en caballos tiene carácter recesivo respecto de la capa castaña (Rieder *et al.*, 2001), lo que explicaría que estuviera fijada en Asturcón y que, con cierta frecuencia, aparezca en Caballo de Corro. Esto podría considerarse un reflejo de la historia común que han man-

Cuadro 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 y el número de haplotipos (N) y la diversidad haplotípica (k) encontrados por población analizada

	1111111 4444444 3445566 5275527 2483682	Asturcón	Caballo de Corro
CitB-H1	TTCTTAG	1	
CitB-H2	C.....	1	
CitB-H3	C....G.	3	3
CitB-H4	CC....A	1	1
CitB-H5	..T....	1	
CitB-H6	C..C.G.	1	
CitB-H7	C...CG.		1
	N	6	3
	k	0,75	0,60

Cuadro 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 y el número de haplotipos (N) y la diversidad haplotípica (k) encontrados por población analizada

	788 355 889	Asturcón	Caballo de Corro
12s-H1	TTA	5	5
12s-H2	.C.	2	
12s-H3	C.G	1	
	N	3	1
	k	0,38	0,20

tenido ambas poblaciones equinas (ÁLVAREZ SEVILLA, 1999) y que la ausencia de selección para el color en Caballo de Corro permite que se manifieste ese carácter.

Para caracterizar desde el punto de vista genético ambas poblaciones de poni, se utilizó la secuenciación de un fragmento de la región de control del ADN mitocondrial (ROYO y col., 2004). Sin embargo hay que ser consciente de que en este tipo de regiones hipervariables, puede darse el caso, con cierta frecuencia, que múltiples sucesos de mutación afecten a una misma posición. Por ese motivo se decidió estudiar otras regiones con una tasa menor de evolución, donde este tipo de casos de múltiples sucesos de mutación en una misma posición sea menos probable, y de alguna manera poder corregir las conclusiones que se desprenden del estudio de unas regiones u otras.

El estudio de la región de control de la replicación ha encontrado una gran diversidad de haplotipos de ADNmt, señalando la existencia de un gran número de líneas maternas diferentes en la formación de las dos poblaciones, lo que concuerda con estudios previos de diversos autores en la especie equina (VILÀ *et al.*, 2001; JANSEN *et al.*, 2002). Aunque se encuentra una mayor diversidad haplotípica en Asturcón, el número de haplotipos que comparten ambas razas es muy grande. Estos datos se pueden ver en el cuadro 1.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la región de control de la replicación del ADN mitocondrial tiene tanta variabilidad que hace posible que en poblaciones que han sufrido un cuello de botella reciente (como es el caso del poni Asturcón) se encuentre una gran cantidad de haplotipos. Esta situación, que ha sido descrita en otras poblaciones equinas de pocos efectivos como la Exmoor (JANSEN *et al.*, 2002) puede enmascarar la historia de la población.

Los resultados obtenidos de la secuenciación del CitB, parecen seguir a grandes rasgos los comentados para la región de control de la replicación. La población de Asturcón tiene una mayor diversidad haplotípica que el Caballo de Corro y se ha encontrado una menor diversidad haplotípica en general. Esta diversidad se acerca más a lo esperado desde el punto de vista del conocimiento de la historia reciente de las poblaciones bajo

estudio. Estos resultados señalan que en este caso puede ser útil el uso de la secuenciación del CitB en poblaciones cercanas.

En el caso de las secuencias del ARNr12s la diversidad nucleotídica que se ha encontrado es muy baja (3 posiciones variables en 414 nucleótidos secuenciados), y por lo tanto no suficiente como para pensar en utilizar esta región en estudios de diversidad en 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).

Bibliografía

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. Mitocondrial 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., OLEK K., 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. PNAS, 99: 10905-10910.

KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., 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., 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 AND 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., 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., 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.