

DIVERSIDAD DEL DNA MITOCONDRIAL EN 4 RAZAS EQUINAS AUTÓCTONAS DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO Y NAVARRA

A.SOLIS, B.JUGO*, A.ESTONBA

Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila.

Euskal Herriko Unibertsitatea. UPV/EHU.

*e-mail de contacto: ggpjuorb@lg.ehu.es



1. INTRODUCCION

Este trabajo se engloba en un proyecto más amplio sobre el análisis de la diversidad genética y relaciones filogenéticas de las cuatro razas equinas autóctonas de la Comunidad Autónoma Vasca y Navarra: Pottoka (POT), Jaca Navarra (JN), Burgete (BU) y Euskal Herriko Mendiko Zaldia (EHMZ). Estas razas ya han sido caracterizadas mediante marcadores microsatélite y abordamos ahora el análisis de su genoma mitocondrial.

El DNA mitocondrial (DNAm) de los mamíferos es haploide, de herencia materna, sin recombinación entre sus genes y con una tasa de sustitución de nucleótidos 5-10 veces mayor que el DNA nuclear. Estas características facilitan el uso del DNAm como una herramienta para determinar las relaciones entre individuos de una especie y entre especies estrechamente relacionadas, con tiempos de divergencia muy recientes. La región D-loop del DNAm, concretamente, es la más variable en su secuencia, por lo que es muy útil para el análisis filogenético de grupos estrechamente relacionados.

En equino el DNAm ha sido frecuentemente utilizado para caracterizar la variación intraracial (Kavar *et al.* 1999, Kim *et al.* 1999, Bowling *et al.* 2000, Miro *et al.* 2002). En cuarto al análisis de las relaciones filogenéticas interraciales, los trabajos más extensos son los llevados a cabo por Vilá *et al.* (Science 291, 2001) y Jansen *et al.* (PNAS 99, 2002). Vilá *et al.* mediante un análisis filogenético agruparon las secuencias de diferentes razas de caballos antiguos y modernos en 6 clados (A-F), indicando un alto número de ancestros de origen antiguo. Posteriormente, mediante el análisis de redes Jansen *et al.* definieron un séptimo clado (G).



Pottoka



Jaca Navarra



Euskal Herriko Mendiko Zaldia



Burgete

ANÁLISIS DE LA VARIACION

Tabla 1. Sitios polimórficos entre los 27 haplotipos encontrados

Haplotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
hmt1	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt2	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt3	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt4	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt5	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt6	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt7	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt8	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt9	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt10	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt11	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt12	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt13	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt14	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt15	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt16	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt17	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt18	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt19	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt20	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt21	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt22	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt23	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt24	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt25	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt26	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
hmt27	A	C	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

En los 80 individuos analizados se han detectado 27 secuencias diferentes (hmt1-hmt27). En total se han detectado 37 lugares polimórficos (Tabla 1), lo que supone el 8,4% de la secuencia obtenida. Todas las mutaciones detectadas corresponden a transiciones, lo cual es muy común en la evolución del DNA mitocondrial de los mamíferos.

Tabla 2. Frecuencia de cada haplotipo en las 4 razas analizadas.

Haplotype	Pottoka	EHMZ	Burgete	Jaca Navarra
hmt1	0,2	0,2	0	0,1
hmt2	0,2	0	0	0
hmt3	0,05	0,1	0	0,05
hmt4	0,15	0,15	0,1	0
hmt5	0,05	0	0	0
hmt6	0,25	0,1	0,2	0,2
hmt7	0,05	0	0	0
hmt8	0	0,05	0,05	0,05
hmt9	0	0	0	0,05
hmt10	0	0	0	0,05
hmt11	0	0	0,1	0,05
hmt12	0	0	0	0,05
hmt13	0	0	0,1	0
hmt14	0	0	0,05	0
hmt15	0	0	0	0
hmt16	0	0,05	0,05	0,05
hmt17	0	0	0,05	0
hmt18	0	0,05	0	0
hmt19	0,05	0,05	0	0
hmt20	0	0,05	0	0
hmt21	0	0,05	0	0
hmt22	0	0	0,05	0
hmt23	0	0,05	0,05	0
hmt24	0	0	0	0,05
hmt25	0	0	0	0
hmt26	0	0,05	0	0
hmt27	0,1	0	0	0

Tal y como se ve en la tabla 2, cada raza presenta 4 o 5 haplotipos que no aparecen en las demás. Por otra parte, el haplotipo hmt6 es el único que aparece en las cuatro razas, y con una alta frecuencia.

Tabla 3. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (n) para cada raza

Raza	n	h	Diversidad haplotípica (h ± SD)	Diversidad nucleotídica
Pottoka	20	9	0.889±0.042	0.01777
Jaca Navarra	20	10	0.853±0.063	0.01814
Burgete	20	11	0.923±0.033	0.01852
Euskal Herriko Mendiko Zaldia	20	13	0.942±0.034	0.01923
Total	80	27	0.921±0.015	0.01825

En la tabla 3 observamos varios parámetros de diversidad poblacional, como el número de haplotipos por raza y la diversidad nucleotídica y haplotípica. El número medio de haplotipos por raza es 10,75 (varia entre 9 y 13). Teniendo en cuenta que este valor depende del tamaño de la muestra lo hemos comparado con el valor medio obtenido por Vilá *et al.*, ya que en este trabajo han analizado también una media de 20 individuos en 10 razas. Así pues, el valor obtenido en estas cuatro razas es alto comparándolo con el de dicho trabajo (7,4 haplotipos). La diversidad nucleotídica y haplotípica es muy similar en las cuatro razas. La diversidad nucleotídica media por raza es 0,0184, valor medio-alto comparándolo con el valor obtenido por Vilá *et al.* (0,022). La alta diversidad intraracial en caballos puede ser debida a la migración durante la formación de las diferentes razas o a la persistencia de arquetipos mitocondriales dentro de las razas, este último, caso probable en la raza Pottoka.

2. MATERIALES Y METODOS

MUESTRAS

Del total de los animales muestreados se han seleccionado al azar 20 animales por cada una de las cuatro razas nativas (n=80). En el muestreo se han tenido en cuenta las cinco comarcas de Alava en las que se distribuye la raza EHMZ y las secciones en las que la raza Pottoka se divide en su libro genealógico.

AMPLIFICACION Y SECUENCIACION

El DNA fue extraído de sangre total siguiendo protocolos standard. Se ha amplificado el fragmento comprendido entre la región tRNA^{Pro} y el dominio central del D-loop (posiciones 15424-15862), utilizando los primers y las condiciones de PCR descritas por Marklund *et al.* (1995). Estos fragmentos (439 pb) han sido purificados utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN), secuenciados mediante el kit de secuenciación BigDye Terminator y analizados en el analizador genético ABI PRISM 310.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Análisis de la variación

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el editor de secuencias BioEdit v.5.0.9 (Hall T.A., 1999).

El alineamiento de nuestras secuencias con las del GenBank se realizó con el programa de alineamiento múltiple CLUSTAL W (Thompson J.D., 1994).

Los parámetros de diversidad poblacional, como la diversidad nucleotídica y la diversidad haplotípica se calcularon mediante el programa DnaSP (Rozas J. *et al.* 1999).

Relaciones filogenéticas

Se ha realizado el análisis de las relaciones filogenéticas entre las cuatro razas nativas y secuencias del GenBank de las siguientes razas: Asturcón, Losino, Pottoka, Mallorquina, Menorquina, Andaluza, Arabian, Mongol, Belgian, Yunnan, Icelandic, Ermoor, Danish, Shetland, Cheju, Thoroughbred, Przewalski y secuencias antiguas (Pleist. y Anc.). La elección de estas secuencias es debida a que corresponden a los 6 clados definidos por Vilá *et al.* (2001). Se añadió además una secuencia (BAR24A) correspondiente al clado G definido por Jansen *et al.* (2002). Así podremos ubicar nuestras secuencias en los clados definidos. La secuencia del burro (*Equus asinus*) se utilizó como outgroup. La comparación de estas secuencias se hizo sobre 291 pb (posiciones 15480-15770).

Las relaciones filogenéticas se analizaron mediante el programa MEGA2 (Kumar *et al.*, 1993). Las distancias genéticas entre razas y los diferentes haplotipos se calcularon utilizando el modelo de 2-parámetros de Kimura y se elaboró un árbol filogenético mediante el método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987). La robustez del árbol fue evaluada llevando a cabo un bootstrap de 1000 iteraciones, representándose en el árbol sólo los valores superiores a 50.

RELACIONES FILOGENÉTICAS

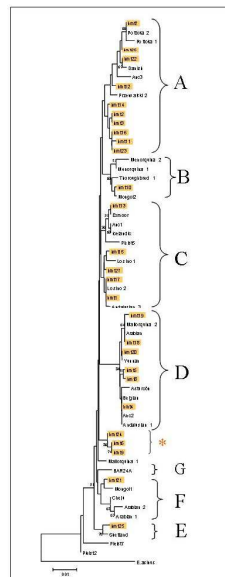


Figura 1. Árbol neighbor joining basado en las distancias de Kimura 2-parámetros. Las letras indican los diferentes clados descritos por Vilá *et al.* y Jansen *et al.*

4. CONCLUSIONES

• Teniendo en cuenta tanto la diversidad haplotípica como la nucleotídica, la variabilidad encontrada en las cuatro razas nativas ha sido muy alta.

• El análisis filogenético basado en distancias confirma la variabilidad de las razas autóctonas analizadas en tanto que hemos encontrado haplotipos correspondientes a los 6 clados descritos por Vilá *et al.* (2001).

• Tres de las secuencias obtenidas en las cuatro razas nativas forman un nuevo clado no descrito por otros autores. Estos haplotipos podrían ser propios de estas razas.

• El análisis de estas cuatro razas nativas apoya el antiguo origen de las líneas maternas en la especie equina. El análisis en profundidad de estas puede contribuir al esclarecimiento de la historia del caballo doméstico en Europa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de Koldo Gatzon Pérez de la Diputación Foral de Araba, Jon Agirre de SERGAL, Iñigo Agirre de la Diputación Foral de Gipuzkoa, Alberto Pérez de Munain de ITG-Ganadero e Iñaki Inzausti e Iñigo Pascual de la Diputación Foral de Bizkaia.