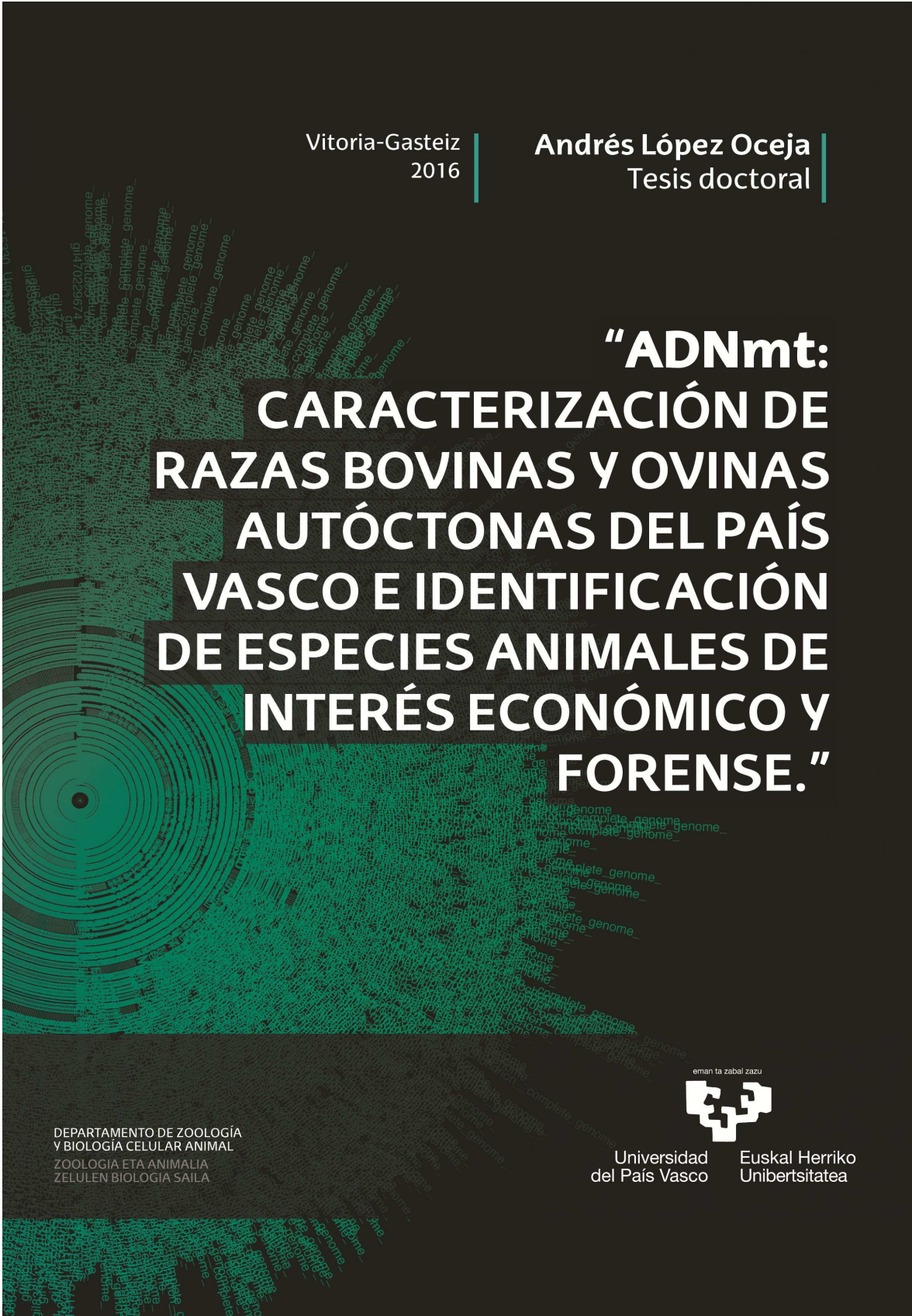


Vitoria-Gasteiz  
2016

Andrés López Ocea  
Tesis doctoral



**“ADNmt:  
CARACTERIZACIÓN DE  
RAZAS BOVINAS Y OVINAS  
AUTÓCTONAS DEL PAÍS  
VASCO E IDENTIFICACIÓN  
DE ESPECIES ANIMALES DE  
INTERÉS ECONÓMICO Y  
FORENSE.”**

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA  
Y BIOLOGÍA CELULAR ANIMAL  
ZOOLOGIA ETA ANIMALIA  
ZELULEN BIOLOGIA SAILA

eman ta zabal zazu

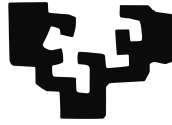


Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Departamento de Zoología y Biología Celular Animal  
Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila

**“ADNmt: CARACTERIZACIÓN DE RAZAS BOVINAS Y OVINAS  
AUTÓCTONAS DEL PAÍS VASCO E IDENTIFICACIÓN DE  
ESPECIES ANIMALES DE INTERÉS ECONÓMICO Y FORENSE.”**


Trabajo de tesis dirigido por:

**Dra. María de los Ángeles Martínez de Pancorbo Gómez**

Para la obtención del grado de Doctor de:

**Andrés López Oceja**

andreslopezocaja@gmail.com

 [orcid.org/0000-0003-0192-4515](https://orcid.org/0000-0003-0192-4515)

**Vitoria-Gasteiz, 2016**





Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias, en primer lugar, a la concesión de una beca predoctoral, dentro del programa de Formación de Jóvenes Investigadores, por parte del Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad, la cual he disfrutado entre los años 2012 y 2016. Los fondos para la realización de los análisis han procedido del Grupo consolidado de Investigación BIOMICs, mediante el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco desde 2012 (IT-424-07 e IT- 833-13), mediante la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU (ELDUNANOTEK UFI 11/32) y mediante los proyectos SAIOTEK; S-PE10UN68 y S-PE11UN106. Asimismo, se ha contado con el apoyo técnico y humano prestado por los SGIker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, FSE), en particular del Banco de ADN de la UPV/EHU. Finalmente, agradecer el apoyo y colaboración al Parque de la Naturaleza de Cabárceno, al Arkeologi Museoa (Museo de Arqueología de Bizkaia), el Bibat - Museo de Arqueología de Álava, al centro de inseminación artificial ovina Ardiekin, a las asociaciones y cooperativas de ganaderos E.T.E.F.E, Sergal, Servicampo, Pro-Salers, Txerrizaleok y la asociación de cotos de caza A.C.C.A., al animalario de Vitoria-Gasteiz de la UPV/EHU y a la multitud de ganaderos particulares y comercios de alimentación de Vitoria-Gasteiz que han donado muestras para hacer posible este estudio.



**A mis Aitas**

**A Verónica**







### Agradecimientos

Como casi cualquier niño de este mundo cuando me preguntaban que quería ser de mayor decía que futbolista o astronauta (esto último todavía no lo descarto), pero al crecer la primera elección sería que recuerdo fue médico forense y un poco más tarde científico, sin discriminar el campo, ya que me gustaban demasiadas cosas. Estos dos últimos deseos los he podido cumplir gracias a Marian, mi excelente directora de Tesis Doctoral, que aunque no tenga los contactos necesarios en el Athletic o en la NASA ha hecho que todos mis sueños de la infancia se hayan hecho realidad, algo que nunca podre agradeceré lo suficiente. Gracias por todo lo que me has enseñado y por todos los consejos dados a lo largo de todos estos años, sin tu incalculable ayuda este trabajo no se podría ni haber empezado.

También me gustaría agradecer la consecución de este trabajo a Miriam, Leire y en especial a Carol. Mis tres ángeles de Charlie sin las cuales esta tesis habría sido mucho más tediosa e incluso por momentos diría que imposible. Vuestras correcciones, ánimos y chapas aguantadas han sido vitales, gracias de todo corazón chicas.

Todo camino es más agradable si se hace con buena gente alrededor. Este laboratorio ha sido como mi casa los últimos años y eso se ha conseguido gracias a la gente que he ido encontrando a lo largo de todo este tiempo. Me gustaría agradeceré a Sergio, Xabi y David por comenzar el camino y haberme ensañado a trabajar en un laboratorio, a Aznar y Celorrio por ser parte del trio calavera y hacerme reír cada segundo que estoy con vosotros, trabajar riendo es menos trabajo, a Maite Álvarez, Endika, Patri, Iñaki, Melania, Noe, Lourdes, Amaia, Naiara, Ainara, Ale, Adrián, Majo, Laura, Maite Gil, Miguel, Esti, Carmen, Mari Jose y Mu por estar siempre para dar un consejo, enseñar o echar una mano. También agradecer a los de técnicos, tesinandos, etc. que de alguna forma han colaborado con este trabajo. Por cierto queda pendiente de llamar a Paco, que llame el siguiente.

A la Ciskera, gran chamizo y mejor cuadrilla. Sancha, como todo que te diga va a ser poco, ni te lo digo, ya lo sabes todo. A Nano, Hugo, Jabuto y Albert por ser los hermanos mayores (o mellizo) que me habría gustado tener. A Virgi una rosa entre diez animales. Y a Emi, por ser mi Gandalf particular con el que sabes dónde empieza la historia, pero no donde acaba.

A los habitantes del Txoko (y solo del Txoko, ya que no saldrán si no se prende fuego), que sin esas tardes de play, charlas y bocatas todo habría acabado mucho antes, pero no tendría sentido. A las hermanas Etxebarria, por ser las dos amatxus del Txoko y a la vez un terremoto de 9,2 en la escala Richter que te alegran el día.

También me gustaría agradecer a los Vitorianos que me han acogido los últimos años. A los “poteadores” por sacarme de casa y hacer que me evada del día a día. A los ambientólogos, para que nuestras tradiciones sigan vivas durante años en Tabar o donde sea. A los chicos de la huerta, por esos momentos de pico y pala y en especial a Eneko, por enseñarme otro mundo bajo este mundo. A Ana por ser una compañera genial y volver a traer la cordura a casa. Y a otros menos Vitorianos, como Raúl un vasco nacido en Carabanchel, Jena un compañero irrepitible y Altraí que irradia felicidad a todo el que le rodea.

A Alvarito, que no os engañe el diminutivo, ya que es una de las personas más grandes que conozco, gracias por todo. Birras, inventos y frikadas... y solo acabamos de empezar, vas a ser mi Wozniak pero todavía no lo sabes.

Me gustaría agradecer por la confianza depositada en mí en diferentes momentos de mi vida a dos personas. A Josean Orrantia por ser el profesor que todo adolescente tendría que tener y por enseñar desde la pasión y el humor y a Ricardo Merino, responsable de la gestión de la Propiedad Industrial en la UPV/EHU, y por saber apreciar el VisualPaper y apoyar la idea. A veces un pequeño empujón puede parecer insignificante, pero cuando la rueda empieza a girar ya no se puede parar.

A todas las personas y asociaciones que han colaborado en la recolección de las muestras para la consecución de este trabajo, en especial a Pedro Castaños, José A. Múgica, Javier Fernández Eraso, Santiago Borragan, Paulino Sánchez ,Chema Fernández y Gontzal Pikaza.

Dicen que los últimos serán los primeros y por ese motivo en último lugar quiero dar las gracias a toda mi familia, para mí las personas más importantes de este mundo. Gracias Aita y Ama, primero por traerme, luego por aguantarme y más tarde por no devolverme, os quiero con locura! Aita, gracias por tu visión del mundo y por enseñarme a pensar y a hacer las cosas de cien maneras diferentes. Ama gracias por ser todo, estar siempre y por confiar infinito en mí. Vero, sé que no es fácil tener un hermano así, pero lo has hecho muy bien, no podría tener una hermana mejor. Un muxu Poli, esto te habría gustado.

# Índice



## Índice

Resumen – Laburpena - Abstract.....	1
1. Introducción.....	9
1.1 Inicio de la relación humano- animal: La domesticación.....	11
1.1.1 Proceso de domesticación animal.....	17
1.2 La continuidad del acervo genético de las razas y las razas autóctonas.....	19
1.2.1. Razas autóctonas del País Vasco de interés en el presente estudio.....	22
1.2.1.1. Terreña.....	23
1.2.1.2. Pirenaica.....	24
1.2.1.3. Latxa.....	26
1.3. Estudio poblacional y filogenético a través del ADN mitocondrial.....	28
1.3.1 La mitocondria y su origen.....	28
1.3.2 ADN mitocondrial.....	29
1.3.3 Replicación y transcripción del ADNmt.....	32
1.3.4 Tasa de mutación.....	34
1.3.5 Herencia materna del ADNmt.....	35
1.3.6. Ausencia de recombinación.....	36
1.3.7 ADNmt y genética de poblaciones.....	37
1.3.7.1 Estudio de los linajes maternos de las especies ganaderas <i>Bos taurus</i> y <i>Ovis aries</i> ..	38
1.3.8 La identificación de especies y el ADNmt.....	41
1.3.9 Importancia y aplicabilidad de la identificación de especies.....	45
2. Hipótesis y objetivos.....	49
2.1 Hipótesis.....	51
2.2 Objetivos.....	53
Objetivos generales.....	53
Objetivos concretos.....	54
3. Materiales y métodos.....	57
3.1 Materiales.....	59

3.1.1 Muestras biológicas.....	59
3.1.1.1 Muestras prehistóricas.....	60
3.1.2 Muestras de poblaciones actuales.....	61
3.1.2.1 Población Bovina.....	61
3.1.2.2. Población Ovina.....	63
3.1.2.3. Grupo multi-especies.....	65
3.2 Métodos.....	68
3.2.1 Tratamiento y análisis molecular de muestras prehistóricas.....	68
3.2.1.1 Particularidades de los laboratorios de trabajo de ADN.....	68
3.2.1.2 Pre-tratamiento de las muestras prehistóricas.....	69
3.2.1.3 Extracción de ADN.....	71
3.2.1.4 Cuantificación espectrofotométrica del ADN.....	74
3.2.1.5 Amplificación por PCR del ADNmt.....	75
3.2.1.6 Geles de agarosa.....	79
3.2.1.7 Purificación de los productos de amplificación.....	81
3.2.1.8 Reacción de PCR de secuenciación; Big Dye Terminator.....	82
3.2.1.9 Purificación de los productos de la reacción BDT.....	84
3.2.1.10 Secuenciación del ADN mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático.....	84
3.2.1.11 Tratamiento informático de las secuencias: Análisis, edición y alineamiento.....	85
3.2.2 Análisis molecular de muestras modernas.....	86
3.2.2.1 Análisis de ADN.....	86
3.2.2.1.1 Extracción de ADN.....	86
3.2.2.1.1.1 Extracción de ADN mediante kits comerciales.....	86
3.2.2.1.1.2 Extracción de ADN por precipitación salina a partir de Sangre.....	88
3.2.2.1.1.3 Extracción de ADN por precipitación salina a partir de Tejido.....	92
3.2.2.1.2 Cuantificación del ADN.....	94
3.2.2.1.2.1 Cuantificación espectrofotométrica.....	95
3.2.2.1.2.2 Cuantificación fluorimétrica.....	95
3.2.2.1.3 Análisis de loci microsatélites (STRs).....	96
3.2.2.1.3.1 Amplificación por PCR de los microsatélites.....	96



3.2.2.1.3.2 Comprobación del producto de amplificado.....	97
3.2.2.1.3.3 Análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático.....	98
3.2.2.1.3.4 Análisis informático de los STRs .....	99
3.2.2.1.4 Análisis de secuencias del ADNmt.....	99
3.2.2.1.4.1 Amplificación por PCR .....	99
3.2.2.1.4.2 Geles de agarosa del producto de amplificado.....	106
3.2.2.1.4.3 Purificación de los productos de amplificación.....	106
3.2.2.1.4.4 Reacción de PCR de secuenciación; Big Dye Terminator. ....	107
3.2.2.1.4.5 Purificación de los productos de la reacción BDT. ....	111
3.2.2.1.4.6 Secuenciación del ADNmt mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático. ....	111
3.2.2.1.4.7 Tratamiento informático de las secuencias: Análisis, edición y alineamiento. ....	111
3.2.2.1.5 Análisis mediante disociación de alta resolución (HRM).....	112
3.2.2.1.5.1 PCR a tiempo real. ....	112
3.2.2.1.5.2 Tratamiento informático de las curvas de disociación.....	114
3.2.2.2 Análisis de ARN.....	114
3.2.2.2.1 Extracción de ARN .....	115
3.2.2.2.2 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN.....	116
3.2.2.2.3 Síntesis de ADNc.....	117
3.2.2.2.4 Cuantificación de ADNc mediante qPCR .....	117
3.2.2.2.5 Tratamiento informático de la expresión génica .....	119
3.2.3 Tratamiento estadístico de las muestras .....	119
3.2.3.1 Análisis estadísticos del ADNmt.....	119
3.2.3.1.1 Parámetros de diversidad.....	119
3.2.3.1.1.1 Diversidad nucleotídica ( $\Pi_n$ ).....	120
3.2.3.1.1.2 Diversidad de secuencias (H).....	121
3.2.3.1.1.3 Diversidades medias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) .....	121
3.2.3.1.2 Análisis de la estructura genética.....	122
3.2.3.1.3 Análisis filogenético.....	123

---

3.2.3.1.4 Poblaciones adicionales.....	124
3.2.3.2 Análisis estadístico de la expresión génica. ....	125
4. Resultados.....	126
4.1 Organización de los resultados.....	128
4.2 Grupo 1: Linajes maternos de bóvidos y óvidos prehistóricos y actuales del País Vasco. ....	130
4.2.1 Estudio 1: “New Q lineage found in bovine ( <i>Bos taurus</i> ) of Iberian Peninsula”. ....	130
4.2.2 Estudio 2: “Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps ( <i>Ovis aries</i> ) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence.” .....	149
4.2.3 Estudio 3: “Determinación de especie y linajes maternos de restos prehistóricos bovinos y ovicaprinos del País Vasco.” .....	170
4.3 Grupo 2: Identificación y screening de especies mediante el desarrollo de una nueva pareja de cebadores universales situados en el gen <i>cyt b</i> .....	195
4.3.1 Estudio 4: “New <i>cyt b</i> gene universal primer set for forensic analysis” .....	195
4.3.2 Estudio 5: “Identification of species in meat food products: a new screening method based on high resolution melting real time PCR of <i>cyt b</i> gene.” .....	225
4.3.3 Estudio 6: “Identification of big game species by a universal cytochrome b primer pair through High-Resolution Melting” .....	243
5. Discusión .....	252
5. Discusión.....	254
5.1 Muestras seleccionadas y criterios de selección.....	255
5.2 Identificación de especies y linajes maternos de individuos de especies ganaderas prehistóricas del País Vasco.....	256
5.3 Linajes maternos de especies ganaderas bovinas autóctonas actuales del País Vasco. ....	259
5.4 Linajes maternos de especies ganaderas ovinas autóctonas actuales del País Vasco. ....	263
5.4.1 Particularidades mitocondriales ovinas. Motivo de repetición en tándem de 75/76pb y su influencia en la expresión génica. ....	265
5.5 Continuidad del acervo genético. Comparación de los linajes maternos de especies ganaderas prehistóricas y actuales del País Vasco. ....	267
5.6 ¿Nueva especie del genero <i>Capra</i> ?.....	268
5.7 Identificación de especies mediante una pareja de cebadores universales del gen <i>cyt b</i> . ...	269

5.7.1 Aplicabilidad de los cebadores universales del gen <i>cyt b</i> al análisis HRM. ....	272
5.7.1.1 Paneles de HRM de especies cárnicas. ....	272
5.7.1.2 Paneles de HRM de especies cinegéticas.....	275
6. Conclusiones – Konklusioak- Conclusions.....	278
7. Bibliografía .....	289
Anexo I - Difusión de resultados .....	312

## Abreviaturas

Acc.: Numero de acceso (del inglés: Accession number)

*ACTB*: Beta actina

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNa: ADN antiguo

ADNn: ADN nuclear

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Suero albumino bovino (del inglés: Bovine Serum Albumine)

CD: Dominio central

CSB: bloques de secuencias conservadas

*COI*: Citocromo c oxidasa subunidad I

*Cyt b*: Citocromo b

D-loop: Bucle de desdoblamiento, bucle D

ESI: Ionización por electroespray (del inglés: Electrospray ionisation)

et al.: Y otros (del latín: et alii)

F:C:I : Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamilico

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés: Food and Agriculture Organization)

*GADPH*: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Ha.: Haplotipo

HRM: Disociación de alta resolución (del inglés: High resolution melting)

ISAG: Sociedad Internacional para la Genética Animal (del inglés: International Society for Animal Genetics)

Ky: Miles de años (del inglés: Kilo years.)

MJ: Median-joining

MALDI: Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (del inglés: Matrix-assisted laser desorption ionisation)

LBKF: Latxa Black Face

LBLF: Latxa Blonde Face

*ND1*: NADH deshidrogenasa subunidad 1

*ND2*: NADH deshidrogenasa subunidad 2

NJ: Neighbor-joining

p: Valor de significación estadística

pb: Par de bases

PBL: Leucocitos de sangre periférica (del inglés: Peripheral blood leukocyte)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase chain reaction)

qPCR o rtPCR: PCR cuantitativa o a tiempo real (del inglés: Quantitative y real time)

rCRS: Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (del inglés: Revised Cambridge Reference Sequence)

TAS: Secuencias extendidas asociadas a la terminación

rpm: Revoluciones por minuto

seg: segundo

*SDHA*: Succinato deshidrogenada subunidad A

UV: Ultravioleta

$\Delta\Delta\Delta\text{Ct}$ : Comparativa del ciclo umbral (del inglés: Comparative threshold cycle)

### **Lista de términos no traducidos.**

Screening: Cribado

Melting: Disociación

Pellet: Sedimento

Vortex: Vórtice



**Lista de Tablas**

**Tabla 1.** Lista de las 14 razas y 9 variedades autóctonas ganaderas vascas recogidas en el decreto 81/2015 del BOPV..... 22

**Tabla 2.** Tabla que muestra las 63 especies incluidas en el presente estudio ordenadas según su clase, orden y familia. .... 65

**Tabla 3.** Listado de cebadores utilizados para la amplificación de las regiones del *cyt b* y la región control en *Bos taurus* y *Ovis aries*..... 76

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para el análisis de la región control de *Bos taurus*. .... 100

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para el análisis del ADNmt completo de *Bos taurus*. .... 101

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para el análisis de las posiciones determinantes en la región control y codificante del Haplogrupo Q de *Bos taurus*. .... 102

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para el análisis de la región control de *Ovis aries*. .... 103

**Tabla 8.** Cebadores universales utilizados para el análisis de 148 pb del gen *cyt b* en 63 especies. 105

**Tabla 9.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar la región control de *Bos taurus*. .... 107

**Tabla 10.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar el ADNmt completo de *Bos taurus*. .... 108

**Tabla 11.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar las posiciones determinantes en la región control y codificante del Haplogrupo Q de *Bos taurus*..... 109

**Tabla 12.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar la región control de *Ovis aries*..... 109

**Tabla 13.** Cebadores de secuenciación utilizados para el análisis parcial del gen *cyt b* en 63 especies. .... 110

**Tabla 14.** Cebadores utilizados para el análisis de HRM del gen *cyt b* en 14 especies cárnicas y cinegéticas. .... 113

**Tabla 15.** Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica de los genes *ND1*, *ND2*, *COI* y *cyt b* y los housekeeping genes *ACTB*, *GADPH* y *SDHA* en *Ovis aries*..... 118

**Tabla 1, Estudio 1.** mtDNA haplotypes of Terreña and Pirenaica breeds. .... 136

**Tabla 2, Estudio 1.** mtDNA haplogroups in Terreña and Pirenaica breeds. .... 137

**Tabla S1, Estudio 1.** Analysed populations..... 147

**Tabla S2, Estudio 1.** Relationship between 3 individual was analysed by autosomal STR profiles. .. 148

**Tabla 1, Estudio 2.** Diversity parameters for Latxa Black Face (LBKF) and Latxa Blonde Face (LBLE), as well as the global diversity parameters for the Latxa breed. .... 157

**Tabla S1, Estudio 2.** Nucleotide sequence of the primers used in the transcription Oa76 with the normal repeat motif..... 169

**Tabla 1, Estudio 3.** Relación de las muestras analizadas en el estudio..... 177

**Tabla 2, Estudio 3.** Cebadores para las diferentes especies y fragmentos a amplificar. .... 181

**Tabla 3, Estudio 3.** Listado de las especies utilizadas de la subfamilia Caprinae para la realización del árbol Neighbor-Joining..... 183

**Tabla 4, Estudio 3.** Relación de polimorfismos y haplogrupos de cada muestra de *Bos taurus*. ..... 185

**Tabla 5, Estudio 3.** Diferencias en la secuencia de bases de la muestra CPL. 17310 con respecto a las secuencias consenso de *Ovis* y *Capra*. ..... 186

**Tabla 1, Estudio 4.** Analyzed species arranged according to their Class, Order, and Family.. ..... 200

**Tabla S1, Estudio 4.** List of the 751 mammal species with the corresponding GenBank accession number for the complete mtDNA reference sequence used for primer desing. .... 214

**Tabla S1, Estudio 5.** Analyzed species arranged according to their Family.. ..... 241

**Tabla S2, Estudio 5.** Melting temperature and level of confidence mean values and standard deviations of eight meat species.. ..... 242

**Tabla 1, Estudio 6.** Species analyzed in this study..... 248



**Lista de Figuras**

**Figura 1.** Principales zonas de domesticación en Oriente próximo de las especies *Capra aegagrus hircus*, *Ovis aries*, *Bos taurus* y *Sus scrofa domestica*. ..... 13

**Figura 2.** Mapa de las regiones aceptadas como núcleos de domesticación divididos en periodos históricos..... 16

**Figura 3.** Individuos de la raza bovina Terreña y de la raza bovina Pirenaica ..... 24

**Figura 4.** Individuos de la raza Latxa de las variedades Latxa de cara negra y Latxa de cara rubia. .... 27

**Figura 5.** Estructura del ADNmt humano y matriz de puntos de las bases del ADNmt de varias especies de mamíferos, aves y peces. .... 31

**Figura 6.** Representación de la organización estructural y la longitud de la región D-loop de varias especies de mamíferos. .... 32

**Figura 7.** Tasa de mutación del genoma mitocondrial en distintas especies..... 35

**Figura 8.** Representación de la dispersión general de los haplogrupos mayoritarios de los linajes maternos de *Bos taurus* y las rutas migratorias desde sus centros de domesticación primitivos. .... 39

**Figura 9.** Distribución general de los haplogrupos mayoritarios de los linajes maternos de *Ovis aries* y distribución de los cinco haplogrupos en la región de Turquía ..... 40

**Figura 10.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las muestras prehistóricas incluidas en este estudio..... 61

**Figura 11.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las ganaderías bovinas incluidas en el presente estudio..... 62

**Figura 12.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las ganaderías ovinas de la raza Latxa incluidas en el presente estudio. .... 64

**Figura 13.** Registro fotográfico inicial y final, tras la limpieza de una de las muestras seleccionadas. 70

**Figura 1, Estudio 1.** Median-joining network of the D-Loop haplotype data in Terreña and Pirenaica breeds. .... 138

**Figura 2, Estudio 1.** Phylogenetic neighbor-joining tree of the population pairwise FSTs between analyzed breeds. .... 139

**Figura 3, Estudio 1.** Median-joining network of the Q haplogroup..... 141

**Figura 1, Estudio 2.** Median-joining network of the mtDNA control region haplotype data of two varieties of Latxa. .... 159

**Figura 2, Estudio 2.** Phylogenetic neighbor-joining tree of the mtDNA control region in the 35 individuals with a fifth 75/76 bp repeat motif..... 160

**Figura 3, Estudio 2.** Relative expression of *COI*, *cytb*, *ND1*, and *ND2* mtDNA genes in the two samples with five repetitions of the 75/76 bp motif and four samples with four repeats. .... 161

**Figura 1, Estudio 3.** Fotografía de la muestra bovina AI.16Z.107.IB3.S/N, tras el proceso de limpiado. .... 179

**Figura 2, Estudio 3.** Árbol filogenético NJ de 36 especies de 11 Géneros de la subfamilia caprinae y de la muestra CPL. 17310..... 187

**Figura 1, Estudio 4.** Alignment results of the sequences from the *cyt b* of 751 mammalian species 204

**Figura 2, Estudio 4.** NJ tree of the species analyzed according to the 148 bp *cyt b* fragment. .... 207

**Figura S1, Estudio 4.** *Cyt b* gene sequences alignment of the 751 mammal species found in GenBank. .... 221

**Figura S2, Estudio 4.** Entire *cyt b* gene NJ tree in the 751 species of mammals found in GenBank. . 222

**Figura S3, Estudio 4.** NJ tree of the species analyzed according to the 358 bp *cyt b* fragment described by Parson et al. (2000). .... 223

**Figura S4, Estudio 4.** NJ tree of the species analyzed according to the 658 bp *COI* fragment described by Hebert et al. (2003). .... 224

**Figura 1, Estudio 5.** Melting profiles of the eight analyzed species.. .... 232

**Figura 2, Estudio 5.** Melting profiles at different DNA concentrations: 30 ng/μμμL, 10 ng/μμμL, 5 ng/μμμL, 1 ng/μμμL, 0.25 ng/μμμL and 0.1 ng/μμL. .... 233

**Figura 3, Estudio 5.** Melting profiles of: A) The four mammalian species used in the mixtures tests and the five mixtures analyzed. B) The four species analyzed in the analysis of mixtures. .... 234

**Figura 4, Estudio 5.** Melting curves of different mixtures that indicate the percentage of each species for each of the mixtures..... 235

**Figura 1, Estudio 6.** Genotyping of *cyt b* gene by Precision Melt Analysis Software. .... 250

**Resumen**

**Laburpena**

**Abstract**



## Resumen

El ADN mitocondrial (ADNmt) es un marcador molecular de gran interés en áreas como la genética forense, la ecología o la seguridad alimentaria. La longitud e información del ADNmt es muy reducida en comparación con el ADN nuclear, pero eso no implica una ausencia de importancia biológica, ya que contiene información esencial con un interés especial para la asignación de linajes maternos y la determinación de especies, entre otros.

El presente trabajo se ha centrado en el análisis de dos regiones del ADNmt en diferentes especies animales; la región control, para el análisis de los linajes maternos de individuos de las especies *Bos taurus* y *Ovis aries* autóctonos del País Vasco, tanto en épocas prehistóricas como actuales, y la región del gen citocromo b (*cyt b*), utilizada para la identificación de especies de animales vertebrados y artrópodos.

Los linajes maternos tanto bovinos como ovinos han sido ampliamente estudiados en Europa. La separación, geográfica y cultural de las especies ganaderas autóctonas del País Vasco en el marco de la Península Ibérica, ha motivado la hipótesis de una particularidad genética de estas razas. No obstante, en la actualidad existen muy pocos estudios genéticos sobre las razas bovinas Terreña y Pirenaica y de óvidos de raza Latxa. Con el objetivo de profundizar en el estudio del acervo genético mitocondrial de las mencionadas razas autóctonas, se ha estudiado la región control de 155 bóvidos de las razas Terreña y Pirenaica y 174 óvidos de raza Latxa. Los resultados de los linajes de estas razas autóctonas vascas indican la predominancia del haplogrupo T3 en el caso de las vacas y del haplogrupo B en el caso de las ovejas, mostrando cierta similitud con el acervo genético descrito para las mismas especies en otras regiones de Europa. Sin embargo, se ha podido observar la particularidad de la cabaña autóctona del País Vasco al hallarse singularidades genéticas destacables. En el caso de las vacas se encontraron tres individuos pertenecientes al haplogrupo Q, extremadamente raro y hasta el momento únicamente presente en vacas italianas y egipcias. En el caso de las ovejas se encontraron dos animales con un motivo de repetición en tándem extra de 75/76 pb en la región control ETAS1 del ADNmt, otra particularidad extremadamente rara, ya que solo se han encontrado otros 33 animales con esta característica en el mundo y ninguno de ellos habita en el oeste de Europa.

Las razas autóctonas del País Vasco posiblemente son descendientes directos de los primeros animales domesticados introducidos en la Península durante el proceso de neolitización y por tanto probablemente adaptadas al medio en el que habitan desde hace miles de años. El estudio del acervo genético de 14 animales prehistóricos y su comparación con 329 animales actuales (155 bóvidos y 174 óvidos) ha permitido determinar la existencia de continuidad genética entre los animales prehistóricos y los actuales de la región del País Vasco.

Por otro lado, la identificación genética de especies es de gran interés principalmente en el campo de la genética forense y la seguridad y calidad alimentaria. El gen mitocondrial *cyt b* es uno de los genes más estudiados con fines identificativos, junto con los también genes mitocondriales citocromo c oxidasa subunidad 1 (*COI*), *12s RNA* y *16s RNA*. Pero el *cyt b* es sin duda el marcador más utilizado en el campo de la genética forense debido a que proporciona una reconstrucción muy exacta de la filogenia.

El método más común para la identificación genética de especies consiste en utilizar cebadores universales de genes especie-específicos que permiten la amplificación mediante PCR del ADN de un gran número de especies. Los cebadores universales más ampliamente utilizados hasta la fecha tienen la limitación de que los fragmentos que amplifican son muy largos y por ello, no resulta posible amplificar adecuadamente los fragmentos de ADN altamente degradados que son frecuentemente hallados en muestras forenses. Por lo que en el presente estudio se ha diseñado y comprobado experimentalmente una pareja de cebadores universales capaces de amplificar una región de 148 pb del gen *cyt b* en 63 especies pertenecientes a 38 Familias de 14 Ordenes y 5 Clases diferentes. Este mismo par de cebadores también han sido utilizados para crear una aplicación de cribado (en adelante *screening*), mediante la metodología de disociación de alta resolución (HRM), capaz de identificar especies animales cárnicas y cinegéticas mediante diferentes paneles de disociación.

## Laburpena

DNA mitokondrialia (DNAMt) interes handiko markadore molekularra da genetika forentsean, ekologian edo elikadura segurtasunean; DNAMt-a duen luzera eta informazio kopurua oso murriztua da DNA nuklearrarekin alderatuta, baina hori ez du adierazi nahi garrantzi biologikoa falta zaionik, beste batzuen artean, ama-leinuak eta espezieak zehazteko funtsezko informazioa baitu.

Lan hau arreta jarri du animalia ezberdinetako DNAMt-aren bi erregio ezberdinetan; alde batetik, kontrol erregioa edo D-loop-a, Euskadiko *Bos taurus* eta *Ovis aries* animalia autoktonoetan ama-leinuak analizatzeko erabilia izan da, bai prehistoria aurreko zein gaur egungo animalietan; eta bestetik zitokromo b (*cyt b*) genearen erregioa, ornodun eta artropodo animalien espezieak desberdintzeko erabilia izan da.

Bobidoen eta obidoen ama-leinuak zabalki aztertuak izan dira Europa esparruan. Euskadiko abeltzaintza espezie autoktonoak, Iberiar Penintsularen animaliekiko daukaten banantze geografiko eta kulturala dela eta, arraza hauen berezitasun genetikoaren hipotesia motibatu du. Hala ere, gaur egun gutxi dira Terreña eta Pirenaika arraza bobidoei eta Latxa arraza obidoei buruz egindako ikerketa genetikoak.

Aurretik aipatutako arraza autoktonoen ondare genetiko mitokondrialearen ikerketan sakontzeko, 155 Terreña eta Pirenaika arrazako eta 174 Latxa arrazako animalien kontrol erregioa aztertu da. Arraza autoktonoetako ama-leinuen inguruan lortutako emaitzetan, T3 haplotaldearen nagusitasuna nabaria izan da behien artean eta B haplotaldea ardiaren artean, Europako beste herrialdeetan aurkitutako ama-leinuekin erabateko berdintasunak azalduz. Hala ere, berezitasunak topatu dira Euskal animalia autoktonoen artean dauden ezberdintasun genetikoaren ondorioz. Behien artean hiru banako aurkitu dira Q haplotaldearen barruan, oso haplotalde bitxia eta orain arte soilik deskribatuta Italia eta Egiptoko behietan. Ardiaren kasuan, bi animalia topatu dira aparteko 75/76 pb tandem errepikapen batekin DNAMt-eko ETAS1 erregioan, oso ezaugarri berezia, orain arte soilik munduko beste 33 animalietan aurkitu baita, eta horietako bat ere ez mendebaldeko Europan.

Euskal arraza autoktonoak, neolitiko garaian Iberiar penintsulan sartu ziren lehen hesitutako abereen ondorengo zuzenak izan daiteke eta beraz, milaka urteetan zehar bizi diren lurraldeari ondo egokituak daude. Historiaurreko 14 animalien eta gaur egungo 329 animalien (155 bobido eta 174 obido) ama-leinuen ikerketari esker, jarraitasun genetikoa ikus daiteke Euskadiko historiaurreko eta gaur egungo animalien artean.

Bestalde, espezien identifikazio genetikoa garrantzi handia du genetika forentsean edota elikadura segurtasun eta kalitate arloan. *Cyt b* gene mitokondrial identifikazio arloan gehien ikertuetako bat izan da, zitokromo c oxidasa I azpi-unitatea (*COI*), *12s RNA* eta *16s RNA* geneekin batera. Baina *cyt b* genea erabili da genetika forentsearen arloan, filogeniaren identifikazio oso zehatza ematen duelako.

Espezieak genetikoki identifikatzeko erarik erabili gene espezie-espezifikoen primer unibertsalak erabiltzea da, espezie askoren DNA-aren amplifikazioa PCR-ren bidez ahalbidetzen baitu. Gaur egun arte gehien erabiltzen diren primer unibertsalen muga, amplifikatu tamaina oso handiak sortzen dituztela da eta beraz, ezingo daitezke zuzen amplifikatu orokorrean DNA-a degradatuta duten lagin forentsetan. Horregatik, lan honen bitartez *cyt b*-aren 148 pb-ko ADN zatia amplifikatzen duen primer unibertsal bat diseinatu eta esperimentalki frogatu da 38 Falimietako, 14 Ordeneko eta 5 Klase desberdineko 63 abere espezie ezberdinetan. Primer bikote hau bahetzeko (aurrerantzean *screening*) aplikazio bat egiteko ere erabili da erresoluzio altuko disoziazioaren (HRM) bitartez, eta haragi espezieak eta espezie zinegetikoak ezberdintzeko gai da disoziazio taula ezberdinei esker.



## Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a molecular marker of great interest in areas including Forensic Genetics, Ecology and Food Safety. The length and information of the mtDNA is very limited compared to nuclear DNA, but that does not mean an absence of biological significance, as it contains essential information with special relevance for the allocation of maternal lineages and determination of species, among others.

This work has focused on the analysis of two mtDNA regions in different animal species; the control region or D-loop, used for the analysis of maternal lineages of native Basque individuals of *Bos taurus* and *Ovis aries* in both prehistoric and present samples, and the region of the cytochrome b gene (*cyt b*), used for species identification of vertebrate and arthropods animals.

Cattle and sheep maternal lineages have been extensively studied in Europe. The geographical and cultural separation of native livestock species in the Basque Country within breeds of the Iberian Peninsula, has led to the hypothesis of a genetic peculiarity of these races. However, there are currently very few genetic studies on Terreña and Pirenaica cattle breeds and Latxa ovine breed. In order to deepen the study of the mitochondrial gene pool of mentioned native Basque breeds, the control region of 155 Terreña and Pirenaica bovine individuals and 174 Latxa ovine individuals have been studied. The results of the lineages of these Basque native breeds indicate the predominance of the T3 haplogroup in the case of cattle and B haplogroup in the case of sheep, showing certain similarity to the gene pool described for the same species in other regions of Europe. However, it has been observed the peculiarity of native Basque cattle and remarkable genetic singularities were found. In the case of cattle, three individuals belonging to Q haplogroup were found, an extremely rare haplogroup and so far only present in Italian and Egyptian cattle. In the case of sheep, two animals present an extra 75/76 bp tandem repeat motif in the mtDNA ETAS1region, another extremely rare particularity, as only 33 other animals have been found with this characteristic in the world and none of them inhabits in Western Europe.

Indigenous Basque breeds are possibly direct descendants of the first domesticated animals brought into the Peninsula during the Neolithic and, therefore, probably adapted to the environment in

which they have been living for thousands of years. The study of the gene pool of 14 prehistoric animals and their comparison with current 329 native Basque animals (155 cattle and 174 sheep) has allowed to determine the existence of genetic continuity between prehistoric and present-day animals in the region of the Basque Country.

On the other hand, the genetic identification of species has a great interest in fields such as Forensic Genetics and food safety and quality. *Cyt b* mitochondrial gene is one of the most studied genes for identification purposes, along with cytochrome c oxidase subunit 1 (*COI*), *12s RNA* and *16s RNA* mitochondrial genes. However, the *cyt b* is undoubtedly the most widely used marker in Forensic Genetics, because it provides a very accurate reconstruction of the phylogeny.

The most common method for the genetic species identification is to use universal species-specific primers, which allow PCR amplification of DNA from a large number of species. The most widely used universal primers to date have the limitation that the amplified fragments are very long and, therefore, are not adequate to amplify DNA fragments in forensic samples, which are frequently highly degraded. For this reason, in the present study it has been designed and experimentally tested a pair of universal primers able to amplify a 148 bp region of *cyt b* gene in 63 species belonging to 38 Families of 14 Orders and 5 different Classes. This same pair of primers has also been used to create a screening application, using the methodology of High Resolution Melting (HRM), in order to identify meat species and big game species by different melting panels.

# 1. Introducción



### **1.1 Inicio de la relación humano- animal: La domesticación**

El paso de una sociedad nómada a una sociedad sedentaria trajo grandes cambios para el ser humano. La estabilización de la climatología (Preston et al., 2012) y el desarrollo de la agricultura y la ganadería a partir de la domesticación vegetal y animal en el Cercano Oriente hace aproximadamente 11.000 años, en el área conocida como el "Creciente Fértil", que abarco las cuencas del Tigris y el Éufrates situadas entre el Mar Mediterráneo y el Golfo Pérsico, hizo que cambiasen las pautas sociales hacia asentamientos estables. Este proceso se produjo debido a un proceso de intensificación de las relaciones entre humanos y animales y no únicamente como consecuencia de afinidades ecológicas de los animales con los ecosistemas modificados por el hombre (Pascal et al., 2006).

El asentamiento físico aportó grandes beneficios al pasar de una economía de recolección a una economía de producción voluntaria y pronto aumentó el número de poblaciones sedentarias dependientes de la agricultura y la ganadería. No obstante, el paso a una sociedad sedentaria y la domesticación de las especies animales y vegetales fue un largo proceso que ocurrió escalonadamente a lo largo de miles de años.

No todas las especies son domesticables y para entender este proceso de domesticación es necesario conocer no solo las características de las sociedades que tomaron parte en ella, sino también las características de los animales que participaron en el proceso (Budiansky, 1992, Clutton-Brock, 1999, Diamond, 1999). Las especies deben tener seis cualidades esenciales que permitan un paso óptimo a la cría y domesticación descritas por Galton en 1865 y más recientemente por Diamont en 1999. Primero, deben soportar la separación materna antes del destete y deben adaptarse a situaciones nuevas de alimentación, entorno y condiciones ambientales. Segundo, deben tener una afinidad innata hacia el humano, siendo animales sociales cuyos patrones de comportamiento se basen en la dominancia jerárquica y acepten al ser humano como líder, manteniendo dicha actitud en su vida adulta. Tercero, tienen que ser amantes de la comodidad; estos animales deben encontrarse de manera confortable alimentándose y viviendo en espacios reducidos. Cuarto, deben ser útiles para las poblaciones salvajes; las especies domesticadas tenían la función de ser una fuente de alimento de fácil conservación. Quinto, se deben poder criar fácilmente

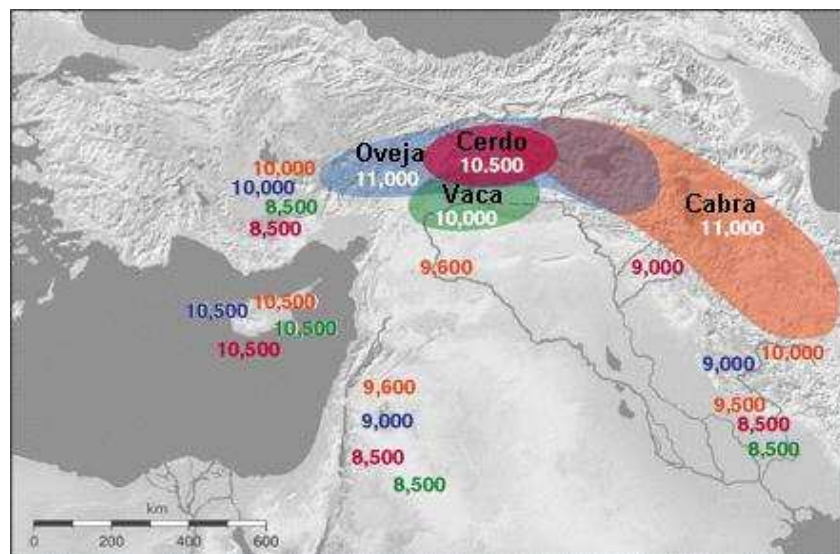
con tasas de crecimiento rápidas. Este podría ser el paso más importante a la hora de una domesticación exitosa, ya que incluso en condiciones óptimas la cría de nuevas colonias de animales puede ser complicada. Sexto, los animales deben ser fáciles de mantener y cuidar. Este factor se aplica mayoritariamente a especies ganaderas ya que es importante que un rebaño pueda ser controlado mediante un pastor.

A excepción del perro (*Canis lupus familiaris*) cuya domesticación a partir del lobo (*Canis lupus*) fue temprana, hace 14.000-12.000 años (Clutton-Brock, 1995), cifra que algunos autores retrasan hasta los 33.000 años (Axelsson et al., 2013, Wayne et al., 2012), las especies ganaderas domésticas más comunes en la actualidad, cabra (*Capra aegagrus hircus*), oveja (*Ovis aries*), vaca (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa domestica*) fueron domesticadas en Oriente Medio hace aproximadamente 10.000 años (Figura 1) (Zeder et al., 2008). Cabe destacar que existen discrepancias entre autores, que provocan amplios rangos temporales para la domesticación de cada una de las especies.

La primera especie ganadera domesticada fue la cabra a partir de una especie salvaje de *Capra aegragus* en la actual zona de Irán. Esta especie fue explotada antes su domesticación, desde hace aproximadamente 12.000 años, y aunque se domesticó en torno a hace 10.000 años, no se produjo un cambio fenotípico hasta hace 9.750-8.000 años (Legge, 1996, Arbuckle et al., 2009, Conolly et al., 2011, Hongo et al., 2005, Vigne et al., 2011).

Posteriormente, con tiempos de domesticación muy similares se domesticó en la misma zona a la oveja (*Ovis aries*). Esta especie tiene la capacidad de poderse cruzar con muflones, uriales y argalis, hecho que ha supuesto una complicación adicional a la hora de estudiar su origen (Guo et al., 2005). La oveja se empezó a explotar de forma ganadera hace aproximadamente 12.000 años en el actual Irak, a partir de individuos de los tres grupos principales de oveja salvaje del continente Euroasiático, el muflón tanto asiático (*Ovis orientalis*) como europeo (*Ovis musimon*), el urial (*Ovis vignei*) y la argalí (*Ovis ammon*), los cuales se han propuesto como antepasados de la ovejas domésticas y se cree que han contribuido a razas específicas (Hiendleder et al., 2002), debido a que algunas especies actuales aún conservan particularidades genéticas de estas especies que les precedieron. Las diferencias genéticas de las especies ovinas se deben en gran parte a la variación en su número de cromosomas, ya que las especies que provienen de *Ovis aries*; *Ovis musimon* y *Ovis orientalis* tienen

54 cromosomas al igual que *Ovis aries*, mientras que *Ovis amon* y *Ovis vignei* tienen 56 y 58 cromosomas respectivamente (Nadler et al., 1973a). Pero a pesar de las diferencias en el número de cromosomas, las diferentes especies del género *Ovis* pueden hibridar en cautiverio (Vorontsov et al., 1972, Nadler et al., 1971; 1973b) y en hábitats naturales donde las diferentes especies se superponen (Valdez et al., 1978). La domesticación real de las ovejas no se produjo hasta aproximadamente 2.000 años después del inicio de su explotación, mientras que el cambio fenotípico por la domesticación no se dio hasta hace aproximadamente 9.750-8.000 años (Legge, 1996, Arbuckle et al., 2009, Conolly et al., 2011, Hongo et al., 2005 y Vigne et al., 2011).



**Figura 1.** Principales zonas de domesticación en Oriente próximo de las especies *Capra aegagrus hircus*, *Ovis aries*, *Bos taurus* y *Sus scrofa domestica*. También se indica una aproximación temporal para cada especie en cada zona. (Figura modificada de Zeder et al., 2008).

Menos de 1.000 años después de comenzar con las explotaciones animales anteriores a la domesticación de las cabras y ovejas, aproximadamente hace 11.500 años, comenzó el proceso de explotación de las vacas. El origen de las vacas proviene de la especie conocida como Uro (*Bos primigenius*), extinto su último ejemplar en 1627 en la actual Polonia (Van Vuure, 2002). El manejo y la predomesticación de la vaca se produjo hace unos 10.500 años, y el cambio definitivo hacia la domesticación fue hace aproximadamente 10.250-8.000 años (Conolly et al., 2011, Helmer et al., 2005 y 2008, Vigne et al., 2011, Hongo et al., 2009 y Arbuckle 2013). El periodo entre la explotación anterior a la domesticación y la propia domesticación fue de tan solo unos 1.000 años, mucho más

rápido que otras especies domesticadas en la zona, siendo de 2.250 años en el caso de la cabra y la oveja. Este rápido proceso de domesticación se debe en gran parte al elevado número de usos que tenían los productos derivados de la vaca, al tratarse del animal con mayor rango de recursos alimentarios que permitía aprovechar de forma directa la mayor parte del animal, así como obtener gran cantidad de productos elaborados de forma secundaria a partir de zonas no aptas para el consumo, como cuernos, huesos, pezuñas, pieles e incluso las heces utilizadas como combustible y material de construcción (Clutton-Brock, 1999).

Con tiempos de domesticación muy similares a los observados en la vaca, tuvo lugar la domesticación del cerdo (*Sus scrofa domestica*) que surgió a partir del jabalí (*Sus scrofa*). La explotación ganadera anterior a la domesticación se desarrolló muy tempranamente, hace aproximadamente 12.000 años, anterior a lo descrito en vacas y más acorde con las fechas de domesticación de ovejas y cabras. El posterior manejo y predomesticación se efectuó desde hace 11.500 hasta hace 9.750 años y el cambio en la domesticación se acabó hace 9.000 años, siendo la primera de las cuatro especies mayoritarias domesticadas en Oriente Próximo en terminar su proceso de cambio fenotípico a partir de la domesticación (Conolly et al., 2011, Helmer et al., 2008., Vigne et al., 2011 y Arbuckle, 2013). Cabe destacar que el cerdo que en la actualidad es uno de los animales con mayor número de usos alimentarios, en aquella época no fue una carne tan apreciada en Oriente Próximo y Este de Europa, en comparación con otras carnes como la cabra mucho más demandada (Clutton-Brock, 1999).

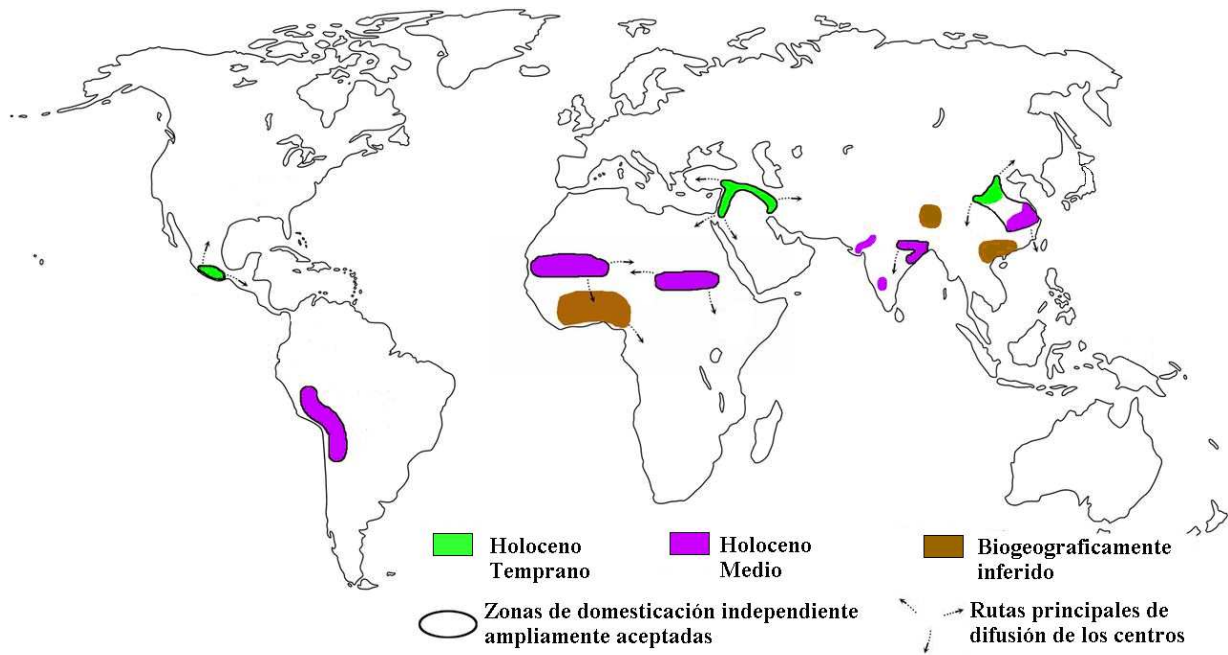
Aunque el Cercano Oriente fue la cuna de la domesticación de la mayoría de las especies ganaderas más comunes de hoy en día, hay un gran número de focos de domesticación animal y domesticaciones secundarias a lo largo de todos los continentes, a excepción de Oceanía, en diferentes periodos temporales (Larson et al., 2014) (Figura 2).

Históricamente, Asia ha sido un centro de domesticación de gran importancia. En este continente se han dado domesticaciones secundarias de gran importancia como la de la vaca (*Bos taurus*) o Cebú (*Bos indicus*) a partir de bóvidos salvajes de la zona sur de Asia, o la del cerdo a partir de jabalíes salvajes autóctonos de la zona de China y Sudeste Asiático que han creado especies asiáticas



diferenciadas como el *Sus barbatus*. A nivel de domesticación se pueden clasificar dos subzonas diferenciadas en el continente Asiático: Sur y Sudeste Asiático.

El Sur de Asia ha sido cuna de la domesticación del cebú (*Bos indicus*) y del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) hace 9.000 y 6.000 años respectivamente (Meadows, 1993, Patel et al., 1998). Asimismo, el Sudeste Asiático junto con Oriente Medio ha sido la cuna de algunas de las especies ganaderas y comerciales más extendidas hoy en día, como son el cerdo (*sus scrofa pot- bellied*), caballo (*Equus ferus caballus*), yak (*Bos grunniens*), camello (*Camelos dromedarius*), pato (*Anas platyrhynchos*), pollo (*Gallus gallus*) y gusano de seda (*Bómbix mori*). Estos procesos de domesticación tuvieron lugar en tres rangos temporales diferenciados. El rango más antiguo corresponde al cerdo, que al igual que en Oriente medio se comenzó a explotar antes de la domesticación, hace 12.000 años. No obstante, su cambio fenotípico debido a la domesticación no terminó hasta hace 6.000 años (Cucchi et al., 2011, Flad et al., 2007), 3.000 años más tarde que en Oriente Medio. El rango temporal intermedio en el que se incluyen la mayoría de los animales domesticados en Asia se sitúa entre los 4.000 y 5.500 años de antigüedad, como es el caso del yak (Meyer, 2009), el caballo (Benecke et al., 2003, Ludwig et al., 2009, Anthony, 2010), el camello (Olsen, 1988, Meadow et al., 2002), el pato (Luff, 2000, Museum, 1979), el pollo (Fuller, 2006, Deng et al., 2014) y el gusano de seda (Fuller, 2010, Good, 2011). Este último es el único animal de los mencionados hasta ahora sin un uso alimentario, pero que se procedió a su domesticación debido al elevado valor económico de su producción de seda.



**Figura 2.** Mapa de las regiones aceptadas como núcleos de domesticación divididos en dos periodos históricos (Larson et al., 2014): Holoceno temprano (12.000-8.200 B.P.) señalado en color verde y Holoceno medio (8.200-4.200 B.P.) en color morado. Las zonas marrones son regiones en las que se interpreta la evidencia de la domesticación debido a la presencia de las formas domésticas fuera de sus distribuciones originales. Las regiones con un contorno negro indican zonas de domesticación independiente ampliamente aceptadas (Figura modificada de Larson et al., 2014).

En los continentes africano y americano también han ocurrido múltiples casos de domesticación de especies animales, y como en las domesticaciones asiáticas, en algunos casos han sido procesos de domesticación secundarios. África ha sido cuna de la domesticación de especies como la vaca (*Bos africanus*), el burro (*Equus asnius*) y el dromedario (*Camelus dromedarius*). En el caso de la vaca el proceso de predomesticación se inició hace 9.000 años, siendo éste el proceso de domesticación más antiguo del continente africano, aun cuando el cambio de la domesticación no se dio hasta hace aproximadamente 7.500 años (Gautier, 2002, MacDonald, 2000). El burro y dromedario tuvieron fechas de cambio por la domesticación similares, situándose entre 3.000 y 5.000 años respectivamente (Rossel et al., 2008, Peters, 1997, Uerpmann et al., 2002). En el caso de la vaca es un suceso de domesticación secundario e independiente del ocurrido en Oriente Medio como ya sucedió en el caso del cerdo asiático. Por su parte, el continente Americano ha sido cuna de especies domésticas como el pavo en Centroamérica hace solo 2.000 años (Thornton et al., 2012), mientras que la llama (*Lama glama*), alpaca (*Vicugna pacos*), cerdo de guinea (*Cavia procellus*) y el pato

Moscovy (*Cairina moschata*) se domesticaron en América del Sur. Todas las domesticaciones que se llevaron a cabo en Sudamérica fueron en un rango temporal muy estrecho, situándose todos los procesos de cambio por domesticación en el rango de los 4.000-6.000 años (Mengoni Goñalons et al., 2006, Goñalons, 2008, Stahl, 2006 y 2008).

Europa no ha sido un centro de domesticación primario, pero sí que se han desarrollado procesos de domesticación significativos, como el primero acaecido en la historia humana, el del perro (*Canis lupus familiaris*) a partir del lobo (*Canis lupus*), hace entre 12.000-33.000 años (Clutton-Brock, 1995, Axelsson et al., 2013, Wayne et al., 2012). Estos indicios de domesticación canina fueron descubiertos gracias a restos antiguos como los hallados por Nobis et al., (1979) y Musil et al., (1984) en Centro Europa.

### **1.1.1 Proceso de domesticación animal**

La domesticación animal fue descrita por Price en 1984 como un proceso mediante el cual una población animal se adapta al hombre y a una situación de cautividad a través de una serie de modificaciones genéticas que suceden en el curso de generaciones y a través de una serie de procesos de adaptación producidos por el ambiente y repetidos durante generaciones. Este proceso de domesticación llevado a cabo por el ser humano es posible con casi todas las especies de mamíferos existentes, aunque también es común en especies de diferentes clases animales como aves o reptiles entre otros.

Este proceso de domesticación animal conlleva largos periodos de tiempo e incluye numerosas generaciones, por lo que Zeuner, en 1963, describió este proceso dividiéndolo en cinco etapas diferentes, a las que posteriormente Hart en 1985 añadió una sexta etapa.

En la primera etapa, la unión hombre-animal es muy débil y los cruces de las formas mantenidas en cautividad con las formas salvajes originarias son frecuentes. El control obtenido sobre el animal por parte del humano es muy reducido.

En la segunda etapa, el hombre empieza a controlar la reproducción de los animales y empieza a seleccionar los individuos más pequeños y manejables para reducir sus dimensiones y aumentar las características de docilidad. Es importante evitar en esta segunda fase el cruce con las formas salvajes para fijar las características deseadas y mantenerlas a lo largo del tiempo.

En la tercera etapa se trabaja para volver a cruzar las formas domésticas, más pequeñas, con las formas salvajes, más grandes, ya que el hombre comienza a demostrar un interés creciente hacia la producción de carne, y se da cuenta de la utilidad que supone el aumento de las dimensiones de los animales de cría. Este paso pone atención en mantener las características de docilidad previamente seleccionadas.

La cuarta etapa, muestra el creciente interés de los humanos por los productos de origen animal, que unido a la capacidad del hombre para controlar a los animales de producción, conduce a la creación de razas especializadas con diferentes aptitudes productivas. Estas razas, mediante un largo trabajo de selección, garantizan un aumento en la producción de carne, lana, leche, etc.

En la quinta etapa, resulta absolutamente necesario evitar los acoplamientos de la forma salvaje con las razas domésticas especializadas para no perder atributos interesantes en la raza domesticada. Esto lleva nada menos que a la extinción de las formas salvajes o su asimilación dentro de las formas domésticas.

La sexta etapa es en la que estamos actualmente según Hart (1985), donde las características comportamentales y genéticas de los animales de producción se han visto modificadas de tal forma que las especies domesticadas han perdido la capacidad de sobrevivir y de reproducirse sin la intervención del hombre.

Si bien es cierto que los animales domésticos han perdido muchas de las características que les posibilitan adaptarse a la vida en la naturaleza, también es cierto que algunas de estas

características pueden ser readquiridas, tanto tras un proceso de readaptación a la vida salvaje, como tras una serie de procesos de cruzamiento con la forma salvaje.

### **1.2 La continuidad del acervo genético de las razas y las razas autóctonas**

Las especies importadas durante la Neolitización a lo largo de Europa se fueron cruzando con los individuos de especies salvajes autóctonas que habitaban en cada zona, dando origen a multitud de razas nuevas (Diamond, 2002, Götherström et al., 2005, Tresset et al., 2007). Esta hibridación se dio gracias a un reducido número de animales que llegó a través de las migraciones, pero que dio paso a una población autóctona genéticamente más divergente (Currant et al., 2008). Este proceso no solo ayudó a incrementar el número de cabezas de ganado más rápidamente, sino que también hizo que los individuos nacidos de esta hibridación adquiriesen características de las razas salvajes, más rudas y adaptadas al medio que habitaban. En cada zona de Europa este proceso fue diferente, dependiendo de las posibilidades de cruce existentes con animales salvajes, obteniendo razas con fenotipos muy característicos para las mismas especies (Ajmone-Marsan et al., 2010).

La adaptación adquirida a lo largo de los siglos habitando el mismo ecosistema y la reducida movilidad de los seres humanos, a excepción de comerciantes ganaderos y rebaños trashumantes, ha hecho que muchas de estas razas que han habitado en la misma región durante milenios, hayan formado las razas autóctonas de la región en la que habitan (Fernández, 2002).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) describe las razas autóctonas como razas nativas y procedentes de una región geográfica particular, adaptadas y utilizadas en ella. Estas razas constituyen el subgrupo de las razas adaptadas localmente, debido a que han estado en un país concreto durante un tiempo suficiente para adaptarse genéticamente a uno o más sistemas de producción tradicionales o entornos del país (FAO: <http://www.fao.org/docrep/004/y1100m/y1100m09.htm>).

Las razas autóctonas están bien adaptadas al entorno en el que habitan, pero los crecimientos demográficos y la elevada demanda de productos cárnicos hizo que se buscasen razas con mayores niveles de producción. Esto conllevó un segundo movimiento migratorio de especies ganaderas, esta

vez basado únicamente en la producción. Las razas traídas desde una zona distinta se las conoce como especies exóticas y pueden clasificarse en dos grupos. El primero son las introducidas recientemente, que comprenden razas introducidas hace menos de cinco generaciones y que se importaron durante un periodo de tiempo relativamente corto. El segundo son las razas importadas continuamente, estas razas son las utilizadas en los sistemas de producción intensiva o comercializadas, ya que en muchos casos es necesario ampliar y renovar el acervo genético local a partir de fuentes externas.

Por este motivo y para evitar la pérdida de un mayor número de razas autóctonas la FAO desarrolló la Estrategia Global para los Recursos Genéticos de Animales de Granja, encaminada a la conservación y utilización sostenible de los recursos genéticos de interés agroalimentario, canalizada a través de diversos acuerdos Convenio sobre la Diversidad Biológica de Río de Janeiro, de 5 de junio de 1992 y ratificado por España el 6 de noviembre de 1993. Asimismo en 1993 la FAO presentó la primera edición de la “Word Watch List for Domestic Animal Diversity” (Loftus y Scherf, 1993), actualizada en los años 1995 y 2000 (Scherf, 1995, Scherf, 2000), en la que aparecen catalogadas como razas autóctonas por primera vez las siguientes razas vascas: Asno de las Encartaciones (*Equus asnius*), Pottoka (*Equus ferus caballus*), Betizu (*Bos taurus*), Monchina (*Bos taurus*), Terreña (*Bos taurus*), Pirenaica (*Bos taurus*), Latxa (*Ovis aries*), Sasi ardi (*Ovis aries*), Carranzana (*Ovis aries*), y Euskal oiloa (*Gallus gallus domesticus*).

A raíz de estos acuerdos, la Unión Europea asentó las bases para orientar las líneas de trabajo en el mantenimiento de las razas autóctonas, y al tiempo crear una legislación comunitaria para garantizar el libre comercio de los animales de raza y la conservación del acervo genético. Mediante esta legislación también se han armonizado los criterios para el reconocimiento de las asociaciones de criadores, la inscripción de reproductores de raza en los libros genealógicos y las pautas para el control de rendimiento y evaluación del valor genético de las diferentes especies.

La Península Ibérica, y España en particular, es cuna de multitud de especies autóctonas, contando hasta 134 razas pertenecientes a especies de vacas, ovejas, cabras, cerdos, caballos y asnos dentro de la clase de los mamíferos y gallinas, ocas y gansos dentro de la clase de las aves. La catalogación y la protección de las razas autóctonas comenzó en España en 1998 con la Estrategia Española de

Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica. La primera indexación oficial de las razas se produjo mediante el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España que contiene la relación oficial y la clasificación de todas las razas y variedades ganaderas autóctonas reconocidas en España como de interés económico, productivo o social, que se recogen en el anexo I del Real Decreto 2129/2008 (<https://www.boe.es/boe/dias/2009/01/27/pdfs/BOE-A-2009-1312.pdf>). Estas razas ganaderas están clasificadas en dos categorías: razas autóctonas de fomento, que son aquellas que por su censo y organización se encuentran en expansión y que únicamente representan el 18% de las razas (27), y las razas en peligro de extinción que son aquellas que se encuentran en grave regresión o en proceso de desaparición y que de acuerdo con los criterios nacionales o internacionales representan el 82% restante (122). Las razas del primer grupo se suelen caracterizar por una producción ganadera rentable por lo se han conservado adecuadamente ante el influjo de razas foráneas (alóctonas), más rentables debido a niveles de producción muy elevados. En el segundo grupo se suelen encontrar razas con un interés comercial bajo, debido su calidad cárnica, baja productividad o costes derivados elevados, que ha hecho que durante años se hayan mantenido únicamente por motivos culturales o conservacionistas.

El País Vasco es hábitat de 14 razas y 9 variedades ganaderas de las 134 razas autóctonas previamente descritas a nivel estatal (10%) (Tabla 1). Aunque la presencia de estas razas en el territorio vasco se remonta a siglos atrás, la asignación y catalogación moderna de las razas autóctonas vascas es relativamente reciente. Hasta 1988 no había ningún reconocimiento oficial para las razas autóctonas en el País Vasco, año en el que se aprueba la reglamentación específica del libro genealógico de la raza bovina Pirenaica. Posteriormente en el año 1990 se aprobó la reglamentación específica para los libros de familia de las razas Latxa y Carranzana (Gomez, 1997). En el año 2001 se crea la primera normativa específica mediante el decreto 373/2001 del BOPV que cataloga la totalidad de las razas autóctonas vascas mediante el Catálogo de Razas Autóctonas Vascas (<https://www.euskadi.eus/bopv2/datos/2002/01/0200429a.pdf>). Este catálogo ha sido actualizado en el año 2015 mediante el decreto 81/2015 del BOPV (<https://www.euskadi.eus/bopv2/datos/2015/06/1502621a.pdf>) sobre la conservación, mejora y fomento de las razas autóctonas vascas, y sobre la regulación de las entidades de fomento de las razas animales.

### 1.2.1. Razas autóctonas del País Vasco de interés en el presente estudio.

En el presente estudio se han analizado muestras de las razas autóctonas vascas bovinas y ovinas más representativas y numerosas. Por parte de los bóvidos, las dos razas analizadas son Pirenaica y Terreña. Por parte de los óvidos la raza analizada es la Latxa, tanto en su variedad Latxa de cara rubia como en la variedad Latxa de cara negra. A continuación, se describen las características más importantes de cada una de las razas analizadas.

**Tabla 1.** Lista de las 14 razas y 9 variedades autóctonas ganaderas vascas recogidas en el decreto 81/2015 del BOPV. Bi: Bizkaia, Gi: Gipuzkoa, Ar: Áraba. Bi\* indica la zona de las Encartaciones únicamente, no la totalidad de Bizkaia.

CATÁLOGO OFICIAL DE RAZAS GANADERAS AUTÓCTONAS VASCAS			
RAZAS	VARIEDAD	ESTADO	LOCALIZACION
<b>BOVINAS</b>			
Betizu		En peligro	Bi, Gi
Monchina		Crítica	Bi*
Pirenaica		No en riesgo	Bi, Gi, Ar
Terreña		En peligro	Bi, Ar
<b>OVINAS</b>			
Carranzana	Cara Negra	En peligro	Bi*
	Cara Rubia	No en riesgo	Bi*
Latxa	Cara Negra	No en riesgo	Bi, Gi, Ar
	Cara Rubia	No en riesgo	Bi, Gi, Ar
Sasi Ardi		En peligro	Bi, Gi
<b>CAPRINA</b>			
Azpi Gorri		Crítica	Bi
<b>PORCINA</b>			
Euskal Txerria		Crítica	Bi, Gi
<b>EQUINAS</b>			
Pottoka		En peligro	Bi, Gi, Ar
Caballo de Monte del País Vasco		En peligro	Ar
Asno de las Encartaciones		Crítica	Bi*
<b>AVIAR</b>			
Euskal Antzara		Crítica	Bi*
Euskal Oiloa	Beltza	Crítica	Bi, Gi
	Gorna	Crítica	Bi, Gi
	Lepasoia	Crítica	Bi, Gi
	Marradurna	Crítica	Bi, Gi
	Zilarra	Crítica	Bi, Gi



### 1.2.1.1. Terreña

El nombre de la raza indica ganado de la tierra, es decir, local. Los ancestros de esta raza pueden identificarse con el Tronco Ibérico, y dentro de éste con la rama derivada del *Bos taurus* Ibericus ancestral. Históricamente esta raza ha sido muy popular en el País Vasco, tanto por su uso alimentario como por su uso en el campo, pero en la actualidad, a raíz de su desuso en el campo, el censo de esta raza nos indica que se encuentra en peligro de extinción, estando catalogada como raza en riesgo o en trance de desaparición con únicamente 2.554 individuos según el censo oficial de libros genealógicos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (31/12/2015) (MAGRAMA Terreña) y el 75% de ellos se encuentra en un radio inferior a 50 Kilómetros. En la actualidad la raza Terreña se encuentra en una tendencia expansiva, con un aumento tanto de hembras reproductoras como de explotaciones ganaderas, gracias a normativas reguladoras, como la reglamentación específica de la raza bovina Terreña mediante el decreto 373/2001, publicada en el BOPV en 2003.

#### Características generales

Se trata de un animal de capa castaña de diferentes tonalidades. Su altura no suele superar los 142 cm de altitud, con poca masa, buen hueso y un perfil recto u ortoide, que indica que está caracterizado por una frente recta y por una línea recta también del margen superior del dorso y de la grupa (Magliano, A) (Figura 5).

Tienen cuernos finos y blancos con las puntas negras y las hembras tienen las ubres de color crema (Gomez y Amezaga, 2003). Esta raza pertenece a las razas del Tronco Cántabro, razas de capas castañas, mucosas negras y perfiles subcóncavos (Lauzurica, 1999). La raza Terreña se caracteriza por tener una gran rusticidad y un temperamento vivo. Son buenos marchadores y fuertes, típico de las razas de montaña.



**Figura 3.** Individuos de la raza bovina Terreña a la izquierda de la imagen (Fotografía: Euskal abereak). Individuos de la raza bovina Pirenaica a la derecha (Fotografía: Asociación de Ganado Vacuno Pirenaico (ASAPI)).

### Área Geográfica

La raza Terreña se encuentra en el sur de Bizkaia, Áraaba y norte de Burgos; también hay animales en Gipuzkoa. Se pueden diferenciar dos tipos: la Terreña del Gorbea situada en el parque natural del Gorbea, en pueblos periféricos entre Bizkaia y Áraaba y en núcleos dispersos de Gipuzkoa y la Terreña de la Sierra Salvada o de la Peña situada al noreste de Araba (Gomez, 2003).

### Aptitudes

La aptitud principal de la raza Terreña en la actualidad es en el sector cárnico, siendo una de las razas productoras de la denominación de origen cárnica vasca “Euskal Okela”. Tradicionalmente se han utilizado, mayoritariamente los bueyes para el trabajo agrario y eso derivó en su uso en deportes tradicionales vascos como la “idi-proba” o arrastre de piedra por bueyes. Su uso deportivo y rural otorga a esta raza un gran peso cultural y social.

#### 1.2.1.2. Pirenaica

Esta raza debe su nombre a su origen, situado en los Pirineos de donde es autóctona. La filogenia de esta raza tiene un origen mestizo ancestral por el cruzamiento del *Bos brachicercus europaeus* y del *Bos taurus ibericus* (Sánchez Belda, 1984). Aunque otras teorías apuntan a *Bos primigenius var* o a

*Bos taurus trudetanus* como orígenes ancestrales. La raza Pirenaica debido a su gran rendimiento comercial es una raza de fomento o en expansión con cerca de 40.000 individuos (MAGRAMA Pirenaica). Este elevado número de individuos hizo que fuese la primera de las razas autóctonas vascas para la que se creó una regulación específica mediante la Orden de 26/2/1988 (<https://www.boe.es/boe/dias/1988/03/16/pdfs/A08318-08321.pdf>) por la que se aprueba la reglamentación específica del libro genealógico de la raza bovina Pirenaica. Es la raza autóctona vasca de bóvidos más numerosa, y al igual que la raza Terreña, el 75 % de sus individuos se encuentran en un radio menor a 50 Km, por ello a lo largo de este trabajo nos referiremos a la raza Pirenaica como una raza autóctona del País Vasco, sin que ello signifique que es exclusiva de esta región.

### **Características generales**

Las Pirenaicas son vacas de alta montaña al estar adaptadas al clima del Pirineo, siendo por tanto animales de gran rusticidad, pero que también presentan buenos comportamientos en regiones con climas suaves, cercanas al mar como es el caso de la Cornisa Cantábrica. Son animales ortoides, de tamaño medio con no más de 150 cm hasta la cruz los machos y 132 cm las hembras y proporciones alargadas, con mucha masa muscular que proporcionan pesos medios en canal de 300 Kg. Los bóvidos de la raza Pirenaica presentan una capa monocolor trigueña más o menos clara, denominadas como "gorri" (rojo) o "zuri" (blanco), dándose casos de individuos con aureola alrededor de los ojos denominada como "ojo de perdiz". Presentan cuernos de color blanco nacarado, con las puntas de color amarillento y la encornadura hacia delante. Cabe destacar la docilidad, facilidad para el parto y buena capacidad como nodriza de esta raza.

### **Área Geográfica**

La raza Pirenaica debido a su alto valor económico se encuentra extendida por gran parte de norte de la Península Ibérica, encontrándose rebaños en las Comunidades de: Navarra, Comunidad Autónoma Vasca, Aragón, Cantabria, Cataluña, La Rioja y en las provincias de Soria, Cáceres, Burgos, Castellón y Madrid, aunque el mayor censo de población, aproximadamente el 75% de la población, se encuentra en País Vasco y Navarra.

### **Aptitudes**

Esta raza debido a sus características morfológicas tiene una buena aptitud para la producción cárnica. En este sentido la Pirenaica se encuentra dentro de las razas productoras de la denominación de origen cárnica “Euskal Okela” en el País Vasco, “Ternera de Navarra” en Navarra y de la marca de calidad registrada del Sobrarbe en Huesca. Al igual que la raza Terreña, la Pirenaica mantiene cierto uso en deportes rurales como las “idi-probak” en algunos lugares del País Vasco.

#### **1.2.1.3. Latxa**

El nombre de esta raza ovina proviene del euskera y significa “basta” haciendo referencia a su tosca lana. La raza Latxa pertenece al tronco churro y está considerada como una de las razas más primitivas de la Península Ibérica. Su origen es muy remoto y su conservación se debe en parte, a la prohibición que durante siglos no ha permitido la importación de otras razas ovinas ([http://www.nekanet.net/razas/latxa\\_c.htm](http://www.nekanet.net/razas/latxa_c.htm)). Esta raza, aunque en la actualidad se encuentre en recesión de nacimientos y ganaderías, cuenta con 80.000 individuos de los que el 75% de su población se encuentra en un radio inferior a 50 km. La raza Latxa que se encuentra fuera de peligro y se utiliza en un sistema de explotación semi-extensivo (MAGRAMA Latxa).

### **Características generales**

Las ovejas Latxas son animales de tamaño medio y perfil recto con entre 65 y 75 cm hasta la cruz y entre 55 kg las hembras y 75 kg los machos. Son animales de alta montaña adaptados a climas muy húmedos. Esta adaptación en parte se la confiere su largo y peculiar vellón, muy basto y poco ondulado. Ambos sexos presentan cornamenta, siendo su presencia más común y con mayor desarrollo en los machos.

Esta raza se caracteriza por tener dos variedades diferentes; la Latxa de cara rubia y la Latxa de cara negra. Estas dos variedades se pueden diferenciar por su coloración de la cara ya que en la variedad

cara rubia tiene la piel y mucosas se encuentran despigmentadas, mientras que en la variedad de cara negra tiene la piel blanca salvo en la cabeza y extremidades que son oscuras, así como el pelo, que tiene una coloración que va desde un negro intenso hasta un marrón oscuro (Figura 6).



**Figura 4.** Individuos de la raza Latxa. A la izquierda está situado un individuo de la variedad Latxa de cara negra y a la derecha uno de la variedad de cara rubia (Fotografías: Confederación de Asociaciones de Criadores de Ovino de Razas Latxa y Carranzana (CONFELAC)).

### Área Geográfica

La distribución geográfica de la raza Latxa se limita exclusivamente al País Vasco y Navarra, siendo común en la totalidad de Guipúzcoa, Este de Bizkaia, Noreste de Araba y Noreste de Navarra, sin haber una diferenciación de la distribución geográfica en relación a las variedades de cara negra y cara rubia.

### Aptitudes

Los usos tradicionales han dado paso a la profesionalización de los agricultores y a los programas de selección que buscan aumentar la productividad y la rentabilidad, esto ha disminuido el uso de la lana beneficiando la producción de leche. La leche se utiliza para la producción de queso y se comercializa bajo el sello de calidad de "Idiazabal" en el País Vasco y "Roncal" en Navarra. También hay un interés en la producción de productos cárnicos, aunque de menor importancia, mediante la comercialización de corderos lechales bajo el sello de calidad de "Cordero Lechal de Navarra" en

Navarra. Culturalmente, la raza Latxa está asociada con los concursos de “artzain txakurra” o perro pastor y campeonatos de esquilado de ovejas.

### **1.3. Estudio poblacional y filogenético a través del ADN mitocondrial.**

El ADNmt por sus características es un marcador ideal para su aplicación en genética poblacional. Su particular herencia, exclusivamente por vía materna y su alta tasa de mutación, en comparación con el ADN nuclear, le confieren la capacidad para identificar los linajes maternos clasificando a los individuos en haplogrupos y haplotipos específicos. De esta forma es posible reconstruir la historia evolutiva y migraciones de los individuos de cada especie y analizar las relaciones filogenéticas entre los mismos. Por otro lado, en el ADNmt se encuentran una serie de genes que son capaces de identificar especies. La alta tasa de mutación en estas regiones, permiten una clara identificación genética entre las diferentes especies. Además, los cambios progresivos que ha acumulado el ADNmt tiene la capacidad de ubicar cada especie filogenéticamente en el reino animal.

#### **1.3.1 La mitocondria y su origen**

Los registros más antiguos de estructuras celulares que posiblemente representen a la mitocondria datan de los años 1840 (Henle, 1841, Aubert, 1853, Flemming, 1882), pero no fue hasta el año 1890 que Altmann observó la presencia universal de las mitocondrias en las células, las denominó “bioblastos” y afirmó que son organismos elementales que habitan dentro de la célula. Fue en el año 1898 cuando este orgánulo finalmente pasó a ser denominado mitocondria, del griego, “mitos” ovillo y “chondros” gránulos (Benda, 1898).

Las mitocondrias son orgánulos celulares de doble membrana que se encuentran diseminadas a lo largo del citoplasma. Estos orgánulos tienen la capacidad de replicarse de forma continua (Wang et al., 2010) sin importar el tipo de célula en la que se encuentren, incluso en las células que no son capaces de experimentar mitosis después del nacimiento (Cohen, 2010). La forma y número de este orgánulo depende de las necesidades energéticas de cada una de las células, siendo su número más elevado en casos con grandes gastos energéticos como las células musculares. Mayores requerimientos puntuales de energía pueden desembocar en un estrés que induzca la división de las

mitocondrias para hacer frente al nuevo requerimiento energético (Youle, 2012). Esta división de las mitocondrias se da mediante fisión simple de las mitocondrias previamente existentes.

Estos orgánulos son los responsables de generar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular a partir de la realización de un proceso denominado respiración celular. La mitocondria alberga en su interior la cadena transportadora de electrones y los complejos enzimáticos de la ATP (adenosín trifosfato)-sintasa, productores de ATP mediante fosforilación oxidativa. Aunque la función principal de la mitocondria es la producción de la energía que requiere la célula, también son responsables de la catabolización de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos y están implicadas en la comunicación intracelular, en el control homeostático de la célula y en la apoptosis celular (Chinnery, 2003). Las mitocondrias están presentes en todas las células eucariotas animales y vegetales, a excepción del reino de los arqueozoos que, debido a que fueron unos de los primeros eucariotas que se bifurcaron, no poseen mitocondrias, peroxisomas, ni aparatos de Golgi con los dictiosomas apilados (Sogin et al., 1998).

Las similitudes de la mitocondria con las bacterias son múltiples; tienen un tamaño y una forma similar, se reproducen por fisión binaria, tienen un ADN circular bacteriano y su proceso respiratorio es similar al realizado por bacterias aerobias. Por estos motivos Margulis (1976) postuló la teoría endosimbionte, que aclara el origen de los orgánulos de membrana doble como mitocondrias y cloroplastos. La aparición de las mitocondrias en la célula data de hace aproximadamente 700-1.500 millones de años. Las mitocondrias actuales habrían evolucionado a partir de la simbiosis de una célula glicolítica motril y una  $\alpha\alpha\alpha$ -protobacteria (Sagan, 1967). Antes de este paso evolutivo y debido a la universalidad de las reacciones en el interior de la célula, productos celulares como los aminoácidos o el ATP se producían a raíz de la fermentación de moléculas de pequeño tamaño como el acetato y el piruvato que proporcionaban la suficiente energía para la elaboración de macromoléculas específicas (Margulis, 1985).

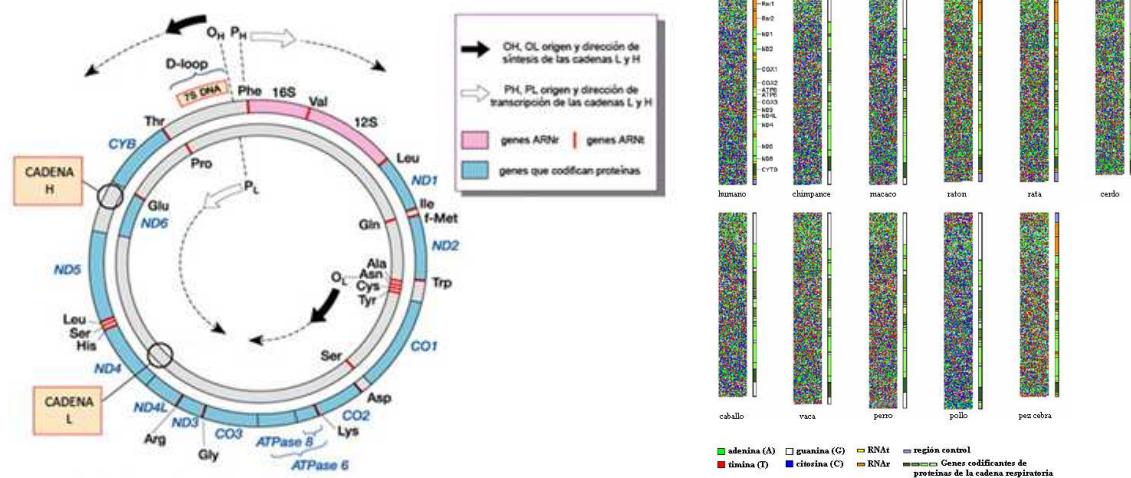
### 1.3.2 ADN mitocondrial

El ADNmt es una molécula circular de doble hebra, distribuida en dos cadenas complementarias y antiparalelas denominadas: H o "*heavy chain*", rica en purinas (adenina y guanina) y L o "*Light chain*" rica en pirimidinas (citosina y timina) (Figura 5A). En el caso de los humanos la longitud del ADNmt



es de 16.569pb. Esta secuencia fue descrita por primera vez por Anderson et al., (1981) y es conocida como Secuencia de Referencia de Cambridge (CRS). En el año 1.999 esta secuencia fue revisada, debido a que se encontraron varios errores de secuenciación (Andrews et al., 1.999) y esta nueva secuencia es conocida como la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (CRSr). La numeración de las bases nucleotídicas se realiza desde la base 1 a la 16.569 de la hebra L. La longitud del ADNmt es variable dependiendo de la especie animal, pero se mantiene relativamente constante incluso entre animales de diferentes Clases (Figura 5B). Dentro de una especie concreta la longitud del ADNmt, a excepción de inserciones o deleciones puntuales, tienen la misma longitud. Cabe destacar que hay una serie de especies de mamíferos, como es el caso de *Ovis aries*, donde se encuentran una serie de motivos de repetición en la región control que pueden alargar o acortar considerablemente la longitud del ADNmt.

La molécula de ADNmt tiene un tamaño muy reducido comparado el ADN nuclear. Debido a su reducido tamaño presenta una notable conservación del espacio, ya que no hay zonas intrónicas en sus genes y los espacios intergénicos son mínimos, llegando a solaparse sus genes en algunos casos. En el caso del ADN nuclear únicamente hay dos copias de ADN en cada célula y está organizado y agrupado en pares de cromosomas heredados por vía materna y paterna. Por el contrario cada célula contiene gran cantidad de mitocondrias y cada mitocondria tiene varias copias de ADNmt (Clayton, 1982, Shuster, 1988) dependiendo de los requerimientos energéticos, por lo que cada célula puede tener entre 1.000 y 10.000 copias de ADNmt (Giles et al., 1980 y Falkenber et al., 2007). Este elevado número de copias presente en las mitocondrias convierten al ADNmt en un marcador de gran utilidad a la hora de analizar muestras degradadas.



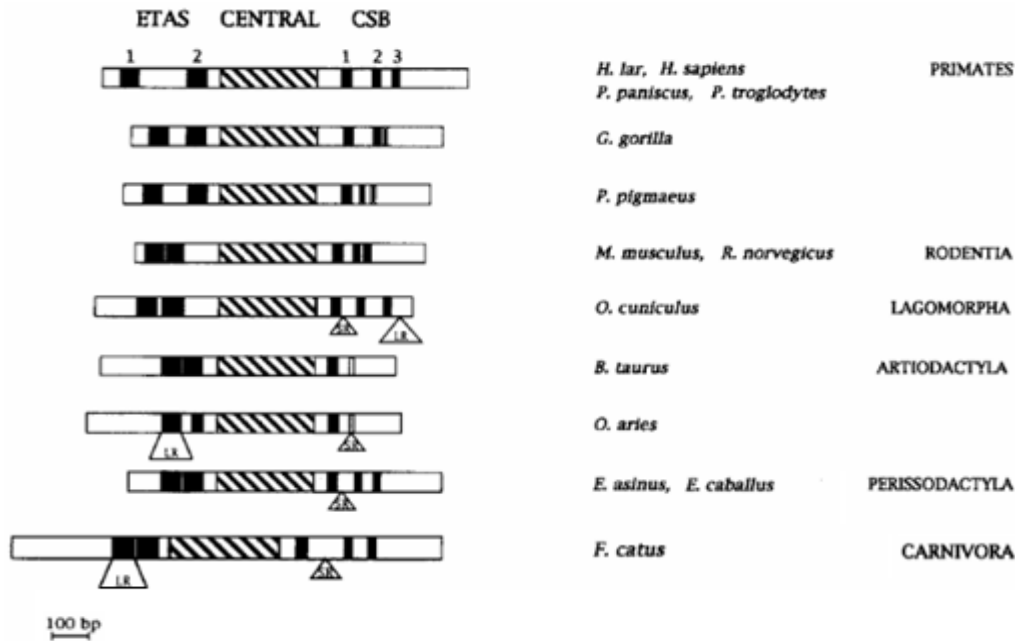


**Figura 5.** A) A la izquierda se representa la estructura del ADNmt humano. Se indican las regiones codificantes en gris y las no codificantes en color (Figura modificada de <http://epidemiologiamolecular.com>). B) A la derecha se incluye una matriz de puntos de las bases del ADNmt de varias especies de mamíferos, aves y peces. Cada uno de los puntos indica una base del ADNmt. La barra lateral indica la posición y longitud de los diferentes genes, ARNt y ARNr presentes en el ADNmt de forma linear. (Figura modificada de <http://www.dna-rainbow.org>)

Respecto a la estructura del ADNmt se pueden diferenciar dos regiones, la región no codificante o región control y la región codificante.

La región codificante abarca más del 90% del ADNmt. Esta región contiene todos los genes del ADNmt y se encarga de codificar la síntesis de las cadenas polipeptídicas. En el caso de los humanos esta región aloja a 37 genes; 22 codifican para ARNt, 2 para ARNr (*12S* y *16S*) y 13 codifican para ARNs mensajeros implicados en la cadena de fosforilación oxidativa (*OXPPOS*). También se codifican 7 de las 46 subunidades que conforma el complejo NADH deshidrogenada (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *ND6*, *ND7*), una de las 11 subunidades del citocromo b (*cyt b*), tres de las 13 subunidades del gen citocromo c oxidasa (*COI I*, *COI II*, *COI III*) y dos de las 16 proteínas que conforman el complejo de la ATP sintetasa (*ATP6* y *APT8*). El resto de subunidades de estos complejos se codifican mediante el genoma nuclear, se traducen en el citoplasma y posteriormente son transportadas a la mitocondria. El número de genes y las subunidades que se codifican pueden variar dependiendo la especie animal, pero la conservación de las regiones en mamíferos es muy notable (Figura 5B).

La región control o región no codificante también es conocida como asa de desdoblamiento o D-loop. Es una región corta con alrededor de 1140 pb en las especies mamíferas, y de alrededor de 1120 pb el caso de humanos. Esta región control está formada por tres dominios principales: las secuencias extendidas asociadas a la terminación (TAS), que podrían tener un rol funcional en la regulación de la replicación y la transcripción y que están subdivididas en ETAS1 y ETAS2; el dominio central (CD), para el cual se desconocen sus funciones y los bloques de secuencias conservadas (CSB) subdividido en CSB1, CSB2, y CSB3, que están relacionados con el origen de la síntesis de la hebra H (Sbisà et al., 1997) (Figura 6).



**Figura 6.** Representación de la organización estructural y la longitud de la región D-loop de varias especies de mamíferos. Los cuadrados negros de la izquierda indican las regiones ETAS, la región rayada indica el dominio central y los cuadrados negros de la derecha indican las regiones CSB. Los triángulos con LR indican posiciones de motivos de repetición largos. Los triángulos con SR indican motivos de repetición cortos (Figura tomada de Sbisá et al., 1997).

Mientras que los complejos ETAS y CSB de mamíferos evolucionan rápidamente, el CD presenta un alto grado de conservación entre especies (Sbisá et al., 1997, Pesole et al., 1999). Aparte de los tres dominios mencionados, la región control contiene secuencias de regulación como el origen de replicación (ori H) de la hebra H, así como los orígenes de la transcripción de las hebras L y H (LSP y HSP) (Anderson et al., 1981) que crean el asa de desdoblamiento conocido en inglés como “D-loop” y que da nombre a la región. La replicación de la hebra H comienza con una corta síntesis de esta hebra, que al seguir unida a la hebra molde, desplaza la hebra H formando una triple hélice (Crews et al., 1979).

### 1.3.3 Replicación y transcripción del ADNmt

Los procesos de replicación y transcripción realizados por la mitocondria están estrechamente ligados. Ninguno de los dos son procesos autosuficientes a la hora de acometer su función, por lo que será

necesaria la participación de una serie de productos génicos codificados y transportados desde el núcleo celular.

La replicación del ADNmt es un proceso controvertido debido a la existencia de diferentes teorías. El modelo más aceptado ha sido el de la horquilla de desplazamiento o círculo rodante (Clayton, 1991, Shadel, 1997). Desde entonces se han propuesto diferentes alternativas como el modelo en el que las dos hebras del ADNmt se replican al mismo tiempo (Holt et al., 2000, Bowmaker et al., 2003), pero el modelo de replicación asimétrica, en el que primero el proceso comienza en el origen de replicación de la hebra H, avanza unos dos tercios de la molécula hasta dejar al descubierto el origen de replicación de la hebra L, y posteriormente se inicia la replicación de la hebra L (Brown et al., 2005, Brown y Clayton, 2006) sigue siendo la teoría más aceptada en la actualidad por la comunidad científica.

La transcripción del ADNmt en un gran número de mamíferos está regulada por los promotores LSP y HSP, ambos situados en la hebra H. Para la completa transcripción del ADNmt este proceso se realiza a partir de los LSP y HSP que crea largas secuencias de ADN policistrónico. Finalmente, a partir del tratamiento de los transcritos primarios son procesados el ADNt, ARNr y ARNm cuya codificación se produce en el ADNmt (Clayton, 1991, Ojala et al., 1981).

Cada uno de los genes codificantes de proteínas y ARNr que se encuentran en el ADNmt tienen al menos un gen de ARNt flanqueándolos y es necesaria su escisión para una correcta producción de moléculas de ARNr y ARNm maduro. La transcripción del ADNmt en el caso de los humanos está estrechamente ligada a una polimerasa de ARN (POLRMT) (Tiranti et al., 1997), que codifica una proteína de 1.230 aminoácidos. Este gen nuclear codifica una proteína celular que es introducida en la mitocondria y que para su funcionamiento requiere factores de transcripción tales como TFAM, TFAM1 y TFAM2. En el otro lado del proceso, el final de la transcripción está asociado con factores de terminación de la transcripción mitocondrial como es mTERF.

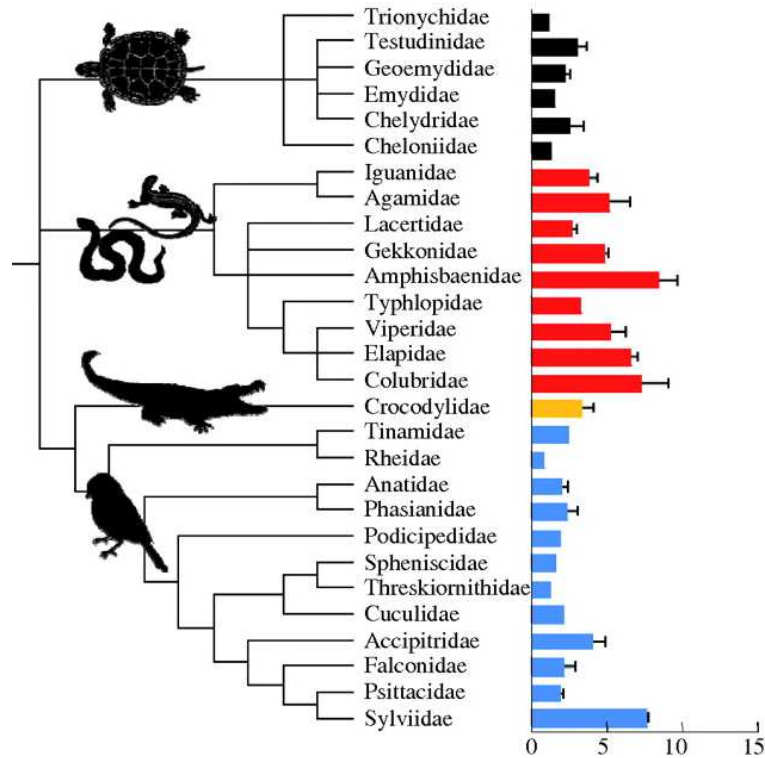
### 1.3.4 Tasa de mutación

El ADNmt puede acumular mayor cantidad de mutaciones que el ADN nuclear en un espacio de tiempo concreto. Las tres características principales que confieren al ADNmt una mayor tasa de mutación que el ADN nuclear son unos sistemas de reparación menos eficientes por parte del ADNmt (Bogehagen et al., 1999), la ausencia de histonas y su exposición continua a especies de oxígeno-reactivas generadas en la fosforilación oxidativa (Ritcher et al., 1988). Se ha estimado que esta tasa de mutación puede ser hasta 10 veces más elevada en el genoma mitocondrial (Brown et al., 1979). Esta particularidad, asociada a su modelo de herencia uniparental, convierte al ADNmt en una herramienta de gran utilidad para el análisis de procesos filogenéticos y evolutivos.

Dentro del ADNmt se encuentran dos regiones diferenciadas con diferentes tasas de mutación. Por un lado, la región codificante con una menor tasa de mutación. Esto se debe a que mutaciones en esta región del ADN pueden alterar la función de las regiones codificadas, desembocando en muchos casos en graves enfermedades de origen mitocondrial (Chinnery, 2014). La falta de descendencia de estos individuos es el motivo principal de que muchas mutaciones de la región codificante del ADNmt no se fijan en las poblaciones. Por otro lado, la región no codificante o región control tiene una tasa de mutación muy superior, y al contrario del caso anterior, las mutaciones surgidas en esta región no afectan a la codificación del ADN, por lo que no hay ningún tipo de perjuicio y de esta forma las mutaciones se fijan de manera más común en la población. A lo largo de millones de años de evolución estas regiones se han vuelto altamente variables entre individuos de una misma especie, permitiendo incluso la diferenciación de linajes o poblaciones próximas entre sí (Torrioni et al., 1992). La alta variabilidad de la región no codificante del ADNmt y su capacidad de discriminación de linajes le convierten en una herramienta ampliamente utilizada para estudios poblacionales y filogenéticos.

Las tasas de mutación del ADNmt difiere ampliamente entre especies, sin tener relación con su clase o nivel de complejidad evolutiva (Eo et al., 2010) (Figura 7). Aun así, los valores de tasas de mutación son muy bajos, dándose una única mutación cada varios miles de años. En la especie *Bos taurus*, por ejemplo, únicamente se da una mutación cada 3.172 años (Achilli et al., 2009). De esta forma tener

los valores de mutación de cada especie nos permite utilizar el ADNmt como reloj molecular, al analizar el número de mutaciones presentes en un individuo concreto (Endicott et al., 2009).



**Figura 7.** Tasa de mutación del genoma mitocondrial (sustitución por sitio por año) ( $\times 10^{-9}$ ) en distintas especies (Figura modificada de Eo et al., 2010).

### 1.3.5 Herencia materna del ADNmt

La herencia del ADNmt es exclusivamente por vía materna y no recombina en la mayoría de los animales. No obstante, esta recombinación es común en plantas o hongos que tienen una herencia biparental de los genomas citoplasmáticos como las mitocondrias y los cloroplastos (Barr et al., 2005), mientras que en el reino animal, la herencia materna estricta es la regla general (Zorros, 2013). El descubrimiento de la herencia materna exclusiva se produjo al observar la herencia de una serie de RFLPs que siempre presentaban la variante materna (Gilles et al., 1980).

La pequeña cantidad de mitocondrias presentes en los espermatozoides y localizadas en el cuerpo basal, entre la cabeza y la cola, raramente entra en el ovulo, pero las que lo consiguen son marcadas mediante ubiquitinación y destruidas selectivamente en el oocito (Sutovsky et al., 1999 y 2000) siendo degradadas por proteosomas y lisosomas (Sato, 2013). En el caso de quedar alguna

mitocondria paterna sufrirá la dilución de unas pocas copias entre cientos de miles de copias de origen materno contenidas en el ovocito, quedando en una proporción de 1:100.000 (Chen et al., 2005).

El modelo de herencia materna exclusiva se puso en duda a raíz de un caso en 2002 de un paciente con una miopatía mitocondrial en el que se mostró evidencias de herencia paterna (Schwartz, 2002). Además se observó una recombinación del 0,7% ADNmt en el tejido muscular de este individuo (Kraytsberg et al., 2004). Sin embargo ante la ausencia de más evidencias que apoyen la hipótesis de transmisión paterna del ADNmt (Hagelberg et al., 2000, Filosto et al., 2003, Yao et al., 2007) se ha descartado la teoría de una posible herencia paterna, siendo el modelo de herencia materna aceptado como norma general.

### **1.3.6. Ausencia de recombinación**

El ADN nuclear está organizado en diferentes cromosomas que son heredados mediante herencia mendeliana, pero a diferencia de éstos, la molécula de ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna y sin recombinación alguna. Esta ausencia de recombinación es una de las características principales del ADNmt. Y aunque la recombinación del ADNmt es un fenómeno común en especies de levaduras (Zhou et al., 2010) y plantas (Manchekar et al., 2006, Davila et al., 2011), en las mitocondrias de mamíferos, la recombinación del ADNmt parece ser un evento infrecuente.

Durante muchos años la ausencia de recombinación en el reino animal ha sido una de las características incuestionables ya que no había ninguna evidencia que mostrase lo contrario. Pero gracias a los análisis genéticos de diferentes poblaciones humanas y al elevado número de muestras analizadas se han podido detectar ciertas evidencias de recombinación en el ADNmt según varios autores. Los primeros en afirmarlo fueron dos estudios realizados en 1999 por Awadalla et al. y Eyre-Walker et al. que afirmaban que la gran variabilidad de los hot-spots o puntos calientes de mutación en poblaciones filogenéticamente distantes podría estar relacionado con la recombinación del ADNmt. Pero esta hipótesis no ha podido ser confirmada ya que estudios posteriores mostraron errores de interpretación en los estudios que sustentaban esta hipótesis, dejando en entredicho tales afirmaciones (Ingman et al., 2000, Kivisild et al., 2000). Posteriormente se han publicado otros

estudios que cuestionan la ausencia de recombinación del ADNmt (Kraytsberg et al., 2004, Zsurca et al., 2005). No obstante, estos estudios también han sido cuestionados por otros autores (Bandelt et al., 2005). Por lo tanto, en estos momentos sigue sin existir un consenso en la comunidad científica entorno a este aspecto.

En el caso de que se diera recombinación del ADNmt este marcador seguiría teniendo el mismo nivel informativo en estudios filogenéticos y poblacionales. Esto se debe a su característica forma de heredarse, que hace que durante la ovogénesis todas las mitocondrias se formen a partir de unas pocas (Jansen et al., 1998), siendo por ejemplo en el caso de las vacas, donde todas las mitocondrias se forman únicamente a partir de 5 moléculas de ADNmt de la anterior generación (Hauswirth et al., 1985). Por lo que, salvo mutaciones o errores puntuales, todas las mitocondrias de un organismo tienen la misma secuencia.

### **1.3.7 ADNmt y genética de poblaciones**

El ADNmt es una herramienta de gran utilidad en cualquier estudio filogenético, indicando los procesos evolutivos y migratorios de las diferentes poblaciones de cada especie. La variabilidad elevada del ADNmt ha dado lugar a multitud de haplotipos caracterizados cada uno de ellos por una serie de polimorfismos que se han ido fijando en la población a lo largo de la historia evolutiva en cada linaje materno. Por consiguiente, el estudio del ADNmt permite diferenciar incluso entre poblaciones estrechamente relacionadas (Torroni et al., 1992).

Los primeros polimorfismos del ADNmt analizados con fines evolutivos fueron descritos en los inicios de los años 80 (Brown et al., 1980, Denaro et al., 1981). Estos primeros estudios se llevaron a cabo con 5-6 enzimas para la detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), un número que rápidamente aumentó al análisis de 12-14 enzimas (Cann et al., 1987). Estas metodologías siguen usándose en la actualidad, aunque su estudio se ha extendido a todo el genoma mitocondrial (Helentjaris 2013, Massanet et al., 2013). Actualmente, los análisis de RFLPs son menos frecuentes, debido en gran parte a la irrupción de nuevas metodologías que aportan un mayor nivel de información como la amplificación del ADN por PCR (Mullis et al., 1987) combinada con la secuenciación mediante tecnología Sanger, que aporta una mayor resolución y por lo tanto

una mayor información (Vigilant et al., 1991, Alfonso-Sánchez et al., 2008). En los últimos años, los estudios de los genomas completos están aportando datos de gran valor sobre la filogenia del ADNmt, haciendo posible la asignación y clasificación de nuevos haplogrupos y subhaplogrupos (Finnilä et al., 2001, Kong et al., 2003, Achilli et al., 2004).

La variabilidad de las secuencias del ADNmt se clasifica en haplotipos para los individuos concretos y haplogrupos para los haplotipos que comparten una serie de posiciones polimórficas concretas. Los haplotipos pertenecientes a un mismo haplogrupo tienen un hipotético ancestro mitocondrial común (Torroni et al., 1993). La capacidad filogeográfica del ADNmt también permite relacionar un haplogrupo con un área geográfica concreta y se pueden detectar las migraciones acaecidas por estos linajes a lo largo del tiempo (Torroni et al., 2006)

### **1.3.7.1 Estudio de los linajes maternos de las especies ganaderas *Bos taurus* y *Ovis aries*.**

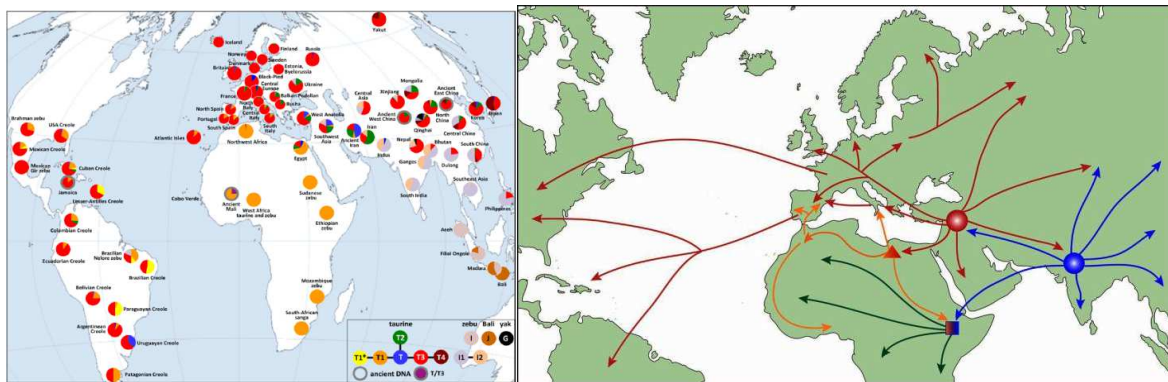
Tanto la historia evolutiva como migratoria de las especies ganaderas *Bos taurus* y *Ovis aries* están estrechamente ligadas a la relación que han tenido estas especies durante aproximadamente los últimos 10.000 años con el ser humano. El origen de la domesticación de ambas especies se dio principalmente en Oriente Medio a partir de agriotipos salvajes y desde allí ambas especies ganaderas se expandieron gracias al comercio y las constantes migraciones a lo largo de todo el mundo.

El estudio de los linajes de ADNmt de *Bos taurus* ha demostrado que la mayoría de las razas de ganado bovino actual pertenecen al macro-haplogrupo T, cuya aparición se estima hace aproximadamente 10.000 años (Troy et al., 2001, Edwards et al., 2007). Además del macro-haplogrupo mayoritario T, se han descrito tres haplogrupos adicionales, el haplogrupo P, con origen en Oriente Próximo y los haplogrupos Q y R, originarios de Europa (Achilli et al., 2008, Achilli et al., 2009), todos ellos minoritarios y posiblemente surgidos durante procesos de domesticación locales y secundarios (Bonfiglio et al., 2010) (Fig 8A).

El macro-haplogrupo T presenta una división en dos subclados, T5 y T1'2'3, este último predominante y formado a su vez por tres haplogrupos T1, T2 y T3 que agrupa a T4 (Achilli et al.,



2008, Achilli et al., 2009). Todos los haplogrupos pertenecientes al macro-haplogrupo T son originarios de Oriente Medio desde donde se expandieron. El haplogrupo T3 es el haplogrupo predominante en todas las razas de ganado bovino, aunque presenta una diversidad relativamente baja (Bradley et al., 1996, Troy et al., 2001, Carvajal-Carmona et al., 2003). Por otro lado, la posibilidad de un proceso de domesticación independiente en África (Bradley et al., 1996, Beja Pereira et al., 2006) explicaría las particularidades filogeográficas del haplogrupo T1, presente tanto en África como en Oriente Medio, Sur de Europa y Sudamérica (Fig 8B). Los linajes T1 llegados mediante intercambios comerciales, podrían haber influido en la formación de diversas razas Ibéricas y Criollas (Cymbron et al., 1999, Mirol et al., 2003).

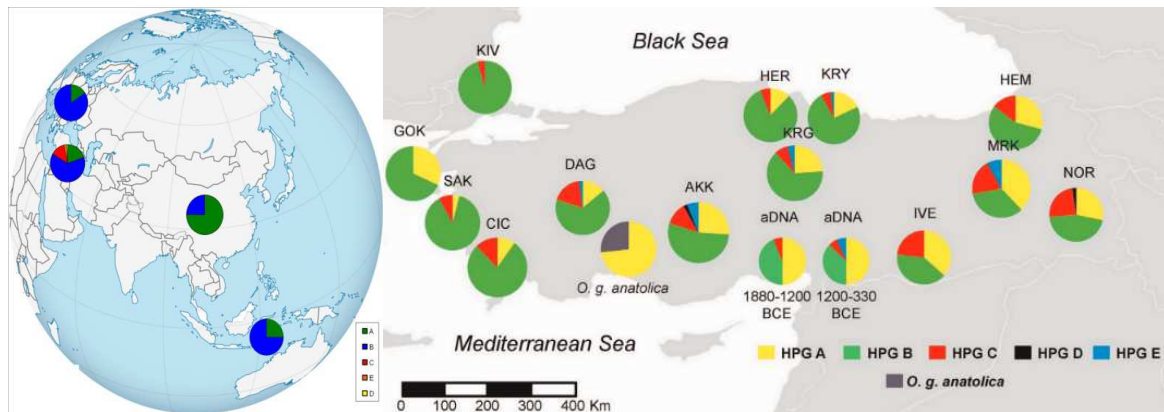


**Figura 8.** A) A la izquierda se representa la dispersión general de los haplogrupos mayoritarios de los linajes maternos de *Bos taurus* (Figura tomada de Lenstra et al., 2014). B) A la derecha se muestran las rutas migratorias desde sus centros de domesticación primitivos de la vaca en rojo, el Cebú (*Bos indicus*) en azul y de la vaca y el Cebú después de sufrir una domesticación secundaria en África en amarillo y verde respectivamente (Figura tomada de Magee et al., 2014).

El haplogrupo Q es el más cercano filogenéticamente al haplogrupo T de los tres haplogrupos secundarios anteriormente citados, con un tiempo de divergencia de aproximadamente 52.000 años (ky) (Achilli et al., 2008). Hasta la fecha sólo se han confirmado individuos pertenecientes al linaje Q en las razas taurinas italianas y muy recientemente en vacas egipcias (Oliveri et al., 2015). Se han identificado varias secuencias, tanto prehistóricas como modernas con el motivo 169G- 15953G- 16255C (Bonfiglio et al., 2010), característico de Q en la región control, en Francia, Alemania, Portugal, Turquía y China. Pero la asignación de este haplogrupo no puede ser verificada debido a que no se han comprobado las secuencias mediante el análisis de las posiciones específicas para la identificación de este haplogrupo en la región codificante del ADNmt (Achilli et al., 2008).

El estudio de los linajes ADNmt de *Ovis aries* ha mostrado la existencia de cinco haplogrupos diferentes A, B, C, D y E (Meadows et al., 2007) (Figura 9A). En el caso de la Península Ibérica tan solo se han descrito los haplogrupos A, B y C (Pedrosa et al., 2007).

Inicialmente se describieron dos haplogrupos, A y B (Hiendleder et al., 1998, Wood and Phua, 1996), que son los más ampliamente extendidos. El haplogrupo A es conocido como haplogrupo asiático por su amplia distribución en Asia, aunque tiene una distribución global. Este haplogrupo tiene la peculiaridad de estar relacionado filogenéticamente con el muflón europeo (*Ovis musimon*) (Hiendleder et al., 2002), algo que no ocurre al analizar otros haplogrupos donde no se han encontrado relaciones filogenéticas con ninguna especie salvaje del género *Ovis*. Por otro lado, el haplogrupo B o europeo es el más común en Europa, y al igual que el haplogrupo A presenta una distribución global. El haplogrupo C (Guo et al., 2005, Pedrosa et al., 2005) tiene una amplia distribución y ha sido descrito en Asia, Oriente medio y también en Europa (Pereira et al., 2006). Los haplogrupos D y E han sido descubiertos recientemente y solo han sido encontrados en individuos aislados del Cáucaso y Oriente Medio (Tapio et al., 2006, Meadows et al., 2007)(Figura 9B).



**Figura 9.** A) A la izquierda se representa la distribución general de los haplogrupos mayoritarios de los linajes maternos de *Ovis aries* (Figura tomada de Oliveri et al., 2012). B) A la derecha se muestra la distribución de los cinco haplogrupos en la región de Turquía, única región que presenta los cinco haplogrupos conocidos (Figura tomada de Demirci et al., 2013).

La región control del ADNmt de las ovejas tiene generalmente una longitud de 1180 pb. En esta región existe un motivo de repetición 75/76 pb repetido cuatro veces. Hiendleder et al., (1998)

hallaron que excepcionalmente algunos individuos muestran variaciones en el número de unidades de repetición de dicho motivo. Inicialmente, el número de estas repeticiones en tándem se asoció a diferentes especies de óvidos (Hiendleder et al., 2002) a modo distintivo entre especies. Sin embargo, esta posible explicación ha quedado descartada ya que individuos de la misma especie presentan diferente número de repeticiones. En la actualidad este motivo de repetición en tándem ha sido relacionado con la asignación de haplogrupos, estando el motivo de repetición de 75 pb asociado a los haplogrupos A, B y D, mientras que el motivo de repetición de 76 pb en la segunda y subsecuentes unidades sería indicativo de los haplogrupos C y E (Demirci et al., 2013).

### **1.3.8 La identificación de especies y el ADNmt**

Existen múltiples métodos de análisis para la identificación de especies animales basados en proteínas, lípidos, compuestos orgánicos volátiles o el análisis del ADN (Ali et al., 2012). Estas metodologías se agrupan en enfoques específicos, y enfoques inespecíficos (Sentandreu et al., 2014).

El grupo de las metodologías de enfoque inespecífico están basadas en la medición general de compuestos químicos, metabolitos y/o conjuntos de datos obtenidos a partir de imágenes. En estos casos es necesaria la utilización de modelos de análisis discriminantes capaces de establecer tasas de identificación óptimas. Entre las metodologías de enfoque inespecífico podemos encontrar la quimiometría (Moore et al., 2012), la medición de ratios de isótopos estables y elementos traza (Perini et al., 2013), la histología (Prayson et al., 2008), la espectroscopia (Tres et al., 2012) y la metabolómica (Gallardo et al., 2012, Tian, 2013).

Las metodologías de enfoque específico engloban a aquellas que se centran en el análisis de un grupo definido de biomarcadores clave, en lugar de mediciones generales como en el caso anterior. Los biomarcadores analizados son capaces de proporcionar información más precisa y de carácter muy amplio, acerca de la presencia de un tipo específico de carne, tejido y/o adulterante, dependiendo de la metodología utilizada. Estos enfoques específicos se han basado tradicionalmente en la detección de proteínas marcadas, péptidos, aminoácidos o ADN. Dentro de

este grupo las metodologías están divididas en dos categorías: las técnicas no basadas en la discriminación de secuencias y las técnicas basadas en la discriminación de secuencias.

Dentro del grupo de las metodologías que no discriminan secuencias nos encontramos con metodologías como las electroforéticas (Montowska et al., 2011), las cromatográficas (Messia et al., 2008) y los inmunoensayos (Asensio et al., 2008). El inmunoensayo más popular para la identificación de especies es el conocido como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (Asensio et al., 2008). Este último método, junto con las pruebas de ADN son las pruebas más utilizadas en la actualidad a la hora de identificar especies, tanto en investigación, como en la rutina de los laboratorios.

Las metodologías con enfoques proteómicos se centran en el análisis de proteínas y péptidos mediante la determinación de la estructura, la expresión, la localización, las interacciones y las funciones celulares de cada proteína (Ortea et al., 2009). La espectrometría de masas para la identificación de especies (Baliz et al., 2011) ha sido la metodología más utilizada en este campo, pero en la actualidad la proteómica moderna ha sufrido una “revolución postgenómica” que ha sido posible gracias al desarrollo de metodologías como MALDI (láser asistido por matriz de desorción ionización o Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) y ESI (Ionización por electrospray o Electrospray Ionisation) (Sentandreu et al., 2011).

El grupo de las metodologías que discriminan secuencias incluye principalmente la secuenciación del ADN (Parson et al., 2000, Paavo et al., 1988, Hsieh et al., 2001). En la actualidad el análisis de ADN constituye la metodología más utilizada en la identificación de especies (Ali, 2012) con fines forenses, de trazabilidad y de seguridad alimentaria. Son diversas las metodologías utilizadas para identificar especies animales mediante el ADN, entre ellas la amplificación PCR y posterior análisis de los productos amplificados mediante secuenciación Sanger es la más común, mientras que metodologías como el HRM son de gran interés como técnicas de *screening*.

La amplificación mediante PCR es ampliamente utilizada en la actualidad para la identificación de especies. La técnica de la PCR se basa en la hibridación de oligonucleótidos específicos o cebadores a una región concreta del ADN para facilitar la síntesis de millones de copias de esta región mediante la acción de una polimerasa de ADN termoestable. A partir de este proceso, son múltiples las

metodologías que se pueden utilizar: a) secuenciación de los productos de amplificación, tanto de un único fragmento como de múltiples fragmentos de ADN con diferentes pares de cebadores (PCR-multiplex)(Tobe et al., 2009), b) análisis de los polimorfismos de conformación de cadena simple (PCR-SSPC) (Ripoli et al., 2006), c) análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)(Park et al., 2007), d) amplificación aleatoria de ADN polimórfico (PCR-RAPD)(Aíslan et al., 2005), e) análisis de fluorescencia mediante PCR a tiempo real (rtPCR)(Jonker et al., 2009) que puede ser implementada con la técnica de la disociación de alta resolución (HRM) (Naue et al., 2014) y el análisis mediante pirosecuenciación (Karlsson et al., 2007).

La amplificación PCR para la identificación de especies puede realizarse mediante dos tipos de cebadores: cebadores especie-específicos y cebadores universales. En el primer caso los cebadores son diseñados específicamente para una especie en concreto y no amplifican el ADN de otras especies para las que no han sido diseñados. Los cebadores universales o degenerados por lo contrario están diseñados para que amplifiquen el ADN de una gran variedad de especies. Su universalidad radica en su posición en el genoma, ya que se sitúan en posiciones altamente conservadas y por tanto presentes en el mayor número posible de especies. Los criterios ideales de una región diana para el diseño de cebadores universales para la identificación de especies son: ser una secuencia que muestre la suficiente variabilidad entre especies y ninguna o poca variación intraespecífica, por lo que dos individuos estrechamente relacionados del mismo género podrían ser separados (Savolainen et al., 2005); generar un amplificado lo suficientemente corto para facilitar su análisis mediante secuenciación, HRM o pirosecuenciación, y estar flanqueada por regiones altamente conservadas que faciliten la ubicación de cebadores eficaces para amplificar dicha región en el mayor número posible de especies (Kocher et al., 1989).

Los principales marcadores genéticos que se estudian mediante PCR para la identificación de especies son el ADNmt (Johnson et al., 2014) y los loci STRs, que han sido ampliamente utilizados tanto en humanos como animales para la individualización genética (Butler, 2011) pero con una gran aplicabilidad para la identificación de especies (Dawnay et al., 2009, Berger et al., 2007).

El ADNmt es el marcador genético más utilizado en la actualidad para la identificación de especies. A pesar de tener únicamente alrededor de 16.000 pb, tiene un notable número de regiones de gran interés para la identificación y clasificación de especies. La alta tasa de mutación es una de las

principales características que convierten a esta molécula en una herramienta de gran utilidad puesto que contiene mayor diversidad genética acumulada a lo largo de la evolución que el ADN nuclear, lo que facilita la identificación incluso de especies cercanas desde un punto de vista evolutivo y filogenético (Vawter et al., 1986).

Los genes del ADNmt más estudiados para la identificación de especies, debido a su gran especificidad, son *cyt b* y *COI* (Parson et al., 2000, Hebert et al., 2003), y en menor medida los genes *12s RNA*, *16s RNA* (Melton et al., 2007, Guha et al., 2005). Otras regiones, como el D-loop (Pum, 2009) y los genes que codifican subunidades de NADH deshidrogenasa (Osborne et al., 2002) que también han sido estudiadas, aunque de forma mucho más minoritaria. Las regiones del ADNmt que han sido usadas en multitud de estudios filogenéticos, taxonómicos y forenses (Bataille et al., 1999, Jonson et al., 2014, Hawkins et al., 2016) han dado lugar a bases de datos que hacen posible la comparación e identificación de la mayoría de las especies.

El gen mitocondrial *cyt b* ha sido ampliamente analizado en estudios filogenéticos, taxonómicos y forenses tanto en animales vertebrados (Parson et al., 2000, Kim et al. 2013, Gupta et al., 2013, Sukri et al., 2015) como invertebrados (Gil-Arriortua et al., 2013). Permite una reconstrucción muy precisa de la filogenia de los mamíferos en los niveles de Superorden, Orden y Familia (Tobe et al., 2010) en comparación con otras regiones identificadoras de especie. Su análisis con cebadores universales fue descrito por Parson et al., 2000 y Hsieh et al., 2001, para amplificar las primeras 400 pb (Linacre et al., 2011).

A su vez, el gen *COI* ha demostrado también una gran utilidad en la identificación de vertebrados. Por ese motivo, en la actualidad un gran número de laboratorios participan en un proyecto de gran relevancia para analizar una región del gen *COI* de 658 pb con el objetivo de establecer un código de barras de ADN (DNA barcode) para la identificación de especies (Hebert et al., 2003). Dicho proyecto, ha dado lugar a la creación del “Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” como iniciativa internacional dedicada al desarrollo de un estándar para la identificación de especies creándose una base de datos internacional “Barcode of Life Database (BOLD)” (<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>).

En el campo de la identificación de especies hay que destacar otros dos genes mitocondriales de gran importancia como son los genes *12s RNA* y *16s RNA*. Varios estudios demuestran la utilidad de los genes *12s RNA* y *16s RNA* para la identificación de especies, ya que se ha mostrado su validez debido a la alta variabilidad interespecífica que presentan (Rojas et al., 2011, Mahajan et al., 2011, Li et al., 2010). El análisis de las secuencias de estos dos ARNs ribosómicos permite encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos.

### **1.3.9 Importancia y aplicabilidad de la identificación de especies.**

Existe un gran número de especies animales que tienen un elevado interés en los diferentes campos donde la identificación de especies es necesaria, pero hay dos áreas donde la identificación de especies adquiere una notable importancia: las ciencias forenses y la seguridad y calidad alimentaria.

En el campo de las ciencias forenses la identificación genética de especies está adquiriendo cada vez más importancia a la hora de resolver tanto acciones criminales contra los seres humanos, como delitos contra la naturaleza y la biodiversidad. Esto es debido a que aporta datos que hasta ahora no se podrían conseguir mediante otras metodologías, ya que es capaz de identificar cualquier muestra a partir de vestigios muy reducidos, degradados o irreconocibles para otras metodologías. Además, estas metodologías han demostrado ampliamente su fiabilidad y bajo coste, por lo que se han afianzado dentro de la casuística (Oliveira et al., 2010).

Dentro de la genética forense la identificación de especies se utiliza principalmente en los siguientes casos:

a) Cuando la identificación de la especie a partir de un vestigio de origen no humano puede aportar información que contribuya al esclarecimiento de los hechos. La determinación del origen biológico, humano o no, de vestigios biológicos es un procedimiento rutinario en investigaciones forenses. En el caso de encontrar vestigios no humanos se requieren análisis posteriores para identificar la especie concreta.

b) La entomología forense es uno de los campos donde más recientemente se ha introducido la genética forense. La determinación del intervalo post-mortem de un cadáver requiere la identificación genética de una serie de especies con interés entomológico halladas en el cadáver. Las

especies más comúnmente presentes pertenecen a tres géneros de las familias Calliphoridae: Calliphora, Lucilia y Chrysomya, dentro del orden de los dípteros. La identificación morfológica de estas especies en estadios inmaduros (huevo, larva o pupa), como habitualmente se encuentran en los cadáveres o sus inmediaciones, resulta difícil y poco fiable. Por ello, la aplicación de métodos de identificación moleculares, tales como el análisis de genes del ADN mitocondrial ha supuesto un gran avance en la investigación forense de la entomofauna cadavérica (Gil-Arriortua et al., 2013).

c) La identificación de especies resulta también de especial importancia para verificar el cumplimiento de las prohibiciones y vedas que establece la ley de caza y evitar la caza furtiva y el comercio de especies protegidas que han contribuido a poner en peligro la supervivencia de un elevado número de especies (Teletchea et al., 2005). Las especies en peligro han tenido que ser protegidas por acuerdos como el Convenio de Berna, relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa, aprobado en Berna el 19 de septiembre de 1979, cuyas características fundamentales son su carácter generalista, la concepción de la lista única de especies y la implantación de la política conservacionista, sobre todo en lo relacionado con la protección de los hábitats (MAGRAMA Convenio de Berna). Se han aprobado también otros convenios como el convenio CITES, (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora o Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) que tiene por finalidad velar para que el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su supervivencia (<https://cites.org/esp/disc/what.php>).

d) Es de gran importancia económica la identificación de especies implicadas en accidentes de tráfico. Estos casos producen grandes pérdidas a empresas aseguradoras debido a la reclamación de falsos accidentes, ya que hasta hace poco era complicado comprobar la veracidad de los hechos (Pfeiffer et al., 2004)

e) La protección de la fauna autóctona, mediante la identificación las especies invasoras que causan un elevado daño a la fauna autóctona y contribuyen a la pérdida de biodiversidad. El objetivo es controlar lo antes posible estas especies para evitar su dispersión en fases juveniles donde comúnmente es más difícil identificar morfológicamente las especies. Entre las especies de interés



ecológico se encuentran un gran número de especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios, etc. (Armstrong et al., 2005).

En el campo de la seguridad y calidad alimentaria, la calidad de los productos de origen animal, incluyendo su autenticidad, es un requisito fundamental. Además, constituye una exigencia cada día más solicitada por parte de los consumidores, los cuales ejercen presión sobre los entes gubernamentales a fin de que se garantice la calidad (Rodríguez et al., 2004). En este sentido la Comunidad Europea ratificó la Directiva Europea 2001/101/CE del Consejo de 26 de noviembre de 2001 (Comisión Europea, 2001) en relación con el etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios con la intención de mejorar la calidad alimentaria.

La introducción de carne de menor calidad es un fraude en el sector alimentario cárnico, en gran parte debido a los altos beneficios que se obtienen de la adulteración mediante la venta de carne de bajo coste como si se tratase de carne de alta calidad (Noni et al., 1991). La identificación precisa de la especie de la cual provienen los alimentos es esencial para el control de calidad (Pfeiffer et al., 2004) por los siguientes motivos:

a) Evitar el fraude económico por sustitución o adulteración del producto, en especial en alimentos ofrecidos por expendedores sin el control sanitario correspondiente. En esta misma línea, el control de autenticidad de las carnes es necesario para evitar prácticas fraudulentas derivadas de la sustitución de las especies más valoradas por otras de menor valor comercial y organoléptico (Pappalardo et al., 2015, Quinto et al., 2016, Muñoz-Colmenero et al., 2016).

b) Requerimientos alimentarios especiales, relacionados con aspectos de salud o de orden sanitario, tales como problemas de alergias alimentarias en individuos susceptibles o que reaccionan ante ciertas proteínas de origen animal; así como aquellos individuos que no toleran ciertos componentes, tales como la lactosa de la leche o las proteínas de origen cárnico (Gerbault, 2014, Kumar et al., 2014).

c) Por razones culturales o religiosas, como es el caso de los musulmanes y su prohibición de consumo de productos de origen porcino o la prohibición de consumo de productos de origen

bovino por parte de los hindúes. Es por ello que la prevención de las prácticas fraudulentas constituye una parte importante del control regulador y sistemas de certificación de calidad alimentaria (Kumar et al., 2014).

d) La necesidad de identificar las especies animales presentes en piensos y harinas comerciales de consumo animal. Desde un punto de vista sanitario se considera de especial importancia el establecimiento de un control cualitativo sobre las especies potencialmente transmisoras de la EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina) y un control de las harinas consumidas, las cuales han mostrado la potencialidad de transmisión de la EEB (De vos et al., 2008). También es fundamental en el control de la comida de animales comestibles (Wang et al., 2004) y domésticos para evitar posibles adulteraciones.

## **2. Hipótesis y objetivos**



### **2.1 Hipótesis**

La región del País Vasco se caracteriza por albergar multitud de razas autóctonas de ganado bovino y ovino en su territorio. Estas razas se encuentran perfectamente adaptadas al medio en el que viven. Este proceso de adaptación es muy probable que esté relacionado con el tiempo de asentamiento de estas razas en esta zona y a su aislamiento geográfico debido a la compleja orografía del País Vasco. Por lo tanto, es probable que a lo largo de los miles de años transcurridos, estas razas hayan ido acumulando en su ADN una serie de cambios que las definen como animales adaptados al entorno en el que habitan.

La **primera hipótesis** que nos planteamos es que las especies ganaderas bovinas y ovinas actuales podrían estar presentes en la región del País Vasco desde el periodo Neolítico, hace aproximadamente 7.000 años. Hasta la actualidad los bóvidos y óvidos prehistóricos del País Vasco únicamente habían sido identificados mediante el estudio morfológico de los restos esqueléticos. Por lo que se podrían identificar los tiempos de asentamiento mínimos de cada una de las especies y relacionarse con el periodo de llegada de la domesticación proveniente de Oriente Medio a la región del País Vasco.

Por otro lado se planteó la hipótesis de que las especies autóctonas actuales del País Vasco podrían presentar continuidad genética con los bovinos y ovinos ancestrales que habitaban desde épocas prehistóricas esta zona, a diferencia de las razas alóctonas introducidas por motivos económicos en tiempos recientes, principalmente razas de vacas y ovejas. Para relacionar los individuos prehistóricos y actuales se realizó un estudio de los linajes maternos mediante el análisis del ADNmt.

La autoctonía de los óvidos y bóvidos presentes en la actualidad en el País Vasco ha sido una hipótesis largamente defendida. Esta autoctonía podría haber tenido lugar debido a su aislamiento geográfico y podría ser un indicador de su grado de adaptación al medio. El ADNmt podría ser marcador idóneo para la comprobación de esta hipótesis, por su capacidad para identificar los linajes maternos, que clasifican a los individuos en haplotipos y haplogrupos específicos.

La **segunda hipótesis** de este trabajo se enmarca dentro de la identificación de especies mediante metodologías de análisis del ADN con fines filogenéticos, taxonómicos y forenses, ya que ha mostrado ser una metodología de gran interés en los últimos años.

La identificación de especies en este sentido se basa en el análisis de secuencias que muestren suficiente variabilidad entre especies pero que estén conservadas dentro de la misma especie. Las secuencias con estas características que se utilizan más comúnmente corresponden a regiones del ADN mitocondrial, como la subunidad 1 de la citocromo oxidasa c y del citocromo b.

Actualmente existen multitud de cebadores universales, que permiten analizar estas regiones de los genes mitocondriales *cyt b* y *COI*. Sin embargo, la mayoría de ellos, aplicados para la identificación de especies en el gen *cyt b*, se sitúan en las primeras 400 pb (Linacre et al., 2011). Estos diseños actuales tienen limitaciones en casos con muestras degradadas, tanto en el campo forense; muestras en descomposición, heces... o en productos alimentarios, donde los alimentos procesados han sufrido procesos como la esterilización a temperaturas superiores a los 100°C. En casos de degradación del ADN se recomienda un diseño de cebadores en las que la región amplificada no sea mayor de 200 pb para una óptima amplificación (Unsel et al., 1995). Si bien es cierto que hay cebadores universales del *cyt b* con un tamaño menor a 200 pb (Hajibabaei et al., 2006; 2007), este únicamente se ha comprobado mediante bases de datos y con artrópodos procedentes de muestras museísticas, por lo que se desconoce el grado de discriminación real de los mismos.

Por lo tanto, el diseño de una pareja de cebadores para una región del *cyt b* altamente conservada en las especies, pero lo suficientemente variable entre especies y, además, de un tamaño menor a 200 pb, que pruebe su eficacia para la identificación de especies supondría un gran avance en el campo forense. Además, si el análisis de un fragmento con estas características se realizase a través de una metodología rápida, sencilla y a la vez fiable como el HRM, podría convertirse en una metodología de *screening* muy útil para la identificación de especies en la rutina forense, así como en la industria alimentaria para resolver casos de fraude alimentario.

### 2.2 Objetivos

#### Objetivos generales

El trabajo aquí expuesto está dirigido a ampliar los conocimientos sobre ADNmt animal en dos aspectos diferentes. Por un lado, pretende ampliar el conocimiento sobre los linajes maternos de razas bovinas y ovinas autóctonas del País Vasco y, a su vez, compararlos con linajes bovinos y ovinos de yacimientos prehistóricos del País Vasco para, de esta forma, comprobar si existe continuidad del acervo genético. Por otro lado, pretende ampliar el conocimiento en el campo de la identificación de especies, mediante el diseño, validación y aplicación práctica de una pareja de cebadores universales novedosa para el gen mitocondrial *cyt b*.

La consecución del primer objetivo general permitirá conocer las especies ovicaprinas y bovinas concretas que habitaron la región del País Vasco los últimos 7.000 años, aportando evidencias sobre el periodo de Neolitización de la región. Asimismo, permitirá aportar datos de gran interés sobre los linajes maternos de razas ovinas y bovinas autóctonas del País Vasco y su comparación con razas geográficamente próximas para, de esta forma, determinar su grado de particularidad. La relación entre los animales de los dos periodos, separados por 7.000 años de evolución, permitirá a la vez conocer el grado de continuidad y conservación que han sufrido las especies primitivas en su evolución hasta las especies actuales.

El segundo objetivo principal radica en el diseño de una pareja de cebadores universales para un fragmento del gen mitocondrial *cyt b* que sea eficaz para la identificación del mayor número de especies posible y que incluso pueda ser aplicable a muestras de ADN degradado. Como parte de este objetivo, se pretende validar dicha pareja de cebadores a través de la metodología HRM por sus reconocidas cualidades como método de *screening*.

### Objetivos concretos

1. Caracterizar los linajes maternos de la región control del ADN mitocondrial de 155 individuos de las razas bovinas autóctonas del País Vasco Terreña y Pirenaica, así como la estimación de los parámetros genéticos y de diversidad. Asimismo, los datos obtenidos de la población local se compararan con los obtenidos en otras razas de la Península Ibérica y Europa para analizar la posible relación existente entre estas razas y poder situarlas en un contexto global. Además, se procederá a la caracterización del ADNmt completo en aquellos individuos autóctonos del País Vasco que requieran una verificación más exhaustiva del haplogrupo a través del análisis de la región codificante del ADNmt.
2. Caracterizar los linajes maternos de la región control del ADN mitocondrial de 174 individuos de las variedades ovinas autóctonas del País Vasco, Latxa de cara rubia y Latxa de cara negra. Se compararan estas dos poblaciones con diferentes poblaciones ovinas de la Península Ibérica y de esta forma será posible analizar la variabilidad genética de cada tronco ovino ibérico. Las ovejas tienen una particularidad en el ADNmt ya que poseen un motivo de repetición en tándem que tiene 75/76 pb y que normalmente se repite cuatro veces a excepción de casos excepcionales en los que se encuentran cinco unidades de repetición. Esta repetición en tándem se encuentra en una zona denominada ETAS 1 con una posible función en los procesos de regulación de la transcripción, por lo que se procederá al estudio de la expresión del ADNmt en presencia de diferente número de unidades de repetición.
3. Identificar las especie en muestras prehistóricas del País Vasco. Para ello se analizará el gen mitocondrial *cyt b* de ocho restos de ejemplares ovicaprinos y seis ejemplares bovinos de cuatro yacimientos arqueológicos tanto de la región Atlántica como de la Mediterránea, que abarcan desde la época Romana hasta el periodo Neolítico. De esta forma se podrán identificar las especies concretas que han habitado esta región los últimos 7.000 años. Para ello, se procederá a caracterizar los linajes maternos de la región control del ADN mitocondrial de las especies animales prehistóricas del País Vasco. El análisis de los linajes maternos de estos restos arqueológicos permite asignar los haplogrupos correspondientes de estos animales ancestrales y



compararlos con los actuales para ver si se ha mantenido una continuidad del acervo genético materno.

4. Diseñar de una pareja de cebadores universales para mejorar la identificación de especies mediante el análisis de un fragmento del gen mitocondrial *cyt b*. La universalidad de los cebadores se basa en un diseño flexible capaz de amplificar una región de ADN en diferentes especies aun cuando se encuentran pequeñas variaciones entre las mismas. A su vez, estos cebadores universales se diseñaran teniendo en cuenta que den lugar a un tamaño de amplificado reducido con la intención de que sean útiles en muestras degradadas y forenses.
5. Comprobar la universalidad del método de identificación de especies desarrollado en el objetivo anterior. Se reunirá un alto número de especies pertenecientes a cinco Clases animales. Para ello se analizará la secuencia del fragmento de *cyt b* amplificada mediante los cebadores universales diseñados en este trabajo y se realizará un análisis filogenético para determinar el poder de discriminación interespecífica del fragmento amplificado. Finalmente se comparará con los análisis filogenéticos realizados a través del análisis de otros fragmentos del mismo gen, en las mismas especies, con otros cebadores universales previamente utilizados en la identificación de especies.
6. Desarrollar un método de *screening* aplicando los cebadores universales diseñados a la tecnología HRM para su aplicación en la identificación de especies cárnicas en el ámbito forense y alimentario. Se evaluará la eficacia de dicha metodología mediante el análisis de cinco especies cinegéticas; ciervo (*Cervus elaphus*), corzo (*Capreolus capreolus*), jabalí (*Sus scrofa*), oso pardo (*Ursus arctos*) y lobo (*Canis lupus*) y ocho especies cárnicas importantes para el consumo humano, pertenecientes tanto a la Clase de los mamíferos; vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cerdo (*Sus scrofa domestica*), caballo (*Equus caballus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), como a la Clase de las aves, gallina (*Gallus gallus domesticus*), pavo (*Meleagris gallopavo*) y codorniz (*Coturnix coturnix*). Además se valorará la capacidad de *screening* de la presencia de más de una especie mediante el análisis de mezclas en estas especies cárnicas. Estos paneles serán de utilidad tanto para la trazabilidad biológica del etiquetado de productos cárnicos, como para la detección del uso de productos procedentes de caza furtiva.



### **3. Materiales y métodos.**



### **3.1 Materiales**

#### **3.1.1 Muestras biológicas**

En el presente trabajo se han estudiado muestras biológicas prehistóricas y actuales de 64 especies animales. Las muestras prehistóricas pertenecen a tres especies halladas en varios yacimientos arqueológicos del País Vasco. Las muestras actuales procedieron de las especies *Bos taurus* y *Ovis aries*, ambas de razas autóctonas del País Vasco y de un tercer grupo formado por diversas especies animales o grupo multi-especie.

Las muestras prehistóricas consistieron en restos de 14 individuos a los que se les ha analizado parcialmente la región control del ADNmt y el gen *cyt b*. En las muestras actuales, se ha analizado la región control completa del ADNmt de 339 *Bos taurus* y *Ovis aries*. Además, se ha analizado el ADNmt completo de tres individuos de *Bos taurus*. También se estudió la expresión génica mitocondrial a seis individuos de la especie *Ovis aries* mediante el análisis del ARN de siete genes mitocondriales. Por otro lado se analizó un fragmento del gen *cyt b* en una población de 63 individuos pertenecientes a otras tantas especies. Finalmente se analizó mediante HRM el fragmento del gen *cyt b* mencionado y se hicieron una serie de paneles de disociación, tanto con especies cárnicas como cinegéticas. Se utilizaron 10 muestras de siete especies cárnicas y entre tres y diez muestras de cinco especies cinegéticas.

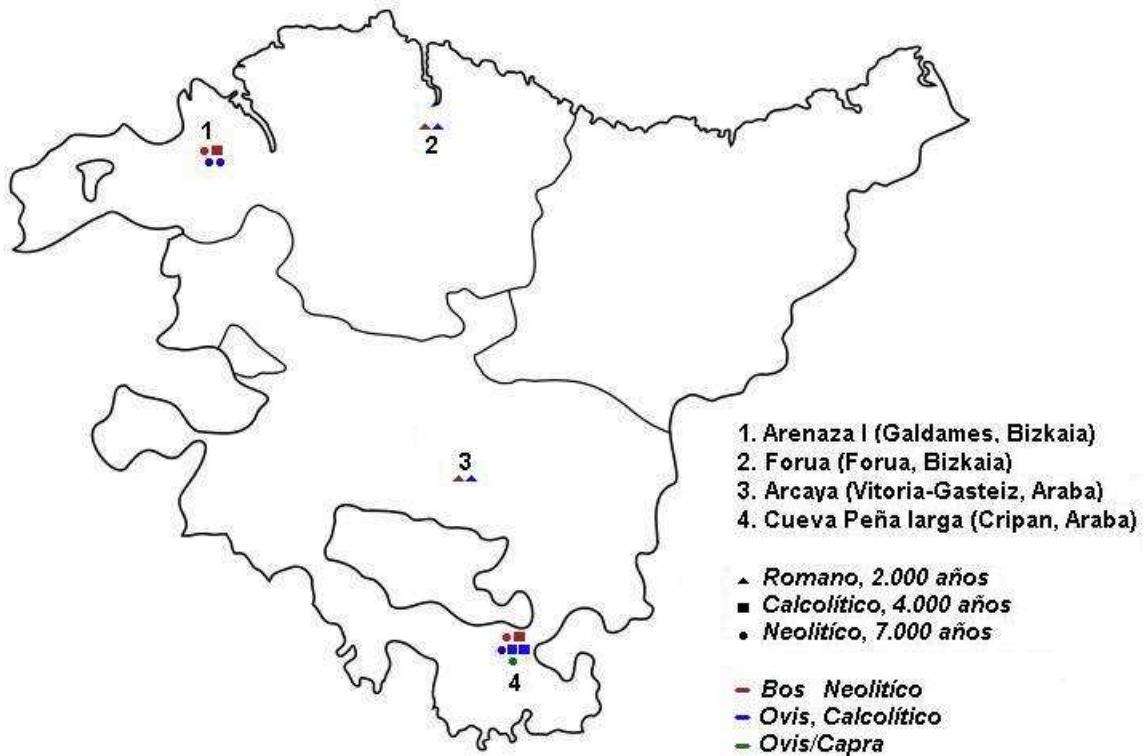
Todos los procedimientos se llevaron a cabo según la normativa legal vigente española, expuesta en los Reales Decretos 223/1998 y 53/2013 y a la legislación Europea indicada en las Directivas 1986/609/CE y 2010/63/UE, por los que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

### 3.1.1.1 Muestras prehistóricas

Todas las muestras prehistóricas seleccionadas fueron halladas en yacimientos arqueológicos situados dentro de los límites geográficos del País Vasco, dos en la vertiente atlántica denominados como Arenaza I y Forua y otros dos en la vertiente mediterránea, denominados como Arcaya y Cueva Peña Larga (Figura 10). Las muestras halladas en los yacimientos de Arenaza, Forua y Arcaya formaban parte de las cabañas ganaderas, y por lo tanto domésticas en un contexto de ocupación Romana. En el caso de Peña Larga también eran restos de animales domésticos pero en un contexto Neolítico, Calcolítico y Romano, siendo más un abrigo de pequeñas dimensiones que un asentamiento fijo como en los casos anteriores.

Se analizaron 14 muestras prehistóricas pertenecientes a los géneros *Bos* y *Ovis / Capra* (ovicaprino) cuyas especies concretas no pudieron ser determinadas morfológicamente. En concreto, se analizaron 6 muestras del género *Bos* pertenecientes a 3 periodos históricos: dos muestras del periodo Romano de hace aproximadamente 2.000 años de edad, dos muestras del periodo Calcolítico de hace aproximadamente 4.000 años y dos muestras del periodo Neolítico de hace aproximadamente 7.000 años. Asimismo, se analizaron 8 muestras de los géneros ovicaprinos: dos muestras pertenecían a la época Romana, dos al periodo Calcolítico y cuatro al periodo Neolítico.

En primer lugar se analizó un fragmento del gen *cyt b* con la intención de determinar la especie concreta a la que pertenecía cada individuo. Posteriormente se analizó parcialmente la región control del ADNmt con la intención de conocer los linajes maternos de los individuos, para poder compararlos entre sí y con los linajes de individuos autóctonos actuales.



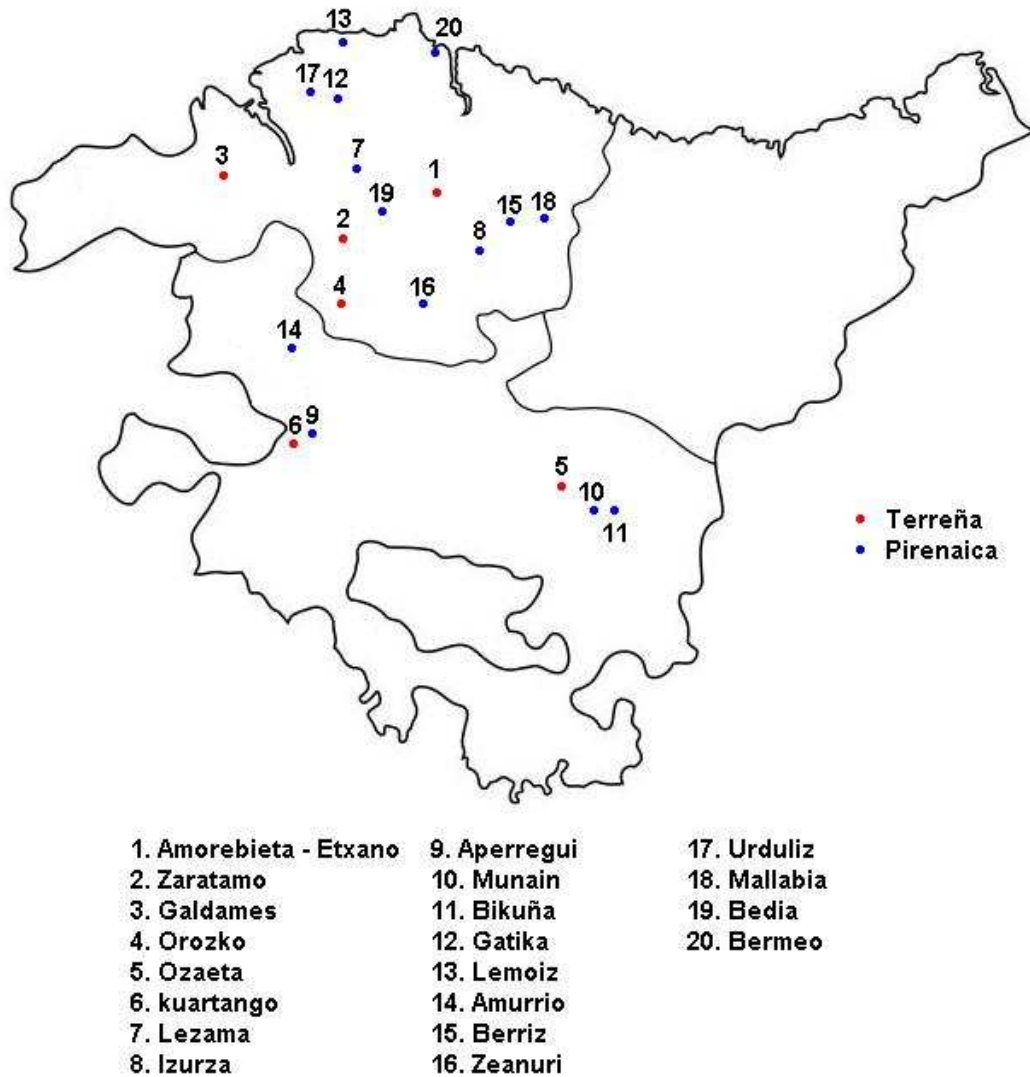
**Figura 10.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las muestras prehistóricas incluidas en este estudio.

### 3.1.2 Muestras de poblaciones actuales

#### 3.1.2.1 Población Bovina.

La elección de las muestras bovinas se basó en el origen geográfico e histórico de las razas, seleccionando únicamente individuos de razas autóctonas del País Vasco. Esta selección se hizo para poder analizar la posible continuidad genética entre las muestras prehistóricas y las actuales, todas ellas con un origen geográfico común. Concretamente se reunió una muestra de 155 individuos de las razas Terreña y Pirenaica, pertenecientes a rebaños vizcaínos y alaveses (Figura 11), seleccionando 79 individuos de raza Pirenaica y 76 individuos de raza Terreña. Para la elección de las muestras se han tenido en cuenta los siguientes criterios:

- \_ Individuos sanos (inscritos en los libros genealógicos como) pertenecientes a razas autóctonas con un linaje sin mestizaje.
- \_ Ausencia de parentesco en primer grado.
- \_ Individuos de rebaños no aislados.



**Figura 11.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las ganaderías bovinas incluidas en el presente estudio.

Estas muestras han sido empleadas en el **Estudio 1**. Se les analizó la región control del ADNmt, así como su clasificación filogenética en haplogrupos. Debido a la presencia de un individuo

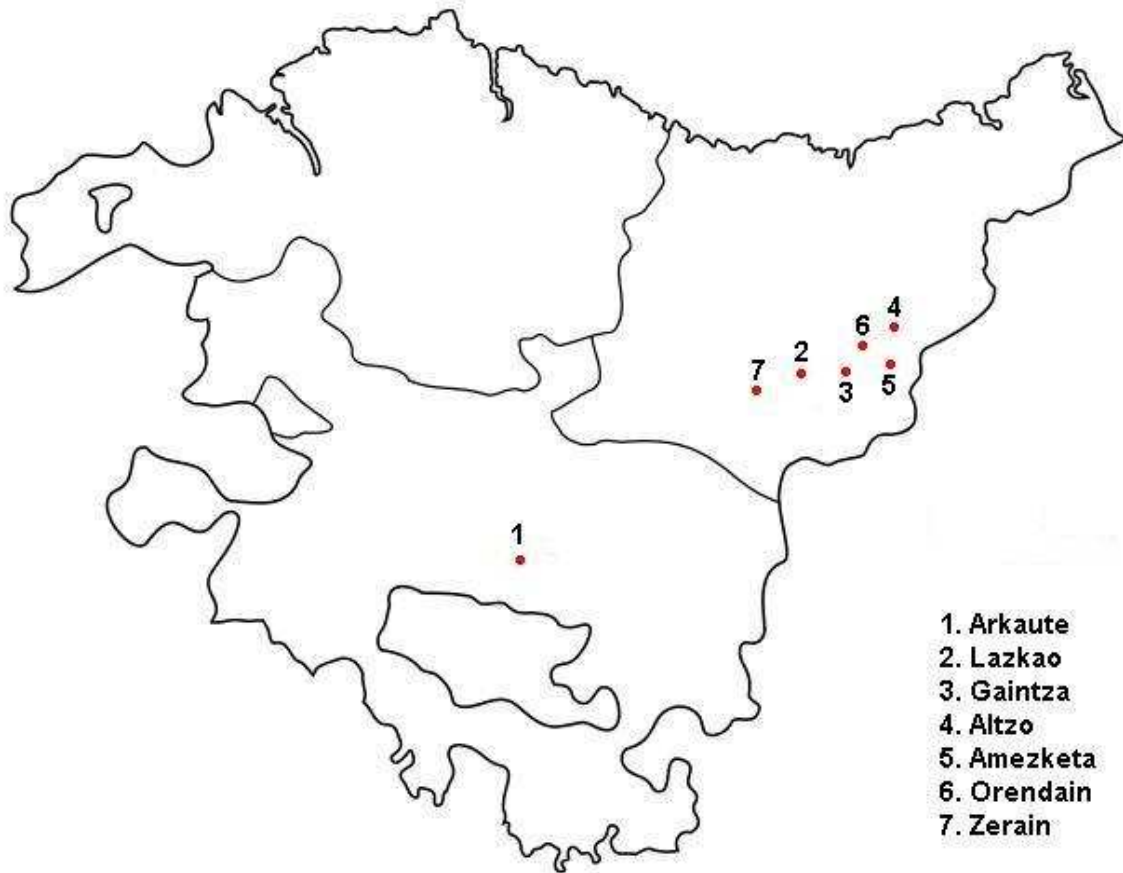


perteneciente al haplogrupo Q (HaQ), un haplogrupo no descrito hasta la actualidad en la Península Ibérica, se procedió a la secuenciación del ADNmt completo para confirmar la correcta clasificación filogenética de este haplogrupo. El análisis del ADNmt completo se realizó en 3 individuos: primero en el individuo que fue clasificado en un primer momento como haplogrupo Q, y posteriormente en dos individuos emparentadas según el registro genealógico, no incluidas en el análisis inicial. El parentesco entre estos tres animales fue asegurado mediante el análisis de loci microsatélites que confirmaron la existencia de parentesco madre-hijas. La utilización de estos individuos emparentados se realizó para corroborar el resultado de la presencia del haplogrupo Q observado en uno de los animales de este grupo familiar.

### **3.1.2.2. Población Ovina.**

Las muestras de individuos ovinos se eligieron según los mismos criterios seguidos en la selección de individuos bovinos con el fin de analizar la continuidad genética de esta especie. Así, se seleccionaron únicamente razas autóctonas históricamente asentadas en la región del País Vasco, con la intención de compararlas con las muestras prehistóricas procedentes de esta misma región. Se ha llevado a cabo el análisis de 174 individuos de la raza Latxa procedentes de rebaños de Gipuzkoa y Araba (Figura 12), sub-dividida en individuos de las sub-razas Latxa de cara rubia (n=77) y Latxa de cara negra (n=97). Los criterios tomados en cuenta para la selección de estos individuos fueron similares a los utilizados en la selección de los individuos bovinos:

- \_ Individuos sanos inscritos en los libros genealógicos como razas autóctonas del País Vasco con un linaje sin mestizaje.
- \_ Ausencia de parentesco en primer grado.
- \_ Individuos pertenecientes a rebaños no aislados.



**Figura 12.** Mapa del País Vasco en el que se representa la distribución geográfica de las ganaderías ovinas de la raza Latxa incluidas en el presente estudio.

Esta población ha sido empleada en el **Estudio 2**. Se analizó la región control del ADNmt a 184 individuos. Este análisis reveló la presencia de un motivo extra de repetición en tándem de 75/76 pb en dos individuos, y debido a su posible influencia en la expresión génica del ADNmt, se procedió al análisis de la expresión génica de siete genes. Este análisis se realizó en los dos individuos que presentaron el motivo de repetición, así como en otros cuatro individuos elegidos al azar, sin el motivo de repetición, para ser tratados como controles.

### 3.1.2.3. Grupo multi-especies.

El tercer grupo analizado en este estudio reúne individuos pertenecientes a 63 especies animales diferentes. La selección de individuos estuvo basada en la inclusión del mayor número posible de diferentes especies (Tabla 2). Este grupo de individuos de diferentes especies fue reunido con el fin de probar la eficacia y el grado de universalidad de una pareja de cebadores diseñada para amplificar un fragmento del gen especie-específico *cyt b*. Se seleccionaron especies con un alto interés en campos como la genética forense, la seguridad alimentaria o la ecología y la biodiversidad.

Debido a la complejidad para encontrar más de un individuo de algunas de las especies analizadas, sobre todo de las especies exóticas salvajes, se decidió seleccionar un único ejemplar por especie. En las especies domésticas, cárnicas y cinegéticas se utilizaron 10 individuos por especie, a excepción de las especies de lobo, perro y oso, de las que solo se dispuso de tres individuos.

**Tabla 2.** Tabla que muestra las 63 especies incluidas en el presente estudio ordenadas según su Clase, Orden y Familia. Sa; sangre, Te; tejido muscular, He; heces y Sl; Saliva

Clase	Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico	Matriz
Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Vaca	<i>Bos taurus</i>	Sa
			Vaca Watusi	<i>Bos taurus</i>	He
			Gaur	<i>Bos gaurus</i>	He
			Yak	<i>Bos grunniens</i>	He
			Oveja	<i>Ovis aries</i>	Sa
			Oveja enana	<i>Ovis aries</i>	He
			Cabra montesa	<i>Capra hircus</i>	Sa
			Cabra enana	<i>Capra hircus</i>	He
			AnTelope acuaTeco	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	He
			Antílope Lechwe	<i>Kobus leche</i>	He
			Addax	<i>Addax nasomaculatus</i>	He
			Bufalo de agua	<i>Bubalus bubalis</i>	He
			Bisonte	<i>Bison bonasus</i>	He
			Eland	<i>Tragelaphus oryx</i>	He
		Suidae	Cerdo	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Sa
			Cerdo Vietnamita	<i>Sus scrofa domesticus</i>	He
			Jabali	<i>Sus scrofa</i>	Te
		Cervidae	Facoquero	<i>Phacochoerus africanus</i>	He
			Ciervo	<i>Cervus elaphus</i>	Te
			Corzo	<i>Capreolus capreolus</i>	Te
		Camelidae	Muntjacs	<i>Muntiacus reevesi</i>	He
			Camello	<i>Camelus bactrianus</i>	He

		Giraffidae	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	He
		Hippopotamidae	Hipopotamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	He
	Perissodactyla	Equidae	Caballo	<i>Equus caballus</i>	Sa
			Caballo enano	<i>Equus caballus</i>	He
			Burro	<i>Equus asinus</i>	He
			Asno Somali	<i>Equus asinus somalicus</i>	He
			Cebra de Greivy	<i>Equus grevyi</i>	He
		Rhinocerotidae	Rinoceronte	<i>Ceratotherium simum</i>	He
	Lagomorpha	Leporidae	Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Te
	Carnivora	Canidae	Perro	<i>Canis familiaris</i>	SI
			Lobo	<i>Canis lupus</i>	He
		Felidae	Gato	<i>Felis silvestris</i>	SI
			Jaguar	<i>Panthera onca</i>	He
			Tegre	<i>Panthera tigris</i>	He
			Leon	<i>Panthera leo</i>	He
			Lince	<i>Lynx lynx</i>	He
		Hyaenidae	Hiena	<i>Crocuta crocuta</i>	He
		Ursidae	Oso Pardo	<i>Ursus arctos</i>	He
	Primates	Hominidae	Humano	<i>Homo sapiens</i>	Sa
	Rodentia	Muridae	Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	Te
		Chinchillidae	Chinchilla de cola larga	<i>Chinchilla lanigera</i>	He
		Caviidae	Cobaya	<i>Cavia porcellus</i>	He
		Sciuridae	Perro de la pradera	<i>Cynomys ludovicianus</i>	He
		Hystriidae	Puercoespín	<i>Hystrix africae australis</i>	He
Aves	Galliformes	Phasianidae	Gallina	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Te
			Pavo	<i>Meleagris gallopavo</i>	Te
			Codorniz	<i>Coturnix coturnix</i>	Te
	Struthioniformes	Struthionidae	Avestruz	<i>Struthio camelus</i>	He
		Dromaiidae	Emu	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	He
Reptilia	Testudines	Agrionemys	Tortuga	<i>Testudo horsfieldii</i>	He
		Testudinidae	Tortuga Morrocoy	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	He
			Tortuga de espolones africana	<i>Geochelone sulcata</i>	He
Actinopterygii	Anguilliformes	Congridae	Congrio	<i>Conger conger</i>	Te
		Salmonidae	Salmon	<i>Salmo salar</i>	Te
	Perciformes	Bramidae	Palometa/ Japuta	<i>Brama brama</i>	Te
		Xiphiidae	Pez espada	<i>Xiphias gladius</i>	Te
		Scombridae	Bonito	<i>Thunnus alalunga</i>	Te
		Serranidae	Mero	<i>Epinephelus marginatus</i>	Te
		Sparidae	Besugo	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Te
	Gadiformes	Gadidae	Bacaladilla	<i>Micromesistius poutassou</i>	Te
		Phycidae	Locha	<i>Phycis blennoides</i>	Te
	Pleuronectiformes	Soleidae	Lenguado	<i>Solea solea</i>	Te
Malacostraca	Decapoda	Cancriidae	Buey de mar	<i>Cancer pagurus</i>	Te
		Majidae	Centollo	<i>Maja squinado</i>	Te
		Nephropidae	Bogavante	<i>Homarus gammarus</i>	Te

Las muestras se recogieron en una gran variedad localizaciones y procedieron de cuatro matrices diferentes: sangre, saliva, tejido muscular y heces. Las especies domesticas se recogieron de propietarios que cedieron una muestra de saliva de su animal de compañía, las muestras de especies alimentarias taxonómicamente comunes se obtuvieron de la sangre o del tejido muscular de los animales enteros. Las muestras de tejido muscular de especies cinegéticas fueron cedidas por la Asociación de Cotos de Caza de Araba. Todas las muestras de especies salvajes fueron de heces y se recogieron el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, Obregón (Cantabria).

Esta población ha sido empleada en el **Estudio 4**. Con el fin de comprobar el nivel de universalidad de la pareja de cebadores diseñada en este trabajo, se secuenció un fragmento de 148 pb del gen *cyt b* del ADNmt en las 63 especies animales, pertenecientes a 38 Familias de 14 Ordenes y cinco Clases (Mammalia, Aves, Reptilia, Actinopteria y Malacostracea). Posteriormente, en los **Estudios 5 y 6** se empleó esta misma pareja de cebadores para analizar el gen *cyt b* mediante la tecnología HRM. Este análisis mediante HRM se enfocó hacia el diseño de dos paneles de *screening* diferentes, el primero de ellos dirigido a la identificación de especies cárnicas de consumo habitual (**Estudio 5**) y un segundo panel ideado para la identificación de especies cinegéticas con alto valor ecológico (**Estudio 6**).

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Tratamiento y análisis molecular de muestras prehistóricas**

Las muestras prehistóricas, debido a su alto nivel de degradación del ADN, requieren una metodología específica. Al contrario que las muestras actuales, donde los problemas a la hora de extraer el ADN son mínimos, las muestras prehistóricas debido al paso de miles de años y a la exposición a su entorno suelen tener un bajo grado de preservación, con gran deterioro del material genético. Debido a esta degradación genética muestran un menor rendimiento de ADN que las muestras actuales y una mayor posibilidad de contaminación mediante ADN exógeno, tanto el laboratorio donde se tratan las muestras, como los protocolos de extracción de ADN están adecuados para una extracción aislada y optimizada de este tipo de muestras.

##### **3.2.1.1 Particularidades de los laboratorios de trabajo de ADN**

La necesidad de laboratorios independientes para muestras prehistóricas se debe a la elevada facilidad que presenta este tipo de muestras de sufrir una contaminación. Esto sucede debido a la degradación del material genético de las muestras, y a las bajas cantidades que se obtienen, donde cualquier contacto con ADN exógeno podría contaminar una muestra concreta.

Se han utilizado dos laboratorios físicamente separados y de uso exclusivo para trabajar con muestras de ADN. El acceso a estos laboratorios está restringido únicamente a un grupo reducido de personas que trabaja con muestras prehistóricas. El primero de ellos es exclusivo para la toma de muestras, limpieza, corte y pulverización, mientras que el segundo laboratorio es exclusivo para la extracción de ADN, almacenaje y preparación de las muestras para su posterior amplificación. Ambos espacios cuentan con un sistema de presión positiva de aire en el interior para minimizar la entrada de partículas y otros contaminantes exteriores.

El equipo de protección individual empleado también es más estricto en estos laboratorios que en los laboratorios convencionales. El vestuario consiste en un pijama de cuerpo completo, mascarilla,

gorro, bata y dos pares de guantes que se cambian asiduamente. Las superficies, los materiales y los aparatos del laboratorio también tienen un protocolo de limpieza más estricto que los laboratorios convencionales al limpiarse con hipoclorito sódico (40 g de cloro activo por litro) al 50%, seguido de agua MilliQ y etanol al 70% y ser expuestos a luz UV con el fin de conseguir una descontaminación óptima. El material utilizado en estos laboratorios es exclusivo de estos espacios y cada vez que se introduce material nuevo debe seguir los protocolos de limpieza y descontaminación descritos anteriormente. Este material nunca sale de las salas asignadas y únicamente puede hacerse por cuestiones de limpieza, esterilización o mantenimiento.

### **3.2.1.2 Pre-tratamiento de las muestras prehistóricas**

Las 14 muestras prehistóricas analizadas en este trabajo han sido piezas dentales. Se seleccionaron las muestras en los yacimientos de forma que las muestras perteneciesen a individuos diferentes. Todas las piezas dentales fueron seleccionadas buscando un alto grado de conservación, evitando dientes con caries, grietas u otras imperfecciones que pudieran haber favorecido la degradación del ADN del interior de la pieza ósea.

Primero se realizó un registro fotográfico de cada una de las piezas analizadas (Figura 13) y se seleccionó la zona donde tomar la muestra para producir el menor impacto posible en la pieza, teniendo en cuenta el valor histórico y museístico de las mismas.

Una vez seleccionada la región de la toma de muestra se procedió a limpiar esa zona concreta del diente. Esta limpieza se hizo en el interior de una campana de extracción de gases para reducir la posibilidad de contaminación. La limpieza se realizó raspando la superficie del diente enérgicamente para retirar toda la suciedad acumulada a lo largo del tiempo y posteriormente se procedió a limpiarlo con hipoclorito sódico al 10% y a aclararlo con agua MilliQ estéril. Una vez limpia la zona seleccionada se procedió a cortar esa sección del diente con una herramienta cortadora Dremel. Las piezas dentales cortadas se volvieron a limpiar de nuevo con hipoclorito sódico al 10% y se introdujeron en un UltraViolet CrossLinker donde fueron sometidas a una radiación UV de 450  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  durante 30 minutos por cada uno de los lados.



**Figura 13.** Registro fotográfico inicial y final, tras la limpieza de una de las muestras seleccionadas.

Finalmente, se procedió a la pulverización de los trozos cortados y descontaminados. La pulverización de las piezas dentales se hizo en un molino criogénico FreezerMill 6750 SPEX SamplePrep, esta metodología reduce el calor desprendido en la fricción generada por inmersión en Nitrógeno líquido, reduciendo el grado de degradación del ADN de la muestra. Se pesaron y separaron 0,5 g del producto pulverizado seco de cada una de las muestras para realizar la extracción de ADN y se procedió a conservar el resto del material pulverizado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para futuras extracciones.

### Equipos utilizados en el pre-tratamiento de las muestras prehistóricas.

#### **Campana de extracción de gases**

BURDINOLA, mod. OR-S 900  
Amoroto, España

#### **FreezerMill 6750**

SPEX SAMPLE PREP. Cat Nº: 06063  
Metuchen, NJ, USA

#### **UltraViolet CrossLinker CL-1000**

UVP, Cat Nº: 95-0174-01  
Cambridge, UK

#### **Balanza TE153S**

SARTORIUS. Cat Nº: 16705706  
Madrid, España

#### **MultiPro 7800PE 9.6V**



DREMEL, Cat Nº: FO13 7800 66

Breda, Holanda

### 3.2.1.3 Extracción de ADN

La extracción ADNa se realizó en un laboratorio especialmente destinado para extracción de ADN, almacenaje y preparación de las muestras su posterior amplificación con las condiciones anteriormente descritas. Todo el proceso de extracción del ADN se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para prevenir la contaminación.

En esta fase se trabajó con un máximo de dos muestras cada vez con sus correspondientes blancos de extracción para detectar posibles contaminaciones. Primero se realizó una descalcificación de las muestras, ya que en los casos de muestras muy antiguas se observa un alto grado de mineralización. Se añadieron a los 0,5 g del polvo, obtenido en el paso anterior, 3 mL de solución EDTA 0,5M pH8 y se dejó a temperatura ambiente entre 18 y 24 horas en un agitador de tipo noria. Una vez descalcificadas se centrifugaron las muestras, retirando el sobrenadante con la fracción calcificada y quedándonos con el polvo precipitado.

Posteriormente se hizo la lisis de las muestras descalcificadas. Para realizar la lisis se añadieron 3 mL de Buffer ES, con EDTA 0,5M pH8 y sarcosyl 1% y 150 µL de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se dejaron incubando toda la noche, en agitación, a una temperatura de 55°C.

Una vez lisada la muestra se procedió a la extracción del ADN mediante la adsorción a una columna de silica Generon Hi-Flow® DNA Purification Spin Columns (Generon Ltd., Berkshire, Reino Unido) empleando una serie de *buffers* de QIAGEN (QIAGEN, Venlo, Países Bajos). Este proceso de adsorción por columna de silica se realizó añadiendo el volumen del sobrenadante de la fase de lisis a 15 mL de *binding buffer* (PB, QIAGEN) que ayuda a la unión del ADN a la membrana de silica. Se realizaron tres lavados añadiendo 5 mL de *washing buffer* (PE, QIAGEN) en cada uno de los lavados. Tras cada uno de los lavados se recuperó el ADN unido a la membrana de silica añadiendo 100 µL de *elution buffer* (EB, QIAGEN). Con el fin de recoger la mayor cantidad de ADN posible se realizó una elución final, obteniendo un volumen aproximado de 400 µL.

El volumen conseguido se purificó y concentró mediante columnas Amicon YM30 (MilliPore, Billerica, MA, EEUU), con las que se llevó a un volumen final de aproximadamente 35  $\mu$ L. Este volumen se conservó a -20°C hasta su utilización para minimizar su degradación.

### Material, reactivos y equipos utilizados en la extracción de ADN de las muestras prehistóricas.

Materiales y reactivos	Equipos
<b>EDTA-Na<sub>2</sub> (Ac. Etilendiaminotetraacético)</b> <b>Sal disódica dihidratada)</b> SIGMA-ALDRICH, Cat N°: E-5143, P.m. = 372,24 Madrid, España	<b>Cabina de flujo laminar</b> FASTER-AIR, Mod. Two 30 Cornaredo, Italia
<b>Sarkosyl (N-Lauroilsarcosina Sal de Sodio)</b> SIGMA-ALDRICH, Cat N°: L9150, P.m. = 293,38 Madrid, España	<b>Agitador tipo noria Orbit</b> JP SELECTA, Cat N°: 3000445 Abrera, España
<b>Proteinasa K</b> PROMEGA, Cat N°: V3021 Madrid, España	<b>Estufa Incudigit</b> JP SELECTA, Cat N°: 2001247 Abrera, España
<b>Tris base (Tris (hidriximetil)-aminometano)</b> AFFYMETRIX, Cat N°: 75825, P.m. = 121,14 High Wycombe, UK	
<b>Buffer PB (Binding buffer)</b> QIAGEN, Cat N°: 50919066 L' Hospitalet de Llobregat, España	
<b>Buffer PE (Washing buffer)</b>	

QIAGEN, Cat N°: 50919065

L' Hospitalet de Llobregat, España

### **Buffer EB (Elution buffer)**

QIAGEN, Cat N°: 50919086

L' Hospitalet de Llobregat, España

### **Etanol absoluto**

SCHARLAB, Cat N°: ET0005, P.m. = 46,07

Gentmenat, España

### **Hi-Flow® DNA Purification Spin Colimns**

GENERON, Cat N°: GEN-HF24ETO

Berkshire, UK

### **Amicon Ultra-0.5 mL, membrana Ultacel-30**

MERK-MILLIPORE, Cat N°:UFC503096

Madrid, España

## **Preparación de soluciones para la extracción de ADN**

**Solución ES:** 150 mL de EDTA 0,5M pH8, añadir 1,5 g de sarkosyl. Agitar suavemente para evitar la producción de espuma hasta que se disuelva completamente y finalmente autoclavar.

**Solución proteinasa K:** Añadir 100 mg de proteinasa K, 500 µL de Tris 100 mM y 4.500 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril. Agitar suavemente hasta que se disuelva completamente para evitar la producción de espuma, posteriormente alicuotar y conservar a -20°C.

### 3.2.1.4 Cuantificación espectrofotométrica del ADN

El proceso de cuantificación de ADN es necesario para conocer la cantidad y la calidad del ADN obtenido durante el proceso de extracción. La cuantificación aún más crítica en muestras prehistóricas que tienden a tener muy bajas cantidades de material genético, además de hallarse parcialmente degradado. El proceso de cuantificación del ADN extraído de las muestras, así como de los blancos de la extracción se realizó mediante un NanoDrop ND-1000.

La cuantificación espectrofotométrica además de cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra, permite detectar algunos contaminantes procedentes del proceso de extracción junto con el ADN, como son; restos de alcoholes y fenoles provenientes de una mala limpieza de la muestra, proteínas fuertemente ligadas al ADN o sales disueltas en el medio. El ADN presenta un pico de absorción a 260 nm (A260), mientras contaminantes como las proteínas o las sales presentan sus respectivos picos de absorción a 280 nm (A280) y 230 nm (A230). La cercanía de los máximos de absorción del ADN y las proteínas hace que en algunas muestras haya un solapamiento parcial, por lo que es necesario una estimación de la relación A260/A280 para obtener una mejor estimación de la cantidad y calidad de ADN. Valores en la relación A260/A280 de entre 1,8 y 2 indican grados de purificación de proteína óptimos. La relación entre la cantidad de ADN obtenida y las sales, A260/A230, tiene sus valores óptimos entre 1,8 y 2,2. Valores menores de 1,8 tanto en el caso de las relaciones absorción ADN/proteínas como absorción ADN/sales indican muestras con un mayor nivel de contaminación y menor pureza.

Dentro de los diferentes tipos de cuantificación, la espectrofotométrica es la más adecuada para medir la concentración de ADNa, ya que es capaz de medir la concentración y calidad de ADN con un muy bajo volumen de la muestra. Si bien es cierto que tiene desventajas frente a otras metodologías de cuantificación que son capaces de valorar discriminar entre ADN de hebra única y de doble hebra, éstas metodologías requieren volúmenes de muestra más altos. Adicionalmente, se procedió a valorar la degradación mediante la observación del tamaño de los fragmentos de cada muestra tras migración en gel de agarosa.

### Equipos utilizados en la cuantificación espectrofotométrica

#### **NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer**

THERMO FISHER SCIENTIFIC, Cat N°: NC9904842

Waltham, MA, USA

#### **3.2.1.5 Amplificación por PCR del ADNmt**

Se realizó la amplificación por PCR de una región especie-específica del gen mitocondrial *cyt b* y posteriormente de un fragmento de la región control del ADNmt en muestras de ADN pertenecientes a individuos bovinos y ovicaprinos prehistóricos. En el caso de los bóvidos, los fragmentos analizados en este estudio se encuentran entre las bases mitocondriales 14.600 y 14.804 del gen del *cyt b* y entre las bases 15.950 a 16.307 de la región control. En el caso de los ovicaprinos la región analizada se encuentra entre las bases 14.245 y 14.449 del gen del *cyt b* y 15.508 a 15.610 de la región control.

La amplificación se llevó a cabo utilizando las parejas de cebadores que se muestran en la tabla 3. El diseño de estos cebadores para amplificar y secuenciar el ADN, el análisis de presencia de dímeros de cebadores, horquillas y otras estructuras secundarias se realizó con el programa PerlPrimer v.1.1.17 (Marshall et al. 2004).

**Tabla 3.** Listado de cebadores utilizados para la amplificación de las regiones del *cyt b* y la región control en *Bos taurus* y *Ovis aries*.

Muestras Bovino	Nombre	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
cyt b	L14244-OV	25	CTCCCAGCTCCATCAAATATTTTCAT	61.53	Presente estudio
	H14343-OV	24	CAAATGTGGGTTACAGAGGAGAAT	61.10	Presente estudio
	L14337-OV	25	GCAATACACTATACACCTGACACAA	61.39	Presente estudio
	H14448-OV	23	CATAGTATAGGCCTCGTCCCTACA	60.83	Presente estudio
D-Loop	L15967-BT	18	CCTACGCAAGGGGTAATG	57.57	Presente estudio
	H16143-BT	21	ATTAAGCTCTGTGATCTAATGG	55.74	Presente estudio
	L16124-BT	23	CCGCAAATTCATTCTTGATAGTA	57.49	Presente estudio
	H16287-BT	19	TGGACCGTTTAGATGAGAT	55.53	Presente estudio

Muestras Ovino	Nombre	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
cyt b	L14244-OV	25	CTCCCAGCTCCATCAAATATTTTCAT	61.53	Presente estudio
	H14343-OV	24	CAAATGTGGGTTACAGAGGAGAAT	61.10	Presente estudio
	L14337-OV	25	GCAATACACTATACACCTGACACAA	61.39	Presente estudio
	H14448-OV	23	CATAGTATAGGCCTCGTCCCTACA	60.83	Presente estudio
D-Loop	L15508-OV	24	GCCTCTCCAGTATTAACCTTGCTA	60.67	Presente estudio
	H15609-OV	25	AAGACAGACATAAGATATGTTGGGT	60.61	Presente estudio

Se utilizaron diferentes condiciones de amplificación en las muestras prehistóricas, Se hizo un mix diferente, con condiciones diferentes para la amplificación de la región control y para la amplificación de la región del gen *cyt b* analizado.

La región control fue amplificada con la siguiente mezcla de reacción:

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	4,65 µL
dNTPs (2,5 mM)	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
Cebador F (12,5 µM)	0,25 µL
Cebador R (12,5 µM)	0,25 µL
BSA (10 mg/mL)	1 µL
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,2 µL
<u>ADN*</u>	<u>3 µL</u>
TOTAL	25 µL

\*El ADN de las muestras prehistóricas no fue cuantificado debido a su concentración de ADN se sitúa por debajo del límite de detección del método de cuantificación utilizado.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos
- |   |   |             |
|---|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 94,5°C durante 45 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 55°C durante 60 segundos.</li> <li>▪ Elongación a 72°C durante 60 segundos.</li> </ul> | } | x 37 Ciclos |
|---|---|-------------|
- Elongación Final a 72°C durante 10 minutos.
- En espera a 15°C ∞

La amplificación del gen *cyt b* se llevó a cabo mediante la siguiente mezcla de reacción:

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	14,65 µL
dNTPs (2,5 mM)	2 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
Cebador F (12,5 µM)	0,4 µL
Cebador R (12,5 µM)	0,4 µL
BSA (10 mg/mL)	0,4 µL
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,4 µL
<u>ADN*</u>	<u>3 µL</u>
TOTAL	25 µL

\*El ADN de las muestras prehistóricas no fue cuantificado debido a su concentración de ADN se sitúa por debajo del límite de detección del método de cuantificación utilizado.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 11 minutos

- Desnaturalización a 94°C durante 35 segundos.
- Anillamiento a 60°C durante 60 segundos. (-1°C/ ciclo)
- Elongación a 72°C durante 50 segundos.

} x 10 Ciclos

- Desnaturalización a 94°C durante 35 segundos.
- Anillamiento a 50°C durante 50 segundos.
- Elongación a 72°C durante 50 segundos.

} x 37 Ciclos

- Elongación Final a 72°C durante 10 minutos.
- En espera a 15°C ∞

### Reactivos y equipos utilizados en la amplificación de ADN de muestras prehistóricas.

#### Reactivos

##### **Solución equimolecular de dNTPs, 25mM**

nº: BIO-39028

Barcelona, España

##### **MgCL<sub>2</sub> (Cloruro de Magnesio), 50 mM**

BIOLINE, Cat nº: BIO-21040

Barcelona, España

##### **Buffer 10X NH<sub>4</sub> sin MgCL<sub>2</sub>**

BIOLINE, Cat nº: BIO-21040

Barcelona, España

#### Equipos

**Termociclador C1000™** BIOLINE, Cat

**Thermal cycler**

BIO-RAD, Cat nº: 184-1000

Alcobendas, España



### **Cebadores F y R, 10 nmoles**

IDT (Conda)

Leuven, Bélgica

### **BSA, 10 mg/mL**

SIGMA-ALDRICH, Cat nº: 10711454001

Madrid, España

### **Biotaq Polimerasa, 5 U/ $\mu$ L**

BIOLINE, Cat nº: BIO-21040

Barcelona, España

### **3.2.1.6 Geles de agarosa.**

La comprobación de la correcta amplificación, se realizó por migración electroforética del producto de PCR en un gel de agarosa al 1,5% en solución TBE 1X. El gel contiene 0,003% de GelRed™ que en contacto con el ADN y al ser irradiado con luz UV de 254 nm, emite fluorescencia. La emisión de fluorescencia indica la presencia de ADN y por lo tanto permite evaluar si ha tenido lugar una correcta amplificación. Se carga en cada pocillo del gel 2  $\mu$ L del producto de amplificado junto con 1  $\mu$ L de la solución de carga. También se cargan las muestras del control positivo, negativo, así como un control de tamaño del ADN o ladder. El ladder utilizado cuenta con bandas entre las 100 pb y 1.000 pb y nos permite conocer el tamaño concreto de un producto de amplificado.

Posteriormente se realiza una migración electroforética del gel con una cuba Wide-Sub Cell GT a 100V constantes durante 30 minutos. Es los casos en los que se prepara un gel de 96 pocillos la migración se realizará a 34-36 mA constantes durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se introduce el gel en un sistema de fotodocumentación en el que gracias a la irradiación con luz UV se puede observar la presencia de ADN y realizar una estima de la cantidad de producto amplificado mediante la comparación con la banda de tamaño similar del ladder.

**Reactivos y equipos utilizados en la preparación de los geles de agarosa.**

Reactivos	Equipos
<p><b>Agarosa D-1 Baja EEO</b> CONDALAB, Cat Nº: 8016 Madrid, España</p>	<p><b>Campana de extracción de gases</b> BURDINOLA, Mod: OR-ST 1200 Amoroto, España</p>
<p><b>Tris base (Tris (hidroximetil)-aminometano)</b> AFFIMETRIX, Cat Nº: 75825, P.m. = 121,14 High Wycombe, UK</p>	<p><b>Cuba de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT</b> BIO-RAD, Cat Nº: 170-4405 Alcobendas, Madrid</p>
<p><b>EDTA-Na<sub>2</sub> (Ac. Etilendiaminotetraacético sal disódica dihidratada)</b> SIGMA-ALDRICH, Cat Nº: E-5134, P.m.= 372,24 Madrid, España</p>	<p><b>Wide Mini Sub<sup>®</sup> Cell GT<sup>2</sup> Horizontal Electrophoresis System</b> BIO-RAD, Cat Nº: 1640301 Alcobendas, Madrid</p>
<p><b>Ácido bórico</b> PANREAC, Cat Nº: 131015, P.m. = 61,83 Castellar del Vallés, España</p>	<p><b>Sistema de fotodocumentación de geles UVIdoc D55 LCD 20M</b></p>
<p><b>GelRed<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain (10,000X in Water)</b> BIOTIUM, Cat Nº: 41003 Hayward, CA, USA</p>	<p>UVItec, Cat Nº: U-1642-4542 Cambridge, UK</p>
<p><b>Azul de bromofenol</b> SIGMA-ALDRICH, Cat Nº: B-6896 Madrid, España</p>	

### **Xilencianol**

MERCK, Cat Nº: 1.10590, P.m. = 538,61

Madrid, España

### **Marcador molecular de 100 pb**

BIOTOOLS, Cat Nº: 31.006

Madrid, España

### **Soluciones para preparación de geles de agarosa**

Solución de carga (azul de carga): EDTA 0,5 M pH=8; glicerol 80% v/v; azul de bromofenol 25% w/v; xilencianol 25% w/v.

Solución TBE 10X: Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM. Esta solución se prepara en 600 mL de H<sub>2</sub>O milliQ en el que se disuelven 108 g de tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8 y finalmente se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ. Antes de ser utilizado el TBE debe ser autoclavado.

#### **3.2.1.7 Purificación de los productos de amplificación.**

Los productos de amplificado requieren una purificación antes de ser sometidos a secuenciación. Esta purificación se hizo mediante la adición de dos enzimas: Exonucleasa I (Exo I) y Shimp alkaline phosphatase (SAP). El enzima Exo I degrada los fragmentos de ADN de hebra sencilla, como cebadores sobrantes; SAP desfosforila los dNPTs no utilizados en la reacción de PCR.

La limpieza con Exo-SAP se llevó a cabo en 10 µL de cada muestra amplificada, a las que se añadieron 2,5 µL de SAP (1 U) y 0,5 µL de Exo I (5 U). Posteriormente se introducen las muestras en un termociclador a 37°C durante 30 minutos para que las enzimas actúen y a 80°C durante 15 minutos para desactivarlas.

**Reactivos y equipos para purificación de los productos de amplificación.**

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<b>Exonucleasa I, 5 U</b>	<b>Termociclador C1000™ Thermal Cycler</b>
TAKARA, Cat Nº: 2650A	BIO-RAD, Cat Nº: 184-1000
St. Germain en Lays, Francia	Alcobendas, España
 <b>SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), 1 U</b>	
TAKARA, Cat Nº: 2660A	
St. Germain en Lays, Francia	

**3.2.1.8 Reacción de PCR de secuenciación; Big Dye Terminator.**

La reacción de PCR de secuenciación está basada en el método desarrollado por Sanger et al. (1977), también llamado método de terminación de dideoxynucleotidos (ddNTP). Utilizando un termociclador se aplican ciclos de desnaturalización, anillamiento del cebador y extensión. A lo largo de los ciclos se van introduciendo aleatoriamente los ddNTP marcados fluorescentemente que debido a la ausencia de un grupo OH en la posición 3' de la ribosa detienen la elongación del ADN. De esta forma se producirán amplificadores de todos los tamaños posibles, desde el cebador más un nucleótido ddNTP hasta la molécula que abarca la longitud completa del amplificado. La detección ddNTP marcado de cada uno de los fragmentos permitirá obtener la secuencia completa del fragmento de ADN previamente amplificado.

Esta reacción de secuenciación se llevó a cabo mediante el kit Big Dye® Terminator (BDT), que está compuesto por todos los reactivos necesarios a excepción de los cebadores específicos de la zona que se quiera secuenciar. Las parejas de cebadores utilizados se muestran en la tabla 3. Se añadió una concentración final de 10 ng de ADN por lo que dependiendo de la concentración del ADN habrá que ajustar el volumen de ADN y H<sub>2</sub>O MilliQ añadidos.

Volumen utilizado de cada reactivo para la realización de la reacción PCR de secuenciación:

Big Dye Terminator V3.1 Ready Reaction Mix	1,5 µL
Cebador (12,5 µM)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O MilliQ	~ 6 µL
Producto PCR	V correspondiente a ~10 ng
TOTAL	10 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler 9800 Fast de Applied Biosystems utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 96°C durante 1 minuto
  
- |  |   |             |
|--|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 96°C durante 10 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 50°C durante 5 segundos.</li> <li>▪ Elongación a 60°C durante 75 segundos.</li> </ul> | } | x 25 Ciclos |
|--|---|-------------|
  
- En espera a 15°C ∞

### Reactivos y equipos para la PCR de secuenciación.

Reactivos	Equipos
<p><b>BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit</b></p> <p>APPLIED BIOSYSTEMS, Cat Nº: 4337455</p> <p>Madrid, España</p>	<p><b>Termociclador GeneAmp® PCR Cycle System 9800 Fast Thermal Cycler</b></p> <p>APPLIED BIOSYSTEMS, Cat Nº:4352604</p> <p>Madrid, España</p>

**Cebadores F y R, 10 nmoles**

IDT (Conda)

Leuven, Bélgica

**3.2.1.9 Purificación de los productos de la reacción BDT.**

Se utilizó Big Dye Xterminator® purification Kit para eliminar los productos sobrantes de la reacción de BDT tales como; sales, dNTPs y ddNTPs y así evitar posibles interferencias en los resultados posteriores de la secuenciación.

El Big Dye Xterminator® purificación Kit se añadió directamente sobre el producto de reacción de BDT, añadiendo 22,5 µL de SAM™ y 5 µL de Xterminator® solution. Se somete a agitación a 2.200 rpm durante 30 minutos. Finalmente se centrifuga durante 2 minutos a 1.000xg y se recoge el sobrenadante el cual contiene los amplificados marcados para su posterior secuenciación.

**Reactivos y equipos para la purificación de los productos de la reacción BDT.**

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<b>BigDye XTerminator® Purification Kit</b>	<b>Agitador IKA® MS 3 digital</b>
APPLIED BIOSYSTEMS, Cat Nº: 4376486	SIGMA-ALDRICH, Cat Nº: 3319001
Madrid, España	Madrid, España
	<b>Centrifuga Sigma 2-6</b>
	SARTORIUS, Cat Nº: 10223
	Madrid, España

**3.2.1.10 Secuenciación del ADN mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático.**

La secuenciación del ADN se realizó mediante electroforesis capilar usando un secuenciador automático ABI3130 de Applied Biosystems. Se utilizó un capilar de 36 cm con polímero POP7™ (Performance Optimized Polymer 7).

Para realizar la secuenciación se añadieron 5 µL del producto del amplificado de secuenciación purificado de cada muestra y 5 µL de formamida HI-DI™. Finalmente se dio un pulso de centrifugación el fin de evitar burbujas que puedan interferir en la secuenciación.

Se utilizaron los valores establecidos por el fabricante para el análisis de secuencias en este equipo:

- Voltaje de inyección: 1,2 Kv
- Tiempo de inyección: 12 segundos
- Voltaje de análisis: 8,5 Kv
- Tiempo de análisis: 2.780 segundos

### **Reactivos y equipos para la purificación de los productos de la reacción BDT.**

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<b>Hi-Di Formamide™</b> APPLIED BIOSYSTEMS, Cat Nº: 4311320 Madrid, España	<b>ABI 3130 Genetic Analyzer</b> APPLIED BIOSYSTEMS, Cat Nº: 3130-01 Madrid, España
	<b>Centrifuga Sigma 2-6</b> SARTORIUS, Cat Nº: 10223 Madrid, España

#### **3.2.1.11 Tratamiento informático de las secuencias: Análisis, edición y alineamiento.**

El tratamiento informático de las secuencias se realizó con programas específicos para cada una de las acciones realizadas. El análisis inicial y la asignación de las bases de cada secuencia se realizó mediante el software Sequencing analysis v. 5.2 (Applied Biosystems). Posteriormente se comprobaron y editaron las secuencias mediante el software ChromasPro v.1.7.4. (Technelysium). Se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias analizadas en nuestro estudio junto con las muestras

de referencia de cada una de las especies analizadas: La muestra denominada RBS (reference bovine sequence) (Anderson et al. 1982) para *Bos taurus* y la muestra NC\_001941.1 (Hiendleder et al. 1998b) para *Ovis aries*; se utilizaron para ello los softwares de alineamiento múltiple de secuencias ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al. 2007) y SeaView v.4.3.0 (Gouy et al. 2010).

### **3.2.2 Análisis molecular de muestras modernas.**

En los diferentes estudios realizados en muestras modernas se ha analizado tanto ADN como ARN. Se analizó ADNmt tanto con fines de clasificación filogenética como de identificación de especies. Adicionalmente, se analizaron varios polimorfismos de longitud de loci microsatélites (STRs) localizados en el ADN nuclear de *Bos taurus* para conocer el parentesco entre las muestra analizadas. El ARN analizado también corresponde a genes mitocondriales; la finalidad del análisis de ARN fue cuantificar la expresión génica de los genes mitocondriales *cyt b*, *COI*, *ND1* y *ND2* en *Ovis aries*.

#### **3.2.2.1 Análisis de ADN**

##### **3.2.2.1.1 Extracción de ADN**

###### **3.2.2.1.1.1 Extracción de ADN mediante kits comerciales**

La extracción del ADN mediante kits específicos se ha realizado de cuatro matrices diferentes: sangre, saliva, heces y tejido muscular. Dependiendo de la especie, su manejabilidad y su estado se seleccionaron diferentes tipos de matrices para la recogida de muestras. Las matrices utilizadas en cada una de las especies utilizadas se detallan en la tabla 1 del **Estudio 4**.

El ADN de cada matriz fue extraído con kits comerciales específicos para cada una de las matrices y el procedimiento de extracción se realizó en todos los casos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y dentro de una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.



Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena coccígea de vacas y ovejas en tubos de 10 mL BD Vacutainer con EDTA por veterinarios autorizados. El ADN fue extraído por el método de precipitación salina, se utilizó el kit comercial Gentra Puregene blood kit.

Las muestras de saliva se tomaron mediante hisopos de algodón estéril que se introducen en la boca durante 30 segundos para ser empapados con la saliva del animal. Posteriormente se utilizó la técnica del doble vial para recoger el volumen de saliva retenido en el hisopo y pasarlo a un tubo Eppendorf. El ADN fue extraído por el método de precipitación salina, se utilizó el kit comercial Gentra Puregene blood kit, con la diferencia que se evitó el primer paso de lisis de hematíes del protocolo recomendado por el fabricante para muestras sanguíneas.

Las muestras de tejido muscular se tomaron de animales sacrificados con fines alimentarios y cinegéticos. Se tomaron 5 mg de cada muestra de tejido muscular, cuyo ADN fue extraído por precipitación salina con el kit comercial Gentra Puregene tissue kit (Qiagen).

Las muestras de heces se tomaron de animales en estado de libertad controlada en el Parque de la conservación de Cabárceno (Cantabria). Se tomaron muestras de heces por parte del personal del Parque. Para la realización de la extracción de heces se tomaron de 200 mg de heces cada especie. El ADN se extrajo mediante el kit comercial QIamp DNA stool mini kit (Qiagen).

### Reactivos y equipos para la extracción de ADN.

Reactivos	Equipos
<b>Gentra Puregene blood kit</b> QIAGEN, Cat Nº: 158389 L'Hospitalet de Llobregat, España	<b>Cabina de flujo laminar</b> TELSTAR Mod. AV-100 Terrassa, España
<b>Gentra Puregene tissue kit</b> QIAGEN, Cat Nº: 158689	<b>Termoagitador Thermomixer®</b> <b>Confort</b>

L'Hospitalet de Llobregat, España

EPPENDORF Cat N°: 5355000.011

Madrid, España

### **Gentra Puregene stool mini kit**

QIAGEN, Cat N°: 51504

L'Hospitalet de Llobregat, España

### **Concentrador de ADN,**

#### **DNA mini**

HETO, Mod. 23900E

Madrid, España

### **3.2.2.1.1.2 Extracción de ADN por precipitación salina a partir de Sangre**

Se comienza la extracción añadiendo 20 mL de sangre en un tubo Falcon de 50 mL, se centrifugan las muestras a 1500xg durante 15 min y se retira el plasma sobrenadante. Posteriormente se añaden 10 mL de PBS, se invierten los tubos para mezclarlo homogéneamente y se incuban a temperatura ambiente durante 30 min en un agitador de rodillos. A continuación se añaden 30 mL de RBC lysis y se vuelve a colocar durante 10-30 min en el agitador de rodillos para una óptima lisis de los eritrocitos.

Se centrifugan las muestras a 2000xg durante 5 min, se elimina el sobrenadante dejando el sedimento (en adelante *pellet*) y 200-400 µL de líquido residual. Se homogeniza la solución en un agitador vórtex vigorosamente para resuspender las células. Posteriormente se añade 1 mL de Pre Cell Lysis solution, se vuelve a homogenizar la solución en un agitador vórtex y se añaden 9 mL de Cell Lysis solution para provocar la lisis de las células, que pueden estar en esta fase durante al menos 2 años a temperatura ambiente.

Para continuar con la extracción se agitan las muestras en el vórtex a alta velocidad durante 20 seg y a continuación se incuban a 37°C durante el tiempo que sea necesario hasta que no se observen restos celulares en suspensión. Posteriormente se enfrían las muestras a temperatura ambiente introduciéndolas en hielo durante 4 min aproximadamente, se añaden 3.33 mL de Protein Precipitation Solution y se homogenizan con agitador vórtex vigorosamente a alta velocidad durante 20 seg. Finalmente se centrifuga a 2000xg durante 6 min. La precipitación de proteínas tendrá forma

de *pellet* compacto de color marrón oscuro. Si el *pellet* de proteínas no es compacto, repetir el paso anterior, seguido de una nueva incubación en hielo durante 5 minutos y se repite la centrifugación.

Posteriormente se decanta el sobrenadante que contiene el ADN a de un tubo Falcon estéril de 50 mL que contenga 10 mL de isopropanol al 100%, con cuidado de no pasar el *pellet* con las proteínas precipitadas. Se mezcla la muestra invirtiéndola suavemente unas 50 veces. Tras este paso será visible la nube de ADN resuspendido. Se centrifuga a 2000xg durante 3 min; el ADN se observará como un *pellet* blanco. Se elimina el sobrenadante y se pone el tubo invertido sobre papel absorbente limpio para secarlo durante unos minutos. Por último se añaden 10 mL de etanol al 70%, se invierte el tubo varias veces para lavar el *pellet* de ADN, se centrifuga a 2000xg durante 1 min, se decanta el etanol con precaución observando que el *pellet* no se caiga y se inclinan los tubos sobre papel absorbente para eliminar el resto de alcohol a temperatura ambiente.

Finalmente se añade 1 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril para resuspender el ADN y se incuban en el baño a 65°C de 1 a 2 horas y posteriormente se dejan a temperatura ambiente toda la noche en agitación, para que el ADN se disuelva completamente.

### Reactivos y equipos para la extracción de ADN.

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<p><b>NaCl (Cloruro sódico)</b>                      MERCK, Cat N°: 106404, P.m. = 58,44                      Madrid, España</p>	<p><b>Centrífuga Allegra X-12</b>                      BECKMAN COULTER, Cat N°:                      41103904                      L'Hospitalet de Llobregat, España</p>
<p><b>KCl (Cloruro potásico)</b>                      PANREAC, Cat N°: 131494.1210, P.m. = 74,56                      Castellar del Vallés, España</p>	<p><b>Baño Termostato, Unitronic OR</b>                      GRUPO SELECTA, Cat N°: 6032011                      Abrera, España</p>
<p><b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sodio fosfato dibásico anhidro)</b>                      PANREAC, Cat N°: 131679.1210, P.m. = 141,96</p>	<p><b>Agitador de rodillos, Blood Mixer</b></p>

Castellar del Vallés, España

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Potasio di-hidrógeno fosfato)**

PANREAC, Cat N°: 131509.1210, P.m. = 136,09

Castellar del Vallés, España

**Reactivos**

**EDTA-Na<sub>2</sub> (Ac. Etilendiaminotetraa disódica dihidratada)**

ALDRICH, Cat N°: E-5134, P.m. = 372,24

Madrid, España

**Tris base (Tris (hidroximetil)-amin)**

AFFIMETRIX, Cat N°: 75825, P.m. = 121,14

High Wycombe, UK

**SDS (Sodio dodecil sulfato)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: L-4390, P.m. = 288,38

Madrid, España

**NaAc (Acetato sódico)**

MERCK, Cat N°: 106268, P.m. = 82,03

Madrid, España

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulfato de amonio)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: A-4418, P.m. = 132,14

Madrid, España

**NH<sub>4</sub>Cl (Cloruro de amonio)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: A-9434, P.m. = 53,49

Madrid, España

LABOLAN, Cat N°: C53259

Esparza de Galar, España

**Agitador Vórtex**

VWR, Cat N°:444-1372

Linars del Vallés, España

**Reactivos**

**Isopropanol (2-propanol)**

SCHARLAB, Cat N°: AL03111000, SIGMA-

P.m. = 60,10

Gentmenat, España

**Etanol absoluto**

SCHARLAB, Cat N°: ET0005, P.m. = 46,07

Gentmenat, España

### **NH<sub>4</sub> CO<sub>3</sub> (Carbonato de amonio)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: A-9516, P.m. = 96,09

Madrid, España

### **Soluciones para la extracción de ADN**

**Solución PBS o tampón fosfato salino 10X:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,14 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17,6 mM. Se prepara un volumen de 1 L de PBS 10X como stock, para el que hace falta 600 mL de H<sub>2</sub>O milliQ donde se disuelven 80 g de cloruro sódico, 2 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Finalmente se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ y se autoclava.

**Solución RBC:** Se añaden 2mL/L de EDTA (0.5M, pH8), 7,007 gr de NH<sub>4</sub>CL y 0,071 gr de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ y se autoclava.

**Solución Pre Cell Lysis:** Se prepara una disolución de NaCl 1M en H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se conserva a temperatura ambiente.

**Solución Tris-EDTA:** Se añaden 12,1 gr de Tris, 3,72 gr de EDTA-Na<sub>2</sub> y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ y se autoclava.

**Solución de SDS:** 10% peso/volumen en H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se conserva a temperatura ambiente.

**Solución Cell Lysis:** Se añaden 10 mL de la solución Tris-EDTA, 50 mL de EDTA-Na<sub>2</sub>, 50 mL de la solución de SDS y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ.

**Solución Protein Precipitation:** Se añaden 24,6 gr de NaAc 3M y 39,63 gr de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ.

### 3.2.2.1.1.3 Extracción de ADN por precipitación salina a partir de Tejido

Se toman 0,2 g de tejido y se añaden a un tubo eppendorf de 2 mL, donde también se añaden 58 mL Buffer Pre Cell Lysis solution, 530 mL de Cell Lysis Solution y 12uL de la solución de Proteinasa K para iniciar la lisis celular. Estas muestras se incuban a 55°C y se agitan a 750 rpm en un termoagitador durante una noche.

Para continuar con la extracción se enfrían las muestras en hielo durante 1 min, se añaden 200uL de Protein Precipitation y se homogeniza en un agitador vórtex 20 seg; posteriormente se centrifuga durante 1 min a 13000-16000xg. En un segundo tubo Eppendorf de 1,5 mL se añaden 600 uL de isopropanol frío (mantenido a -20°C y se añade el sobrenadante de la centrifugación previa. Se voltea 30 seg para permitir la mezcla entre el sobrenadante y el isopropanol y así favorecer la precipitación del ADN.

Se centrifuga la muestra 1 min a 13000-16000xg y se desecha el sobrenadante sin perder el *pellet* que contiene el ADN. Posteriormente se añaden 300uL de etanol al tubo con el *pellet* y se voltea varias veces. Se vuelve a centrifugar 1 min a 13000-16000xg y se vuelve a desechar el sobrenadante sin perder el *pellet* que contiene el ADN. Se deja secar a temperatura ambiente durante unos minutos. Finalmente se resuspende el *pellet* en 40 µL de H2O mQ estéril.

#### Reactivos y equipos para la extracción de ADN.

Reactivos	Equipos
<p><b>Proteinasa K</b>                      PROMEGA, Cat N°: V3021                      Madrid, España</p>	<p><b>Termoagitador EPPENDORF Mod.</b>  <b>Thermomixer® confort,</b>                      EPPENDORF , Cat N°: 5355000.011                      Madrid, España</p>
<p><b>NaCl (Cloruro sódico)</b>                      MERCK, Cat N°: 106404, P.m. = 58,44                      Madrid, España</p>	<p><b>Minicentrifuga de tubos eppendorf</b>  <b>Microfuge 16</b></p>

**EDTA-Na<sub>2</sub>**

**(Ac. Etilendiaminotetraacético sal disódica dihidratada)**

SIGMA-ALDRICH,

Cat N°: E-5134, P.m. = 372, 24

Madrid, España

BECKMAN COULTER, Cat N°: 270-605133A

L'Hospitalet de Llobregat, España

**Agitador Vórtex**

VWR, Cat N°:444-1372

Linars del Valles, España

**Tris base (Tris (hidroximetil)-aminometano)**

AFFIMETRIX, Cat N°: 75825, P.m. = 121,14

Hihg Wycombe, UK

**SDS (Sodio dodecil sulfato)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: L-4390, P.m. = 288,38

Madrid, España

**NaAc (Acetato sódico)**

MERCK, Cat N°: 106268, P.m. = 82,03

Madrid, España

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulfato de amonio)**

SIGMA-ALDRICH, Cat N°: A-4418, P.m. = 132,14

Madrid, España

**Isopropanol (2-propanol)**

SCHARLAB, Cat N°: AL03111000, P.m. = 60,10

Gentmenat, España

**Etanol absoluto**

SCHARLAB, Cat N°: ET0005, P.m. = 46,07

Gentmenat, España

### Soluciones para la extracción de ADN

**Solución Pre Cell Lysis:** Se prepara una disolución de NaCl 1M en H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se conserva a temperatura ambiente.

**Solución Tris-EDTA:** Se añaden 12,1 gr de Tris, 3,72 de EDTA-Na<sub>2</sub> y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ y se autoclava.

**Solución de SDS:** 10% peso/volumen en H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se conserva a temperatura ambiente.

**Solución Cell Lysis:** Se añaden 10 mL de la solución Tris-EDTA, 50 mL de EDTA-Na<sub>2</sub>, 50 mL de la solución de SDS y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ.

**Solución Protein Precipitation:** Se añaden 24,6 gr de NaAc 3M y 39,63 gr de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Na<sub>2</sub> y se lleva el volumen final hasta 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ.

**Solución de proteinasa K:** 10 mg/mL en Tris 10 mM, pH= 8. Se conserva a -20°C.

#### **3.2.2.1.2 Cuantificación del ADN**

La cuantificación del ADN es necesaria para conocer la cantidad y la calidad del ADN extraído. A diferencia de las muestras de ADN antiguo, la cantidad del ADN en las muestras actuales es elevada, por lo que se pueden realizar más de un tipo de cuantificación para tener valores más ajustados a la realidad. Se procedió a hacer dos tipos de cuantificaciones, la primera espectrofotométrica, que nos proporciona una valoración de la calidad y la pureza del ADN, pero no puede diferenciar entre el ADN de hebra única y el de doble hebra. Para cuantificar el ADN de doble hebra se procede a una segunda cuantificación mediante la técnica de la fluorimetría, que nos proporcionara una estimación más concreta de la cantidad de ADN de doble hebra.



### **3.2.2.1.2.1 Cuantificación espectrofotométrica**

La cuantificación espectrofotométrica se realizó con la intención de conocer la calidad y la pureza del ADN como se describe el apartado 3.2.1.4, “Cuantificación espectrofotométrica del ADN” para muestras antiguas.

### **3.2.2.1.2.2 Cuantificación fluorimétrica**

La cuantificación fluorimétrica permite la cuantificación del ADN de doble hebra utilizando el fluorocromo Picogreen®. Este fluorocromo tiene la capacidad de unirse únicamente al ADN de doble hebra y emite luminiscencia. Su pico máximo de excitación es a 503 nm y su pico máximo de emisión a 523 nm. La luminiscencia emitida en esta reacción es directamente proporcional a la concentración de ADN de doble hebra presente en cada muestra.

La cuantificación fluorimétrica requiere realizar una recta patrón donde se analizan varias diluciones seriadas del ADN de referencia del kit, en el rango entre 50 ng/mL y 25 pg/mL y una última muestra sin ADN, utilizada como blanco de cuantificación. Posteriormente se preparan las muestras, añadiendo 1 µL de ADN y 99 µL de Picogreen®. La muestra después de ser excitada mediante una longitud de onda de 480 nm, emite fluorescencia a 520 nm ya que son las longitudes de onda más cercanas a los picos máximos de excitación y emisión del fluorímetro utilizado. Finalmente se calculará la concentración de ADN problema a partir de la ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal.

### **Reactivos y equipos para la cuantificación de ADN.**

#### **Cuantificación fluorimétrica**

**Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA**

**Assay Kit**

THERMO FISHER, Cat N°: P7589

Waltham, MA, USA

#### **Cuantificación espectrofotométrica**

**NanoDrop™ ND-100**

**Spectrophotometer**

THERMO FISHER, Cat N°: NC9904842

Waltham, MA, USA

**DTX 880 Multimode Detector**

BECKMAN COULTER, Cat N°: 987921

L'Hospitalet de Llobregat, España

**3.2.2.1.3 Análisis de loci microsatélites (STRs)**

**3.2.2.1.3.1 Amplificación por PCR de los microsatélites**

Se procedió al análisis de microsatélites (STRs) de tres individuos de *Bos taurus* para verificar el parentesco materno filial que constaba en su genealogía. Se amplificaron las muestras de ADN bovinas con el kit específico Bovine Genotypes™ Panel 1.2, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C1000™ de Bio-Rad. El kit utilizado se usa para amplificar simultáneamente 11 microsatélites específicos bovinos recomendados por la ISAG: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 y BM1824.

Para la realización de la amplificación de los STRs bovinos incluidos en el Kit Bovine Genotypes™ Panel 1.2 se utilizaron los siguientes reactivos:

Bovine Genotypes Master Mix	2 µL
Bovine Genotypes Panel 1.2 Primer Mix	2 µL
ADN (2 ng/ µl)	1 µL
<b>TOTAL</b>	<b>5 µL</b>

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 98°C durante 1 minuto
  
  - Desnaturalización a 98°C durante 20 segundos.
  - Anillamiento a 60°C durante 75 segundos.
  - Elongación a 72°C durante 30 segundos.
- } x 30 Ciclos
- Elongación Final a 72°C durante 5 minutos.
  - En espera a 15°C ∞

### Reactivos y equipos para la extracción de ADN.

Reactivos	Equipos
<b>Bovine Genotypes™ Panel 1.2</b> SCIENTIFIC, Cat Nº: F-904S Waltham, MA, USA	<b>Termociclador C1000™ THERMO</b> <b>Thermal Cycler</b> BIO-RAD, Cat Nº: 184-1000 Alcobendas, España

#### **3.2.2.1.3.2 Comprobación del producto de amplificado.**

La comprobación de una correcta amplificación se realizó una migración electroforética en gel de agarosa al 1,5% en solución TBE 1X de los productos de amplificado tal y como se describe en el apartado 3.2.1.6 para muestras antiguas.

**3.2.2.1.3.3 Análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático.**

El análisis de los microsatélites se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems equipado con un capilar de 36 cm y utilizando el polímero POP7™ (Performance Optimized Polymer 7).

La migración se realizó añadiendo 3 µL del producto de amplificado, 9,5 µL de formamida HI-DI™ y 0,5 µL de GeneScan™ – 500LIZ® size Standard, este último utilizado como estándar de tamaño. Posteriormente se le dio un pulso en la centrifuga y se introdujo en un termociclador Bio-Rad para la desnaturalización mediante calentamiento a 96°C durante 6 minutos y posteriormente 4°C durante 4 minutos. Finalmente se volvió a dar un pulso en la centrifuga para evitar burbujas que puedan interferir con la posterior electroforesis.

Se utilizaron los valores establecidos por el fabricante para el análisis de fragmentos en este equipo:

- Voltaje de inyección: 1,2 Kv
- Tiempo de inyección: 16 segundos
- Voltaje de análisis: 15 Kv
- Tiempo de análisis: 1.200 segundos

**Reactivos y equipos para el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar.**

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<p><b>Hi-Di Formamide™</b>                      APPLIED BIOSYSTEMS, Cat N°: 4311320                      Madrid, España</p>	<p><b>ABI 3130 Genetic Analyzer</b>                      APPLIED BIOSYSTEMS, Cat N°: 3130-01                      Madrid, España</p>
<p><b>GeneScan™ – 500LIZ® size standard</b>                      BIOSYSTEMS, Cat N°: 4322682</p>	<p><b>Termociclador C1000™ Thermal APPLIED                      Cyler</b></p>

Madrid, España

BIO-RAD, Cat N°: 184-1000

Alcobendas, España

### **Centrifuga Sigma 2-6**

SARTORIUS, Cat N°: 10223

Madrid, España

#### **3.2.2.1.3.4 Análisis informático de los STRs**

El tratamiento informático de los electroferogramas resultantes se realizó mediante el software específico para el análisis de microsatélites Genemapper® Software v.4.0 de Applied Biosystems. Este programa permite asignar los alelos de cada individuo, que posteriormente se podrán comparar con otros perfiles y ver las posibles relaciones de parentesco.

#### **3.2.2.1.4 Análisis de secuencias del ADNmt**

##### **3.2.2.1.4.1 Amplificación por PCR**

En cada uno de los estudios se han analizado secuencias de regiones específicas del ADNmt dependiendo de los diferentes objetivos de cada estudio.

La región control en la especie *Bos taurus* es una región con una elevada tasa de mutación. Estos cambios acumulados a lo largo de la historia proporcionan una información filogenética de gran interés. También se analizó la región no codificante en tres individuos que podrían pertenecer al haplogrupo Q, para de esta forma verificar los polimorfismos existentes fuera de la región control y realizar una correcta asignación del haplogrupo Q.

Todas las muestras analizadas, tanto en la región control como en la región codificante se amplificaron utilizando la pareja de cebadores de la tabla 4 con los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	15,1 μL
dNTPs (2,5 mM)	0,5 μL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 μL
Buffer (10X)	2,5 μL
Cebador F (5 μM)	0,5 μL
Cebador R (5 μM)	0,5 μL
BSA (10 mg/mL)	1 μL
Taq polimerasa (5 U/μl)	0,15 μL
<u>ADN (10 ng/μL)</u>	<u>4 μL</u>
TOTAL	25 μL

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para el análisis de la región control de *Bos taurus*.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15751	15731	15751	21	GAAGAAACTGCAGTCTCACC	58.95	Presente estudio
H401	401	421	21	AGTTGGGAGACTCATCTAGG	58.02	Presente estudio

Se utilizaron dos conjuntos de cebadores parcialmente iguales para el análisis de la región codificante del ADNmt, el primero se utilizó para amplificar el ADNmt completo, mientras que el segundo, únicamente se centra en las posiciones específicas del haplogrupo Q, por lo que tiene menor cantidad de cebadores y por lo tanto de reacciones de secuenciación. (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Cebadores utilizados para el análisis del ADNmt completo de *Bos taurus*.

PCR Numero ID	Longitud fragmento (pb)	Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
1	1,138	15718for	15718	15741	24	CCTAAGACTCAAGGAAGAAACTGC	59.95	Achilli <i>et al.</i> 2008
		517rev	517	496	22	AACCTAGAGGGCATTCTCACTG	59.77	Achilli <i>et al.</i> 2008
2	1,935	312for	312	335	24	CAATTTAGCACTCCAACAAGTC	59.27	Achilli <i>et al.</i> 2008
		2246rev	2246	2225	22	TTTCCTTAGATGCACTCCTGTG	59.38	Achilli <i>et al.</i> 2008
3	1,843	1807for	1807	1828	22	TAGCTGGTTGTCCAGAAAATGA	59.75	Achilli <i>et al.</i> 2008
		3649rev	3649	3630	20	TATTGCTAGAGGCCATGCTG	59.04	Achilli <i>et al.</i> 2008
4	1,861	3339for	3339	3360	22	GCCTAGCCTTAACCATGTGAAT	59.53	Achilli <i>et al.</i> 2008
		5199rev	5199	5178	22	TTATGTTGTTTGTGGAGGAAA	59.36	Achilli <i>et al.</i> 2008
5	1,869	4922for	4922	4943	22	TATAGCCAATCCACCACCACT	60.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
		6790rev	6790	6768	23	GTGAAGAACAATATCGAGGGAAG	59.15	Achilli <i>et al.</i> 2008
6	1,901	6525for	6525	6546	22	TCGGATTCTAGTTTCATCGT	59.97	Achilli <i>et al.</i> 2008
		8425rev	8425	8406	20	GGAGGGTTACAAGCGATTG	59.57	Achilli <i>et al.</i> 2008
7	1,849	8109for	8109	8132	24	CATACTCTCCTTGGTGACATGC	59.92	Achilli <i>et al.</i> 2008
		9957rev	9957	9938	20	TCCTATGGGGTCAAATCCAC	59.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
8	1,881	9599for	9599	9620	22	TGGGTCCACCTTCTTAATTGTC	60.22	Achilli <i>et al.</i> 2008
		11479rev	11479	11460	20	AATCATAAGGGCGGTGCTC	61.33	Achilli <i>et al.</i> 2008
9	1,89	11201for	11201	11220	20	ATCGCAGGCTCCATAGTCCT	61.15	Achilli <i>et al.</i> 2008
		13090rev	13090	13069	22	GGAGGAAGCTAGGTAAGGTTG	58.48	Achilli <i>et al.</i> 2008
10	1,876	12750for	12750	12771	22	TGGACTAGCATTAGCTGCAACC	61.65	Achilli <i>et al.</i> 2008
		14625rev	14625	14608	18	CCAGGAGGGAACCGAAAT	59.86	Achilli <i>et al.</i> 2008
11	1,751	14210for	14210	14231	22	TTCTGTAGCCATAGCCGTTGTA	59.80	Achilli <i>et al.</i> 2008
		15960rev	15960	15939	22	CCCTTGCGTAGGTAATTCATTC	59.86	Achilli <i>et al.</i> 2008

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para el análisis de las posiciones determinantes en la región control y codificante del Haplogrupo Q de *Bos taurus*.

PCR Numero ID	Longitud fragmento (pb)	Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
1	1,935	312for	312	335	24	CAATTTAGCACTCCAACAAAGTC	59.27	Achilli <i>et al.</i> 2008
		2246rev	2246	2225	22	TTTCCTTAGATGCACCTCCTGTG	59.38	Achilli <i>et al.</i> 2008
2	313	1273for	1273	1296	24	GTCACCCCTCCTCAAATAGATTCAG	54.90	Presente estudio
		1585rev	1585	1565	21	GTTCCCTTGCCGTACTTTCTC	55.70	Presente estudio
3	1061	2467for	2467	2486	20	AGTGAAATTGACCTTCCCCT	54.20	Presente estudio
		3527rev	3527	3504	24	CGATGAGATTGTTTGTGCTACTG	53.90	Presente estudio
4	1,861	3339for	3339	3360	22	GCCTAGCCTTAACCATGTGAAT	59.53	Achilli <i>et al.</i> 2008
		5199rev	5199	5178	22	TTATGTTGTTTGTGGAGGAAA	59.36	Achilli <i>et al.</i> 2008
5	259	5267for	5267	5287	21	CATAATACTACCACTCAGGCC	52.70	Presente estudio
		5525rev	5525	5506	20	GGAGAAGTAGATTGAAGCCA	51.60	Presente estudio
6	1,869	4922for	4922	4943	22	TATAGCCAATTCCACCACCACT	60.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
		6790rev	6790	6768	23	GTGAAGAACAATCGAGGGAAAG	59.15	Achilli <i>et al.</i> 2008
7	1,901	6525for	6525	6546	22	TCCGATTCTAGGTTTCATCGT	59.97	Achilli <i>et al.</i> 2008
		8425rev	8425	8406	20	GGAGGGTTACAAGCGATTG	59.57	Achilli <i>et al.</i> 2008
8	760	7819for	7819	7840	22	CAATCCGAATGTTAGTCTCTC	52.80	Presente estudio
		8578rev	8578	8556	23	GTGTTGTTGGTGTGAATGAATGG	55.00	Presente estudio
9	1,849	8109for	8109	8132	24	CATAACTCTCCTGGTGACATGC	59.92	Achilli <i>et al.</i> 2008
		9957rev	9957	9938	20	TCCTATGGGGTCAAATCCAC	59.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
10	798	10513for	10513	10533	21	ACCTCAACTACTCCAATGCT	53.80	Presente estudio
		11310rev	11310	11289	22	AATGGGTATGCTATAAAGTCGG	52.30	Presente estudio
11	738	12299for	12299	12319	21	CAAACCTGACACTGACTAACCA	52.40	Presente estudio
		13036rev	13036	13016	21	GTTGACTGGATGTGGAGAAGG	55.30	Presente estudio
12	1,876	12750for	12750	12771	22	TGGACTAGCATTAGCTGCAACC	61.65	Achilli <i>et al.</i> 2008
		14625rev	14625	14608	18	CCAGGAGGGAAACCGAAAT	59.86	Achilli <i>et al.</i> 2008
13	353	13871for	13871	13894	24	TCCTCTCCTCTTAATCACAAATCC	54.00	Presente estudio
		14223rev	14223	14202	22	TATGGCTACAGAACAGTATCCT	52.60	Presente estudio
14	621	15095for	15095	15114	20	AGTCCACCTACTATTCCTCC	52.70	Presente estudio
		15715rev	15715	15694	22	GGTTAGTTGTTCTCCTCTCTG	52.70	Presente estudio

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos
  - Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos.
    - Anillamiento a 58°C durante 60 segundos.
    - Elongación a 72°C durante 75 segundos.
- } x 32 Ciclos
- Elongación Final a 72°C durante 10 minutos.
  - En espera a 15°C ∞

La región control en la especie *Ovis aries* tiene una elevada tasa de mutación. Al igual que ocurre en



la especie *Bos taurus* estos cambios acumulados a lo largo de la historia proporcionan una información filogeográfica de gran interés.

Las muestras de la región control de *Ovis aries* analizadas en el **Estudio 2** se amplificaron utilizando la pareja de cebadores de la tabla 7 con los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	15,1 µL
dNTPs (2,5 mM)	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
Cebador F (5 µM)	0,5 µL
Cebador R (5 µM)	0,5 µL
BSA (10 mg/mL)	1 µL
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,15 µL
<u>ADN (10 ng/µl)</u>	<u>4 µL</u>
<b>TOTAL</b>	<b>25 µL</b>

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para el análisis de la región control de *Ovis aries*.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15376	15376	15396	21	CCAACCTCCCTAAGACTCAAG	58.95	Presente estudio
H30	30	50	21	GACTCATCTAGGCATTTTCAG	58.02	Presente estudio

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos

- |   |   |             |
|---|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 70°C durante 60 segundos. (-1°C/ ciclo)</li> <li>▪ Elongación a 72°C durante 90 segundos.</li> </ul> | } | x 10 Ciclos |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 94°C durante 25 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 60°C durante 60 segundos.</li> <li>▪ Elongación a 72°C durante 90 segundos.</li> </ul>               | } | x 25 Ciclos |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Elongación Final a 72°C durante 10 minutos.</li> <li>▪ En espera a 15°C ∞</li> </ul>   |   |             |

La región del gen mitocondrial *cyt b* fue analizada en una colección de 63 especies animales pertenecientes a 38 familias de 14 ordenes de 5 clases. Este gen ha sido altamente conservado por cada una de las especies a lo largo de la historia por lo que es un marcador ideal para la identificación de especies. En este caso se utilizaron cebadores universales o degenerados capaces de unirse y amplificar secuencias de origen similar pero con secuencias parcialmente diferentes.

Las muestras analizadas en el **Estudio 4** en la región del gen *cyt b* del ADNmt de 63 especies se amplificaron utilizando la pareja de cebadores de la tabla 8 con los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	12,5 µL
dNTPs (2,5 mM)	1,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
Cebador F (5 µM)	0,6 µL
Cebador R (5 µM)	0,6 µL
BSA (10 mg/mL)	1 µL
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3 µL
<u>ADN (10 ng/µl)</u>	<u>5 µL</u>
TOTAL	25 µL

**Tabla 8.** Cebadores universales utilizados para el análisis de 148 pb del gen *cyt b* en 63 especies.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15601	15889	15601	23	TACGCAATCCTACGATCAATTCC	61.06	Presente estudio
H15748	15748	15770	23	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTAG	59.81	Presente estudio

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 11 minutos
- |   |   |             |
|---|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 50°C durante 30 segundos.</li> <li>▪ Elongación a 72°C durante 45 segundos.</li> </ul> | } | x 32 Ciclos |
|---|---|-------------|
- Elongación final a 72°C durante 5 minutos.
- En espera a 15°C ∞

**Reactivos y equipos utilizados en la amplificación por PCR.**

Reactivos	Equipos
<p><b>Solución equimolecular de dNTPs, 25mM</b>                      Cat nº: BIO-39028                      Barcelona, España</p> <p><b>MgCl<sub>2</sub> (Cloruro de Magnesio), 50 mM</b>                      BIOLINE, Cat nº: BIO-21040                      Barcelona, España</p>	<p><b>Termociclador C1000™ Thermal BIOLINE, cycler</b>                      BIO-RAD, Cat nº: 184-1000                      Alcobendas, España</p>

**Buffer 10X NH<sub>4</sub> sin MgCl<sub>2</sub>**

BIOLINE, Cat nº: BIO-21040

Barcelona, España

**Cebadores F y R, 10 nmoles**

IDT (Conda)

Leuven, Bélgica

**BSA, 10 mg/mL**

SIGMA-ALDRICH, Cat nº: 10711454001

Madrid, España

**Biotaq Polimerasa, 5 U/μL**

BIOLINE, Cat nº: BIO-21040

Barcelona, España

***3.2.2.1.4.2 Geles de agarosa del producto de amplificado.***

La comprobación de una correcta amplificación se realizó una migración electroforética en gel de agarosa al 1,5% en solución TBE 1X de los productos de amplificado tal y como se describe en el apartado 3.2.1.6 para muestras antiguas.

***3.2.2.1.4.3 Purificación de los productos de amplificación.***

La purificación de los productos de amplificado se realizó para eliminar contaminantes antes de ser sometidos a secuenciación. Este proceso se realizó de la misma forma que se describe en el apartado 3.2.1.7 para muestras antiguas.

**3.2.2.1.4.4 Reacción de PCR de secuenciación; Big Dye Terminator.**

En todos los casos la reacción de PCR de secuenciación se llevó a cabo mediante el kit Big Dye® Terminator (BDT), descrita en el apartado 3.2.1.8 para ADN antiguo. Las condiciones del mix de PCR y los cebadores cambiaron dependiendo de los estudios.

La secuenciación del fragmento de la región control y región codificante de *Bos taurus* se llevó a cabo con los siguientes reactivos y cebadores (Tablas 9, 10 y 11):

Big Dye terminator V3.1 Ready reaction mix	1,5 µL
Cebador (5 µM)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O MilliQ	~ 6 µL
Producto PCR	V correspondiente a ~10 ng
<b>TOTAL</b>	<b>10 µL</b>

**Tabla 9.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar la región control de *Bos taurus*.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15751	15731	15751	21	GAAGAAACTGCAGTCTCACC	58.95	Presente estudio
L10	16326	10	22	GACATCTCGATGGACTAATGCC	61.11	Presente estudio

**Tabla 10.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar el ADNmt completo de *Bos taurus*.

PCR						Secuencia (5'-3')	Temperatura	Referencia
Numero ID	Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)		melting (C°)		
1	15757for	15757	15776	20	CCCCAAAGCTGAAGTTCTAT	56.05	Achilli <i>et al.</i> 2008	
1	16272for	16272	16291	20	TTCTTTCTTCAGGGCCATCT	58.86	Achilli <i>et al.</i> 2008	
2	1026rev	1026	1007	20	TAGCAAGAATTGGTGAGGTT	54.96	Achilli <i>et al.</i> 2008	
2	812for	812	829	18	TACAATAGCCGACGCACT	55.33	Achilli <i>et al.</i> 2008	
2	2163rev	2163	2142	22	GGTCAGAGTATTATCAGGCACT	55.11	Achilli <i>et al.</i> 2008	
3	1915for	1915	1934	20	GAAACGGATACAACCTTGAC	54.61	Achilli <i>et al.</i> 2008	
3	2435for	2435	2454	20	CACGAGGGTTTTACTGTCTC	54.85	Achilli <i>et al.</i> 2008	
3	2902for	2902	2921	20	ACGTATTTCTCCCAGTACGA	54.83	Achilli <i>et al.</i> 2008	
4	3420for	3420	3439	20	CCATATCAAGCCTAGCCGTA	57.90	Achilli <i>et al.</i> 2008	
4	3923for	3923	3940	18	GCATCCTACCCTCGATTT	55.03	Achilli <i>et al.</i> 2008	
4	4450for	4450	4470	21	CTCAATCAACAGCCTCAATAC	54.97	Achilli <i>et al.</i> 2008	
5	4999for	4999	5016	18	TTGCCACTCCTATCCA	54.97	Achilli <i>et al.</i> 2008	
5	5506for	5506	5525	20	TGGCTTCAATCTACTTCTCC	54.57	Achilli <i>et al.</i> 2008	
5	6011for	6011	6030	20	TTCTACTACTCCTCGCATC	54.61	Achilli <i>et al.</i> 2008	
6	6594for	6594	6613	20	CCTACTTCACATCAGCCACT	55.31	Achilli <i>et al.</i> 2008	
6	7055for	7055	7074	20	GGCTCATTCAATTCCTAAC	56.22	Achilli <i>et al.</i> 2008	
6	7525for	7525	7543	19	CCATACAAGCAGATAGA	54.62	Achilli <i>et al.</i> 2008	
7	8180for	8180	8201	22	TTGACCCTTTTTATCATCTTTC	55.16	Achilli <i>et al.</i> 2008	
7	8684for	8684	8703	20	GAACACCCACTCCACTAATC	54.40	Achilli <i>et al.</i> 2008	
7	9133for	9133	9152	20	ACCAATGATGACGAGATGTT	55.31	Achilli <i>et al.</i> 2008	
8	9681for	9681	9700	20	GGTGCCTGATACTGACATTT	55.06	Achilli <i>et al.</i> 2008	
8	10143for	10143	10164	22	TCAAAAAGGACTAGAATGAACC	55.22	Achilli <i>et al.</i> 2008	
8	10738for	10738	10757	20	ATGGCTCCTCCCTCTAATAC	54.92	Achilli <i>et al.</i> 2008	
9	11275for	11275	11295	21	TCTAAACCCTATGACCGACTT	55.51	Achilli <i>et al.</i> 2008	
9	11803for	11803	11822	20	TATCTCGCCTTCCTTACAC	54.64	Achilli <i>et al.</i> 2008	
9	12297for	12297	12318	22	TTCAAACACTGACACTGACTAACC	54.53	Achilli <i>et al.</i> 2008	
10	12842for	12842	12861	20	CACTACTCCATTCAAGCACA	54.75	Achilli <i>et al.</i> 2008	
10	13373for	13373	13392	20	ACAGCACCCGTATTATTTTT	54.01	Achilli <i>et al.</i> 2008	
10	13833for	13833	13850	18	CCTGGTCACAAACCAAAA	55.26	Achilli <i>et al.</i> 2008	
11	14353for	14353	14372	20	CCCATAAATAGGTGAAGGT	55.54	Achilli <i>et al.</i> 2008	
11	14872for	14872	14891	20	TGCTCACAGTAATAGCCACA	55.41	Achilli <i>et al.</i> 2008	
11	15300for	15300	15317	18	AACACACCCCTCACATC	56.47	Achilli <i>et al.</i> 2008	

**Tabla 11.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar las posiciones determinantes en la región control y codificante del Haplogrupo Q de *Bos taurus*

PCR Numero ID	Longitud fragmento (pb)	Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
1	1,935	312for	312	335	24	CAATTTAGCACTCCAAACAAGTC	59.27	Achilli <i>et al.</i> 2008
		2246rev	2246	2225	22	TTTCCTTAGATGCACTCCTGTG	59.38	Achilli <i>et al.</i> 2008
2	313	1273for	1273	1296	24	GTCACCCCTCCTCAAATAGATTCAAG	54.90	Presente estudio
		1585rev	1585	1565	21	GTTCCCTTGCAGTACTTTCTC	55.70	Presente estudio
3	1061	2467for	2467	2486	20	AGTGAAATTGACCTTCCCGT	54.20	Presente estudio
		3527rev	3527	3504	24	CGTATGAGATTGTTGTGCTACTG	53.90	Presente estudio
4	1,861	3339for	3339	3360	22	GCCTAGCCTTAACCATGTGAAT	59.53	Achilli <i>et al.</i> 2008
		5199rev	5199	5178	22	TTATGTTGTTTGTGGAGGGAAA	59.36	Achilli <i>et al.</i> 2008
5	259	5267for	5267	5287	21	CATAACTACTACCACTCACGCC	52.70	Presente estudio
		5525rev	5525	5506	20	GGAGAAGTAGATTGAAGCCA	51.60	Presente estudio
6	1,869	4922for	4922	4943	22	TATAGCCAATTCCACCACCACT	60.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
		6790rev	6790	6768	23	GTGAAGAACAATATCGAGGGAAG	59.15	Achilli <i>et al.</i> 2008
7	1,901	6525for	6525	6546	22	TCGGATTCTTAGGTTTCATCGT	59.97	Achilli <i>et al.</i> 2008
		8425rev	8425	8406	20	GGAGGGTTACAAAGCGATTG	59.57	Achilli <i>et al.</i> 2008
8	760	7819for	7819	7840	22	CAATCCGAATGTTAGTCTCCTC	52.80	Presente estudio
		8578rev	8578	8556	23	GTGTTGTTGGTGTGAATGAATGG	55.00	Presente estudio
9	1,849	8109for	8109	8132	24	CATATACTCTCTTGGTGCATGC	59.92	Achilli <i>et al.</i> 2008
		9957rev	9957	9938	20	TCCTATGGGGTCAAATCCAC	59.61	Achilli <i>et al.</i> 2008
10	798	10513for	10513	10533	21	ACCTCAACTACTCCAATGCT	53.80	Presente estudio
		11310rev	11310	11289	22	AATGGGTATGCTATAAAGTCGG	52.30	Presente estudio
11	738	12299for	12299	12319	21	CAAAGTACTGACTACTAACCAC	52.40	Presente estudio
		13036rev	13036	13016	21	GTTGACTGGATGTGGAGAAGG	55.30	Presente estudio
12	1,876	12750for	12750	12771	22	TGGACTAGCATTAGCTGCAACC	61.65	Achilli <i>et al.</i> 2008
		14625rev	14625	14608	18	CCAGGAGGGAACCGAAAT	59.86	Achilli <i>et al.</i> 2008
13	353	13871for	13871	13894	24	TCCTCTCTCTTAATCACAATCC	54.00	Presente estudio
		14223rev	14223	14202	22	TATGGCTACAGAACAGTATCCT	52.60	Presente estudio
14	621	15095for	15095	15114	20	AGTCCACCTACTATTCCTCC	52.70	Presente estudio
		15715rev	15715	15694	22	GGTTAGTTGTTCTCTTCTCTG	52.70	Presente estudio

La secuenciación del fragmento de la región control de *Ovis aries* se llevó a cabo con los siguientes reactivos y cebadores (Tabla 12):

Big Dye terminator V3.1 Ready reaction mix	1,5 µL
Cebador (5 µM)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O MilliQ	~ 6 µL
Producto PCR	V correspondiente a ~10 ng
<b>TOTAL</b>	<b>10 µL</b>

**Tabla 12.** Cebadores de secuenciación utilizados para analizar la región control de *Ovis aries*.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15376	15356	15376	21	CCAACCTCCCTAAGACTCAAG	59.94	Presente estudio
L15988	15968	15988	21	AGCATGTAGGGTATTAACACTG	55.55	Presente estudio

La secuenciación del fragmento del *cyt b* amplificada mediante los cebadores diseñados en este estudio se llevó a cabo como se llevó a cabo utilizando la pareja de cebadores de la Tabla 13 con los siguientes reactivos:

Big Dye terminator V3.1 Ready reaction mix	1,5 $\mu$ L
Cebador (5 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O MilliQ	~ 6 $\mu$ L
Producto PCR	V correspondiente a ~10 ng
<b>TOTAL</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 13.** Cebadores de secuenciación utilizados para el análisis parcial del gen *cyt b* en 63 especies.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15601	15889	15601	23	TACGCAATCCTACGATCAATTCC	61.06	Presente estudio
H15748	15748	15770	23	GGTGTCTCCAATTCATGTTAG	59.81	Presente estudio

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Termal Cycler 9800 Fast de Applied Biosystems. Las condiciones fueron las mismas para los 3 estudios previamente descritos (**Estudios 1, 2 y 3**) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 96°C durante 1 minuto
- |  |   |             |
|--|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 96°C durante 10 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento a 50°C durante 5 segundos.</li> <li>▪ Elongación a 60°C durante 75 segundos.</li> </ul> | } | x 25 Ciclos |
|--|---|-------------|
- En espera a 15°C  $\infty$



**Reactivos y equipos para la PCR de secuenciación.**

Reactivos	Equipos
<p><b>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing</b>                      APPLIED BIOSYSTEMS, Cat N°: 4337455                      Madrid, España</p>	<p><b>Termociclador GeneAmp® PCR Kit</b>  <b>System 9800 Fast Thermal Cycler</b>                      APPLIED BIOSYSTEMS, Cat N°: 4352604                      Madrid, España</p>
<p><b>Cebadores F y R, 10 nmoles</b>                      IDT (Conda)                      Leuven, Bélgica</p>	

**3.2.2.1.4.5 Purificación de los productos de la reacción BDT.**

La purificación de los productos de la reacción de BDT se llevó a cabo mediante el Kit Big Dye Xterminator® purificación Kit tal y como se indica en el apartado 3.2.1.9 de ADN antiguo.

**3.2.2.1.4.6 Secuenciación del ADNmt mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN automático.**

La secuenciación del ADN se realizó mediante electroforesis capilar usando un secuenciador automático ABI3130 de Applied Biosystems utilizando las mismas condiciones que en el apartado 3.2.1.10 para ADN antiguo.

**3.2.2.1.4.7 Tratamiento informático de las secuencias: Análisis, edición y alineamiento.**

El tratamiento informático de las secuencias; el análisis, la edición y los alineamientos se realizó con los softwares específicos y con las secuencias de referencia descritos en el apartado 3.2.1.11 para ADN antiguo.

### **3.2.2.1.5 Análisis mediante disociación de alta resolución (HRM)**

#### **3.2.2.1.5.1 PCR a tiempo real.**

La técnica de la disociación de alta resolución o HRM permite la caracterización de los productos de PCR en función de su temperatura de disociación. Para conseguir las curvas de disociación se lleva a cabo una rtPCR con un termociclador C1000™ Thermal Cycler de Bio-Rad con un módulo óptico CFX96 Real-Time System.

La rtPCR es una variación de la PCR con la ventaja de que es capaz de realizar la amplificación y el análisis del ADN en un único análisis. Esta reacción en cadena tiene los mismos reactivos que la PCR convencional, pero en el caso de la rtPCR se le añade un fluorocromo que permite observar la amplificación del producto de ADN en cada uno de los ciclos. Es fluorocromo utilizado en este estudio ha sido SsoFast™ EvaGreen® Supermix de Bio-Rad. Este fluorocromo concreto solo emite fluorescencia cuando se encuentra enlazado al ADN. Una vez terminada la amplificación, cuando el fluorocromo y el ADN se encuentran completamente unidos, emiten una fluorescencia concreta que indicara la cantidad de ADN de cada muestra.

En el presente estudio, se han analizado las diferencias en las curvas de disociación de las diferentes especies para determinar las variantes genéticas propias de cada especie mediante la medición de la fluorescencia emitida durante la disociación del ADN. Para ello se realizó una desnaturalización progresiva desde los 65°C hasta los 95°C, incrementando la temperatura 0.5°C cada ciclo, y realizando de forma paralela una lectura de la fluorescencia cada 5 segundos.

La reacción HRM se llevó a cabo con los siguientes reactivos y cebadores (Tabla 14):

SsoFast™ EvaGreen® Supermix	1,5 µL
Cebador F (1 µM)	0,75 µL
Cebador R (1 µM)	075 µL
<u>ADN (1 ng/ µl)</u>	<u>1µL</u>
TOTAL	5µL

**Tabla 14.** Cebadores utilizados para el análisis de HRM del gen *cyt b* en 14 especies cárnicas y cinegéticas presentes en los Estudios 5 y 6.

Nombre	5' pb	3' pb	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
L15601	15889	15601	23	TACGCAATCCTACGATCAATTCC	61.06	Presente estudio
H15748	15748	15770	23	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTAG	59.81	Presente estudio

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 98°C durante 2 minutos
- |  |   |             |
|--|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desnaturalización a 98°C durante 5 segundos.</li> <li>▪ Anillamiento y extensión a 50°C durante 30 segundos.</li> </ul> | } | x 39 Ciclos |
|--|---|-------------|
- Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos
- Anillamiento y extensión a 60°C durante 2 minutos
- Curva de disociación desde 65°C a 95°C (+0.5°C cada 5 segundos)

**Reactivos y equipos para la PCR a tiempo real.**

<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>
<p><b>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</b>                      BIO-RAD, Cat N°: 30091725202                      Alcobendas, España</p>	<p><b>Termociclador C1000™</b>  <b>Thermal cycler</b>                      BIO-RAD, Cat n°: 184-1000                      Alcobendas, España</p>
<p><b>Cebadores F y R, 10 nmoles</b>                      IDT (Conda)                      Leuven, Bélgica</p>	

**3.2.2.1.5.2 Tratamiento informático de las curvas de disociación.**

El tratamiento informático de los resultados obtenidos de la rtPCR y las curvas de disociación se realizó mediante dos programas informáticos. El primero de ellos es el software CFX-Manager v. 2.0 de Bio-Rad que permite determinar la eficiencia de la amplificación ciclo a ciclo durante la rtPCR en cada una de las muestras. De esta forma se puede apreciar que especies amplifican mejor.

Posteriormente las muestras se trataron mediante el software Precisión Melt Análisis v. 1.1 de Bio-Rad. Este programa muestra las curvas de disociación de cada una de las muestras y determina un posible genotipo de la muestra, pero no indica cuál es ese posible genotipo, sino que lo indica agrupándolos en grupos o clústers de curvas similares.

**3.2.2.2 Análisis de ARN**

Se realizó el análisis de ARN de seis ovejas. Este análisis se realizó como un objetivo secundario, ya que dos de las ovejas analizadas contenían una quinta repetición del motivo de repetición de 75/76 pb en la región ETAS2 del ADNmt. Los otros cuatro individuos analizados tenían las cuatro

repeticiones convencionales y se utilizaron como muestras control. Se han analizado las posibles alteraciones de la expresión de los genes del ADNmt en leucocitos de sangre periférica. Para este propósito se cuantificó la expresión génica en cuatro genes ampliamente distribuidos a lo largo de todo el ADNmt; NADH deshidrogenasa subunidad 1 (*ND1*), NADH deshidrogenasa subunidad 2 (*ND2*), citocromo c oxidasa I (*COI*) y citocromo b (*cyt b*). Se utilizaron como genes de referencia los tres genes housekeeping más usados en los análisis de transcripción realizados en *Ovis aries*, en concreto los genes nucleares que codifican beta actina (*ACTB*), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) y el gen codificante de succinato deshidrogenasa subunidad A (*SDHA*) y se analizaron de la misma forma que los tres genes diana.

### **3.2.2.2.1 Extracción de ARN**

Se extrajeron muestras de sangre de la vena coccígea utilizando tubos de 6 mL BD Vacutainer ACD (BD Vacutainer, Plymouth, Reino Unido). La extracción de ARN se realizó en un laboratorio específico para el análisis de ARN, donde no está permitido trabajar con muestras que contengan ADN. El ARN se extrajo a partir de 250 µL de sangre mediante el Kit de extracción PureLink® Total RNA Blood Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), incluyendo el tratamiento DNAsa on-column, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Reactivos y equipos para la extracción de ARN.**

#### **Reactivos**

#### **PureLink® Total RNA Blood Purification Kit**

THERMO FISHER, Cat N°; K1560-01

Waltham, MA, USA

### 3.2.2.2 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN

Para poder valorar la cantidad de ARN extraído y la calidad del mismo se han realizado dos cuantificaciones diferentes; mediante QuBit 2.0 (Life Technologies) y mediante el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Se realizó una cuantificación fluorimétrica con el Qubit® RNA HS Assay Kit. Se preparó la Qubit working solution mediante una dilución 1:200 de QuBit™ reagent en Qubit™ buffer. Primero se hizo una recta patrón, mediante 10 µL de ADN estándar y 190 µL de Qubit working solution y posteriormente se realizaron diluciones seriadas de esta solución de trabajo. La cuantificación posterior de las muestras de interés se hizo añadiendo 1 µL y 199 µL de Qubit™ working solution.

La comprobación de la calidad y de los tamaños de los fragmentos del ARN se hizo mediante el 2100 Bioanalyzer. Esta metodología tiene un objetivo similar a los geles de agarosa, a diferencia de que la cantidad y calidad de datos obtenida es muy superior en el 2100Bioanalyzer. Para la realización de estas cuantificaciones se emplearon los RNA 6000 Nano chips, en combinación con el Eucaryotic Total RNA Nano Assay al que se añadió 1 µL de ARN en cada uno de los pocillos del chip. La visualización del chip se hace mediante el software 2100 Expert v. B.02 de Agilent Technologies.

#### Reactivos y equipos para la cuantificación y análisis de la calidad del ARN

Reactivos	Equipos
<p><b>Qubit® RNA HS Assay Kit</b>                      THERMO FISHER, Cat Nº: Q32852                      Waltham, MA, USA</p>	<p><b>QuBit® 2.0</b>                      THERMO FISHER, Cat Nº: Q32866                      Waltham, MA, USA</p>
<p><b>Chips Agilent RNA 6000 Nano Kit</b>                      AGILENT TECHNOLOGIES,                      Cat Nº: 5067-1511</p>	<p><b>2100 Bioanalyzer</b>                      AGILENT TECHNOLOGIES,                      Cat Nº: G2940CA</p>

Santa Clara, CA, USA

Santa Clara, CA, USA

**3.2.2.2.3 Síntesis de ADNc**

El ADN complementario (ADNc) es una cadena complementaria del ARNm creada mediante transcripción reversa. La síntesis de ADNc se realizó mediante el kit SuperScript® VILO™ cDNA síntesis Kit (Life Technologies, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está diseñado para aumentar el rendimiento del ADNc y mejorar el rango dinámico de los ensayos de rtPCR.

**Reactivos para la Síntesis de ADNc****SuperScript® VILO™ cDNA síntesis Kit**

THERMO FISHER, Cat N°: 11754050

Waltham, MA, USA

**3.2.2.2.4 Cuantificación de ADNc mediante qPCR**

La cuantificación de ADNc mediante qPCR se hizo por triplicado en un termociclador C1000™ Thermal Cycler de Bio-Rad con un módulo óptico CFX96 Real-Time System, tal y como se indica en el apartado 3.2.2.1.5.1 para el análisis mediante disociación de alta resolución.

La reacción de qPCR se ha llevado a cabo mediante los siguientes reactivos y cebadores (Tabla 15):

H <sub>2</sub> O milliQ estéril	2 µL
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	5 µL
Cebador F (1 µM)	1 µL
Cebador R (1 µM)	1 µL
<u>DNAc (10 ng/µl)</u>	<u>1µL</u>
TOTAL	5µL

**Tabla 15.** Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica de los genes *ND1*, *ND2*, *COI* y *cyt b* y los housekeeping genes *ACTB*, *GADPH* y *SDHA* en *Ovis aries* ( F; Forward ,R; Reverse).

Nombre	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Temperatura melting (C°)	Referencia
ACTB F	18	CCAAGGCCAACCGTGAGA	57.80	Passmore <i>et al.</i> 2009
ACTB R	17	AGCCTGGATGGCCACGT	60.00	Passmore <i>et al.</i> 2009
GAPDH F	18	ATGCCTCCTGCACCACCA	59.80	Passmore <i>et al.</i> 2009
GAPDH R	19	AGTCCCTCCACGATGCCAA	58.90	Passmore <i>et al.</i> 2009
SDHA F	21	CATCCACTACATGACGGAGCA	56.80	Zang <i>et al.</i> 2011
SDHA R	24	ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	56.20	Zang <i>et al.</i> 2011
ND1 F	22	ACACTCATCATTCTATTCTCC	51.70	Presente estudio
ND1 R	21	TGAAGAGTTTAATTGCGTCGG	53.30	Presente estudio
ND2 F	21	CGTTATGATTAGCACCCACTG	53.40	Presente estudio
ND2 R	20	GGCTGTTGATTGAGTTAGGA	52.20	Presente estudio
COX F	20	CCTTCTATTTGGTGCCTGAG	53.10	Presente estudio
COX R	23	GTTGTAGATTTGGTCATCTCCGA	54.50	Presente estudio
CYTB F	22	AACAACGCATTCATTGATCTCC	53.80	Presente estudio
CYTB R	24	TCAGGTGTATAGTGTATTGCTAGG	53.60	Presente estudio

Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en un termociclador C1000™ (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 98°C durante 3 minutos.
  - Desnaturalización a 98°C durante 5 segundos.
  - Anillamiento y extensión a 60°C durante 30 segundos.
- } x 40 Ciclos
- Curva de disociación desde 65°C a 95°C (+0.5°C cada 5 segundos)

**Reactivos y equipos para la PCR de secuenciación.**

Reactivos	Equipos
SsoFast™ EvaGreen® Supermix BIO-RAD, Cat N°: 30091725202	Termociclador C1000™ Thermal cycler BIO-RAD, Cat n°: 184-1000



### **Cebadores F y R, 10 nmoles**

IDT (Conda)

#### ***3.2.2.2.5 Tratamiento informático de la expresión génica***

El tratamiento informático de los resultados obtenidos de la rtPCR y los datos de cuantificación se realizaron mediante el software CFX-Manager v. 2.0 de Bio-Rad que permite determinar la cuantificación ciclo a ciclo durante la rtPCR realizada a cada una de las muestras. De esta forma se puede apreciar que muestras amplifican mejor y en qué cantidad. Mediante este programa informático también es posible determinar la expresión génica, ya que nos proporciona una lectura detallada de la expresión génica de cada muestra en cada uno de los genes analizados. El método de ciclo umbral comparativo (Ct) fue aplicado para calcular la cuantificación relativa de la expresión génica basada en la siguiente fórmula:  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ Gen diana} - Ct \text{ Gen housekeeping RNA})$ . El valor Ct de los genes housekeeping del ARNm se calculó mediante la media de los valores de los diferentes genes housekeeping.

### **3.2.3 Tratamiento estadístico de las muestras**

#### **3.2.3.1 Análisis estadísticos del ADNmt**

##### ***3.2.3.1.1 Parámetros de diversidad.***

Los parámetros de diversidad utilizados han sido calculados mediante el software Arlequín v. 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005). Este programa es de gran utilidad tanto en estudios intrapoblacionales como interpoblacionales, y ha sido utilizado en los **Estudios 1 y 2** para calcular variabilidad nucleotídica y haplotípica, así como polimorfismos específicos como transiciones, trasversiones, inserciones o deleciones.

### 3.2.3.1.1.1 Diversidad nucleotídica ( $\hat{\pi}_n$ )

La variabilidad genética se estimó a partir del cálculo de la diversidad nucleotídica. Esta diversidad indica la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar en una población sean diferentes (Nei y Tajima, 1981). La fórmula para calcular este parámetro es la siguiente:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

n: Tamaño muestral.

$p_i$  y  $p_j$ : Frecuencias de las secuencias  $i$  y  $j$ .

$\hat{d}_{ij}$ : Estimación del número de mutaciones nucleotídicas en cada posición ocurridas desde el momento de la divergencia de las secuencias  $i$  y  $j$ .

L: Longitud de la secuencia de los genes

La varianza es calculada mediante la siguiente fórmula:

$$V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{\pi}_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{\pi}_n^2$$

n: Tamaño muestral.

L: Longitud de la secuencia de los genes

La desviación estándar de la diversidad nucleotídica es calculada de la siguiente manera:

$$s.d.(\hat{\pi}_n) = \sqrt{V(\hat{\pi}_n)}$$

**3.2.3.1.1.2 Diversidad de secuencias ( $H$ )**

La diversidad de secuencias es el equivalente de la diversidad nucleotídica a nivel de secuencias. Indica la probabilidad de que dos secuencias de una misma población elegidas al azar sean diferentes. Este parámetro se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[ \sum_{i=1}^k p_i^3 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

n: Tamaño muestral.

k: Numero de haplotipos

$p_i$ : Frecuencia del haplotipo i en la población

La desviación estándar es calculada mediante la misma fórmula que para el caso de la diversidad nucleotídica:

$$s.d.(\hat{H}) = \sqrt{V(\hat{H})}$$

**3.2.3.1.1.3 Diversidades medias entre pares de secuencias ( $\Pi$ )**

Este parámetro representa el numero promedio de diferencias nucleotídicas encontradas entre las secuencias de una población (Tajima, 1993). La fórmula para calcular el número medio de diferencias entre pares, también conocido como *mean number of pairwise differences* es:

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j \hat{d}_{ij}$$

$d_{ij}$ : Estimación del número de mutaciones ocurridas desde el momento de la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ .

$k$ : Numero de haplotipos.

$n$ : Tamaño muestral.

$p_i$  y  $p_j$ : Frecuencias de los haplotipos  $i$  y  $j$ .

La varianza total, asumiendo ausencia de recombinación entre posiciones con neutralidad selectiva es calculada como:

$$V(\hat{\pi}) = \frac{3n(n+1)\hat{\pi} + 2(n^2 + n + 3)\hat{\pi}^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

$n$ : Tamaño muestral.

La desviación estándar es calculada mediante la misma fórmula que para los dos casos anteriores de diversidad:

$$s.d.(\hat{\pi}) = \sqrt{V(\hat{\pi})}$$

### **3.2.3.1.2 Análisis de la estructura genética.**

El procedimiento utilizado para el cálculo de la estructura genética ha sido el estadístico  $F_{ST}$ . Este método se basa en estimar la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, ya que permite comparar de manera cuantitativa la diferencia existente entre

poblaciones distintas (Piñero et al., 2008). Mediante el software Arlequín v. 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005) es posible realizar matrices de distancias  $F_{ST}$  obtenidas a partir de la permutación de haplotipos de diferentes poblaciones.

La matriz de distancias  $F_{ST}$  generada nos proporciona también el valor de significación estadística (P) que indica la proporción de permutaciones que producen un valor de  $F_{ST}$  igual o mayor al observado. En el presente estudio el valor de P ha sido 0.05, siendo los valores inferiores a esta cifra los que representan heterogeneidad genética y los valores superiores los que representan a la ausencia de heterogeneidad genética.

### **3.2.3.1.3 Análisis filogenético.**

El análisis filogenético permite conocer la historia evolutiva y las relaciones tanto entre especies como entre poblaciones diferentes. Estas relaciones pueden ser averiguadas gracias a métodos de deducción filogenética que evalúan los rasgos heredables analizados. Se calcularon las relaciones filogenéticas por dos metodologías diferentes. La primera de ellas fue mediante una matriz de distancia filogenética con el algoritmo Median Joining (MJ network) mediante el software Network v. 4.5.1.6 (Bandelt et al., 1999). Este software construye todos los árboles filogenéticos más cortos y simples posibles para los individuos analizados.

El segundo método construye arboles Neighbor-Joining (NJ tree) con los valores obtenidos con el software ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007). Este programa, tras la alineación de las secuencias, genera árboles mediante el algoritmo UPGMA, que es un método de agrupación jerárquica mediante aglomeración sencilla. El árbol se calculó utilizando un bootstrap de 1000 repeticiones para deducir los valores de confianza; para ello el software genera N muestras aleatorias (en este caso 1000) de posiciones de las alineaciones. Posteriormente el software simula las veces que se ha creado cada agrupación en cada rama del árbol filogenético. Finalmente esos árboles son representados gráficamente mediante los softwares Treeview v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y Seaview v. 4.3.0 (Gouy et al., 2010).

### **3.2.3.1.4 Poblaciones adicionales.**

Durante la elaboración de los diferentes estudios se han utilizado cuatro poblaciones animales adicionales, con individuos encontrados en la base de datos GenBank.

Con la intención de conocer las relaciones filogenéticas entre poblaciones bovinas ibéricas se descargaron las secuencias de 20 razas presentes de la Península Ibérica con más de 15 individuos. Para la comparación de individuos de *Bos taurus* pertenecientes al haplogrupo Q se descargaron todas las secuencias disponibles de la región control en GenBank desde 2010 hasta 2015 (4770 secuencias), para continuar con la comparación realizada por Bonfligio et al. 2010 en torno al haplogrupo Q.

Para la comparación de los linajes maternos de *Ovis aries* con un quinto motivo de repetición de 75/76 pb se descargaron las 11.061 secuencias de la región control habilitadas en GenBank (2015) con la intención buscar animales con una repetición extra del mismo.

Con el fin de estudiar relaciones filogenéticas y la posible continuidad del acervo genético entre animales prehistóricos y actuales del País Vasco desde el Neolítico hasta la actualidad, se descargaron los datos de la región control del ADNmt de dos poblaciones de vacas procedentes de Oriente medio y Europa de los Periodos Neolítico, Calcolítico y Romano. Por otro lado también se descargaron las secuencias del gen *cyt b* de las 36 especies conocidas de la subfamilia Caprinae con el fin de buscar una especie que concordase con la muestra de origen ovicaprino CPL. 17310, ya que no coincidía con las especies más comunes de esta subfamilia.

Para el diseño de una pareja de cebadores universales del gen *cyt b*, se descargaron las 751 secuencias del gen *cyt b* completo de especies mamíferas halladas en GenBank (2015).

### 3.2.3.2 Análisis estadístico de la expresión génica.

Los valores normalizados de Ct obtenidos en la rtPCR de los genes *ND1*, *ND2*, *COI*, *cyt b*, *ACTB*, *GADPH* y *SDHA* de *Ovis aries* analizados en el **Estudio 2** se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney U test con el software SSPS v22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Este estadístico es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes (versión no paramétrica de la prueba t de Student) y se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. El estadístico U se define como el mínimo de  $U_1$  y  $U_2$  y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

$n_1$  y  $n_2$ : Tamaños respectivos de cada muestra

$R_1$  y  $R_2$ : suma de los rangos de las observaciones de las muestras 1 y 2 respectivamente.

## 4. Resultados





#### **4.1 Organización de los resultados.**

Los resultados del presente trabajo se presentan organizados en dos grupos. El primero de los grupos está dedicado al estudio de los linajes maternos mediante el análisis de la región control del ADNmt en bóvidos y óvidos autóctonos del País Vasco, mientras que el segundo está centrado en el gen mitocondrial *cyt b* en múltiples especies. Estos apartados a su vez están subdivididos en diferentes estudios que se enumeran a continuación.

##### **Grupo 1: Linajes maternos de bóvidos y óvidos prehistóricos y actuales del País Vasco.**

Los tres primeros estudios están relacionados con la ampliación de conocimientos de los linajes maternos de las razas bovinas y ovinas autóctonas del País Vasco (**Estudios 1 y 2**) y compararlos con linajes bovinos y ovinos de yacimientos prehistóricos de esta región (**Estudio 3**). Esta caracterización de linajes maternos actuales y prehistóricos nos permitirá a su vez buscar una hipotética continuidad genética entre poblaciones prehistóricas y actuales.

##### **Grupo 2: Identificación y *screening* de especies mediante el desarrollo de una nueva pareja de cebadores universales situados en el gen *cyt b*.**

Los tres siguientes estudios están relacionados con el análisis del gen mitocondrial *cyt b* y su aplicabilidad para la identificación de especies. El **Estudio 4** se basa en la creación de una pareja de cebadores capaces de amplificar e identificar múltiples especies. Posteriormente, se utilizó la metodología del HRM con la misma pareja de cebadores para desarrollar un método de *screening* de identificación de especies cárnicas (**Estudio 5**) y cinegéticas (**Estudio 6**).



## **4.2 Grupo 1: Linajes maternos de bóvidos y óvidos prehistóricos y actuales del País Vasco.**

### **4.2.1 Estudio 1: “New Q lineage found in bovine (*Bos taurus*) of Iberian Peninsula”.**

Este estudio se centra en el primer objetivo general de este trabajo mediante la consecución del objetivo específico 1.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar los linajes maternos mediante el análisis de la región control del ADNmt en vacas de las razas Terreña y Pirenaica, ambas razas autóctonas del País Vasco. Los datos obtenidos permitirán la comparación de los datos de este estudio y los datos del **Estudio 3**, relacionado con vacas prehistóricas encontradas en yacimientos del País Vasco para, de esta forma, determinar si hay una continuidad genética de las dos poblaciones, separadas entre ellas por un máximo de 7.000 años.

En la actualidad, la mayoría de los bóvidos se califican dentro del macro-haplogrupo T, subdividido en dos subclados denominados T1'2'3 y T5. El primero de ellos engloba los haplogrupos T1, T2, T3, T4 y el segundo únicamente el haplogrupo T5. En Europa hay un haplogrupo que destaca sobre los demás, el T3 y en particular el subhaplogrupo T3b, al que pertenece la secuencia de referencia mitocondrial BRS (Anderson et al., 1981).

Aunque la gran mayoría de los bóvidos pertenecen al macrohaplogrupo T, hay un número reducido de individuos pertenecientes a tres haplogrupos diferentes: Q, P y R. El haplogrupo Q es un haplogrupo presente en un número muy reducido de individuos, del que hasta el presente estudio solo se habían encontrado muestras en Italia, y se teorizaba que su origen podría ser consecuencia de una domesticación secundaria a partir de animales salvajes primitivos locales. Los haplogrupos P

y R se han encontrado exclusivamente en vacas asiáticas y con una frecuencia también muy reducida.

El presente estudio muestra unos resultados similares a los realizados para otras vacas de origen europeo, donde la mayoría de la población (86,4%) se sitúa dentro del haplogrupo T3 y su subhaplogrupos, mientras que los demás haplogrupos aparecen como secundarios y con frecuencias mucho menores. El segundo haplogrupo más numeroso ha sido T1 (10,3%) y su subhaplogrupo T1b1. Finalmente, los haplogrupos T y Q se han encontrado únicamente en el 1,9 % y 1,2% de los casos

El hallazgo del haplogrupo Q en tres individuos del País Vasco indica que este haplogrupo no es exclusivo de vacas italianas. Además, los individuos analizados presentaron los polimorfismos: 3811C, 5716T, 7769A, 12492A, 12954T, 15156A, y 15655G en la región codificante. Hasta la fecha, solo han sido confirmados como haplogrupo Q seis ejemplares italianos, que también muestran siete polimorfismos en la región codificante del ADN mitocondrial, lo que demuestra que estos dos grupos tienen una antigüedad similar. Por lo que el linaje materno Q de los ejemplares bovinos autóctonos del País Vasco es al menos tan antiguo como los linajes del haplogrupo Q de las vacas italianas previamente descritos.

Mitochondrial DNA Journal. Doi: 10.3109/19401736.2015.1079823

## New Q lineage found in bovine (*Bos taurus*) of Iberian Peninsula

Lopez-Oceja A, Muro-Verde A, Gamarra D, Cardoso S, de Pancorbo MM\*

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.

Corresponding author. Marian M. de Pancorbo Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; email: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Abstract

The northern Iberian Peninsula is home to a variety of autochthonous cattle breeds, such as the Terreña and Pirenaica. With the objective of characterising the matrilineal lineages of these breeds, a study of mitochondrial DNA was performed. The D-loop of 155 individuals was analysed and most of the individuals were carriers of the T3 haplogroup, while haplogroups T and T1 were much less frequent. A Pirenaica individual belonging to the Q haplogroup was found. To verify the presence of the Q haplogroup individual, the entire mitochondrial DNA was sequenced and compared with two descendants. The individuals were assigned to the Q1 sub-haplogroup. These findings extend the geographic distribution of the Q haplogroup to the south west of the European continent. This new Q1 lineage has seven polymorphisms in the coding region, so this lineage is probably as old as the Q lineages described to date.

**Keywords:** mtDNA, D-loop, *Bos taurus*, Q haplogroup, Iberian Peninsula.

## Introduction

The northern Iberian Peninsula presents a great variety of cattle breeds (*Bos taurus*), some of which have been declared to be native breeds. Specifically, the Basque Country, located on the Cantabrian coast, has several native breeds, with the Terreña and Pirenaica being the most highly represented.

The Terreña breed is only used in extensive farming and constitutes a small population that is composed of approximately 2.000 individuals. Similar to other Iberian native breeds (Beja-Pereira et al., 2003), the Terreña has had a dramatic loss in economic importance and has therefore suffered a major loss of population size. Accordingly, Terreña is listed as an endangered native breed by both the Spanish government (BOE, 2012) and FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) and was included in the World Watch List - For domestic animal diversity (Scherf, 2000). Pirenaica is an ancient native breed characterised by its adaptation to the alpine climate in the northern region of the Iberian Peninsula Pyrenees. It has become the subject of intensive livestock farming due to its high economic value. Most of the beef production from Pirenaica breed is commercialized under the quality labels of “Euskal Okela” and “Ternera de Navarra”.

Most individual cattle belong to the mitochondrial DNA (mtDNA) macro-haplogroup T, whose origin is estimated to be approximately 10,000 years ago in the Middle East (Troy et al., 2001). The macro-haplogroup T has a basal division into two subclades, T5 and T1'2'3, the latter being predominant and comprising four haplogroups, T1, T2 and T3, as well as T4 (Achilli et al., 2008). Additionally, the possibility of a process of independent domestication in Africa (Bradley et al., 1996) may explain the phylogeographic particularities of T1, which is present in Africa, the Middle East, Southern Europe and South America. This phenomenon may have influenced the formation of several Iberian breeds (Cymbron et al., 1999). In addition to the well-described major macro-haplogroup T, three additional haplogroups were described: the P haplogroup, a marker of extinct aurochs from northern and central Europe (Edwards et al., 2007), but also identified in a single animal in Korea; the R haplogroup, reported only in animals from Italy (Achilli et al., 2008, Achilli et al., 2009), which is the most divergent haplotype in phylogeny of this specie; and the Q

haplogroup. These three haplogroups are minorities and possibly arose through local and secondary domestication processes (Bonfiglio et al., 2010).

Of the three previously mentioned haplogroups, Q is the haplogroup most closely related to T, with a divergence time of approximately 52 thousand years (ky) ago (Achilli et al., 2008). Several sequences, both ancient and modern, were found in France, Germany, Portugal, Turkey and China with the mutation motif 169G-15953G-16255C (Bonfiglio et al., 2010), characteristic of Q in the control region, however the assignment of this haplogroup cannot be verified without checking the positions of the coding region (Achilli et al., 2008). Therefore, to date, only 16 individuals of the Q haplogroup have been confirmed in Italian taurine breeds.

With the objective of characterising the matrilineal lineages of these breeds, a study of mitochondrial DNA was performed. In this study, we analyse the genetic diversity of the entire region of the mtDNA D-loop in 155 individuals from the Terreña and Pirenaica breeds, native to the Basque region where control region analysis showed that most individuals belonged to T3. T1 and T individuals were observed at much lower frequencies as well as a probable Q1 lineage. As a consequence, a secondary objective of this work was the characterization of this lineage by sequencing the entire mitochondrial DNA.

## **Material and Methods**

### **Sample collection and DNA extraction**

The genetic characterisation was performed by analysis of the entire D-loop region of mtDNA in 155 Terreña and Pirenaica individuals (79 and 76, respectively). Both breed, together with some others, coexist in the Basque region which is characterised by numerous small herds and a multitude of geographic and environmental barriers. Blood sample (20 mL) was collected in EDTA-treated tubes. The DNA was extracted with the Gentra Puregene blood kit (Qiagen).

### **PCR amplification and mtDNA sequencing**



The mtDNA control region was amplified between positions 15,731 and 422 (1,029 bp) using primers L15751 (5'-GAAGAACTGCAGTCTCACC-3') and H401 (5'-AGTTGGGAGACTCATCTAGG-3') and sequenced using primers L15751 and L10 (5'-GACATCTCGATGGACTAATGGC-3') designed with the software PerlPrimer v.1.1.17 (Marshall, 2004). The amplification and sequencing of the complete mtDNA (16339pb) were performed using two overlapping primer sets as previously described by Achilli et al., (2008). All of the reactions were carried out in a Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) with the following conditions: Initial denaturation at 95°C for 3 min and then 32 cycles at 94°C for 45 s, 58°C for 60 s and 72°C for 75 s, with a final extension at 72°C for 10 min. The direct cycle sequencing was performed with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and primers L15751 and L10. The amplified DNA products were sequenced on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **Phylogenetic and statistical analysis**

The sequences were edited with ChromasPro v.1.7.4 (Technelysium Pty Ltd.). After complete analysis, editing was performed for all mtDNA bases between positions 15,792 and 363 (910pb) in the control region. The sequences obtained were analysed with ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007) and SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems). To determine variations in each individual, the sequences were aligned and compared to the reference bovine sequence RBS (Anderson et al., 1982). The haplotypes obtained in this study for the mtDNA control region can be consulted in GeneBank with the accession numbers KM457285-KM457439, KP637147 for the complete mtDNA (BT831) and KP776996-KP777023 for the descendants of the completely analysed sample. The D-loop haplotype sequence diversity and frequency and the population pairwise  $F_{ST}$  were calculated by Arlequin v3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005). For constructing phylogenetic trees from population pairwise  $F_{ST}$ s, we used the neighbor-joining method (NJ) using Past v3.01 (Hammer et al., 2001). The reliability of the phylogenetic tree was examined with 1000 bootstrap replicates. Median-joining network (MJ) using Network v4.5.1 software (Bandelt et al., 1999) was used to infer the phylogenetic relationships among different cattle populations as well as to observe the phylogenetic disparity between Q haplotypes and their divergence times.

## Microsatellite DNA analysis

In order to confirm the Q lineage observed in the individual BT831, two offspring were analysed. First, the relationship between the three individuals was confirmed by the analysis of 12 specific cattle STRs (Short Tandem Repeats) with the Finzymes kit 2.1, according to the manufacturer's specifications. The resulting genetic profiles were interpreted using the software GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems). Then, the polymorphisms found in the mtDNA coding region of BT831 were analysed in its descendants.

## Results

### mtDNA haplotype diversity

The analysis of the entire mtDNA control region in 155 individuals showed 41 different haplotypes in the Terreña breed and 36 in the Pirenaica (Table 1). Additionally, the Terreña had higher sequence diversity compared with the Pirenaica ( $0.9712 \pm 0.0082$  vs.  $0.9429 \pm 0.0134$  respectively). The haplotypes found in the Pirenaica and Terreña cattle were classified into haplogroups according to Achilli et al., (2009) (Table 2). The results of the MJ network (Figure 1) show the phylogenetic relationship of the haplotypes in the two analysed cattle breeds. Four clusters were observed, corresponding to the four haplogroups found: T, T1, T3 and Q. The major cluster, T3, shows a subdivision formed by two star-like structures characteristic of this haplogroup. These star-like structures are consistent with those described for T3 in European cattle breeds (Troy et al., 2001), each corresponding to T3a on the left and T3b on the right of the figure.

**Table 1.** mtDNA haplotypes of Terreña and Pirenaica breeds.

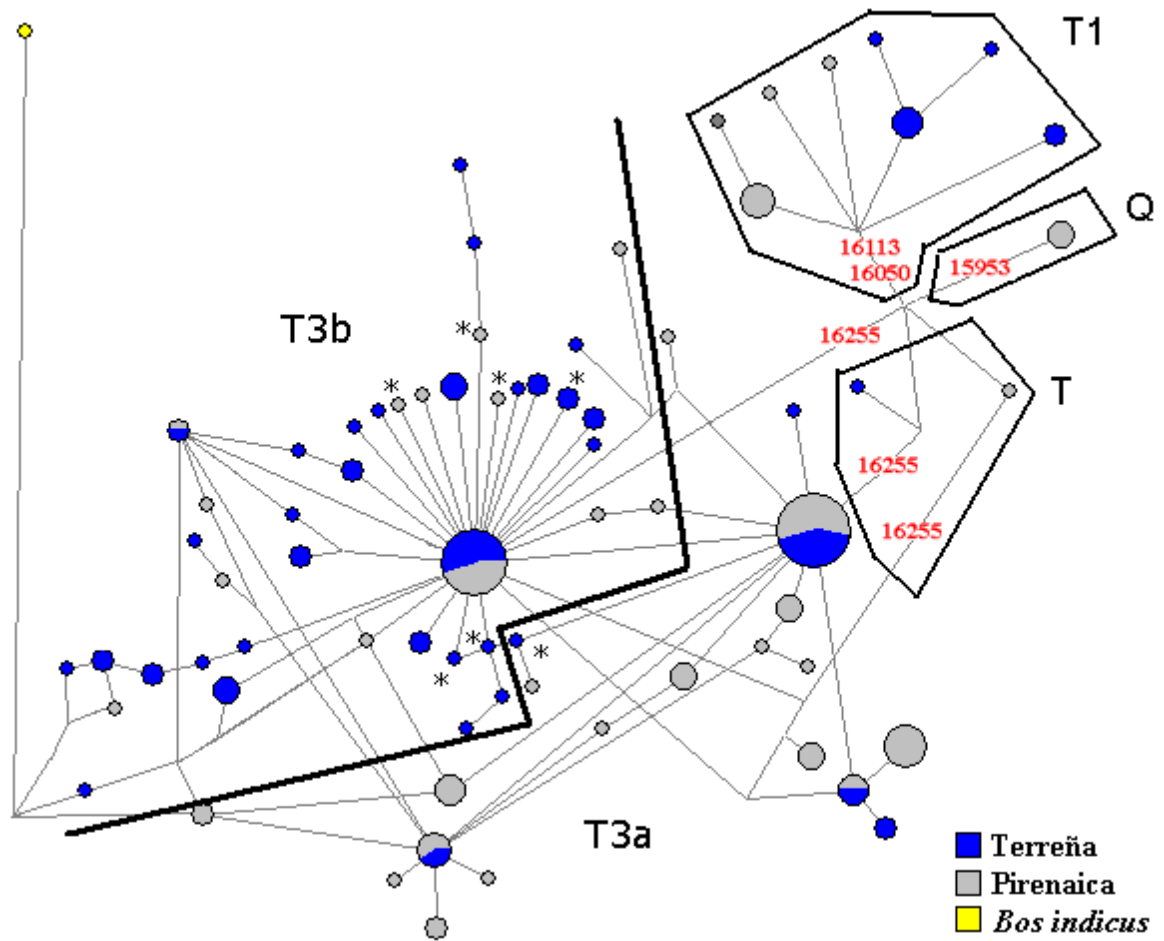
	Terreña		Pirenaica	
	N	Freq.	N	Freq.
<b>Sample size</b>	76		79	
<b>Polymorphisms</b>	52		40	
<b>Different haplotypes</b>	41	0.5394	36	0.4557
<b>Unique haplotypes</b>	24	0.3158	27	0.3418
<b>Shared haplotypes</b>	17	0.2237	9	0.1139

**Table 2.** mtDNA haplogroups in Terreña and Pirenaica breeds.

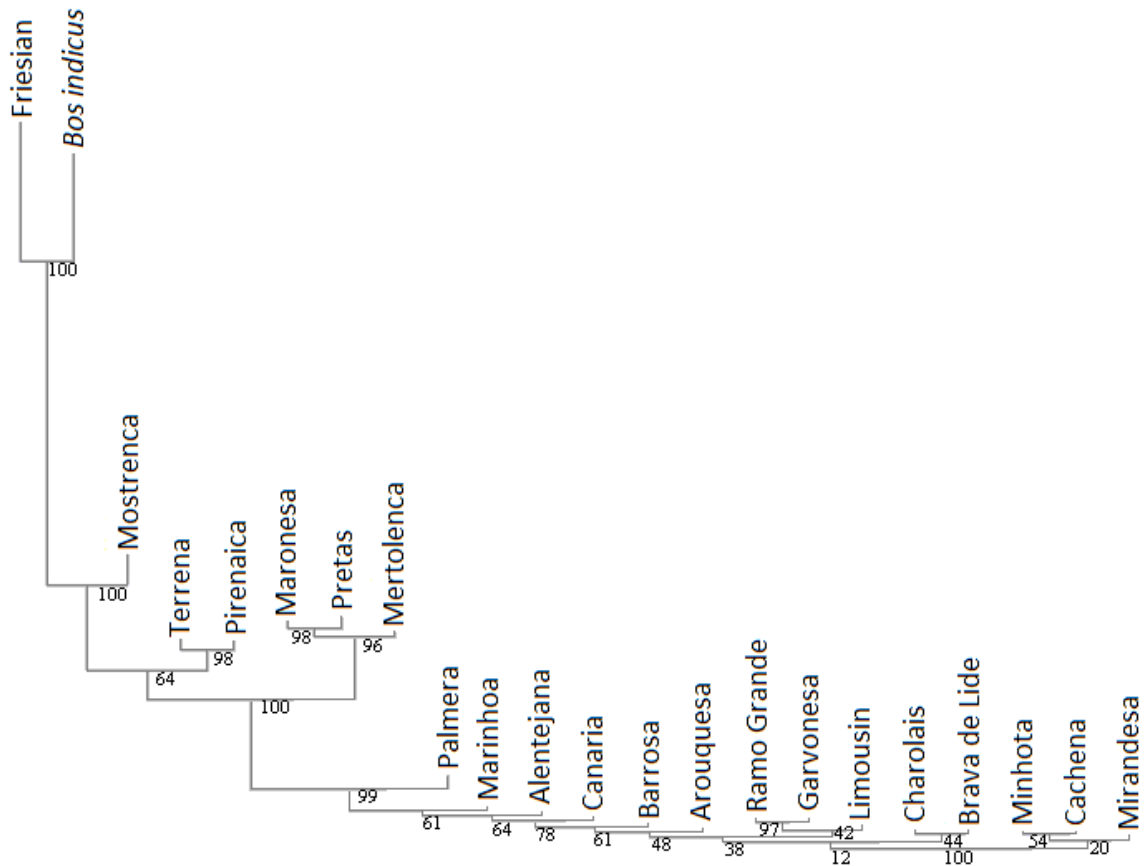
Haplogroup	Terreña		Pirenaica	
	N	Freq.	N	Freq.
Q	0	0.0000	3	0.0441
T	1	0.0151	1	0.0147
T1	7	0.1060	7	0.1029
T1b1	2	0.0303	0	0.0000
T3	5	0.0757	3	0.0441
T3a	45	0.6818	17	0.2500
T3b	16	0.2424	48	0.7058

### Phylogenetic relationship

The mtDNA sequences of Terreña and Pirenaica, together with other 19 breeds from the Iberian Peninsula, were used to calculate population pairwise  $F_{ST}$ s. The Iberian sequences (Ginja et al., 2009) were obtained from GenBank, establishing the limit of the sample size in  $N \geq 15$  (Table S1). In general, the differences in the  $F_{ST}$  distances between the breeds were significant ( $p < 0.05$ ), which means that the breeds can be considered genetically distant. The NJ tree of the 21 Iberian breeds shows that the Basque native breeds are both grouped into a single branch of the tree (98% bootstrap support), separated from other Iberian breeds (Figure 2). The breeds in distant branches, like Friesians, show a notably higher frequency of T1.



**Figure 1.** Median-joining network of the D-Loop haplotype data in Terreña and Pirenaica breeds. *Bos indicus* (NC\_005971) has been used as outgroup. Identical haplotypes were combined and their respective frequencies are shown by the size of the circles. This image shows polymorphisms 16 255, 15 953, 16 050, and 16 113 which define phylogenetic groups outside the T3 haplogroup. Samples classified as T3 are marked with an asterisk (\*).



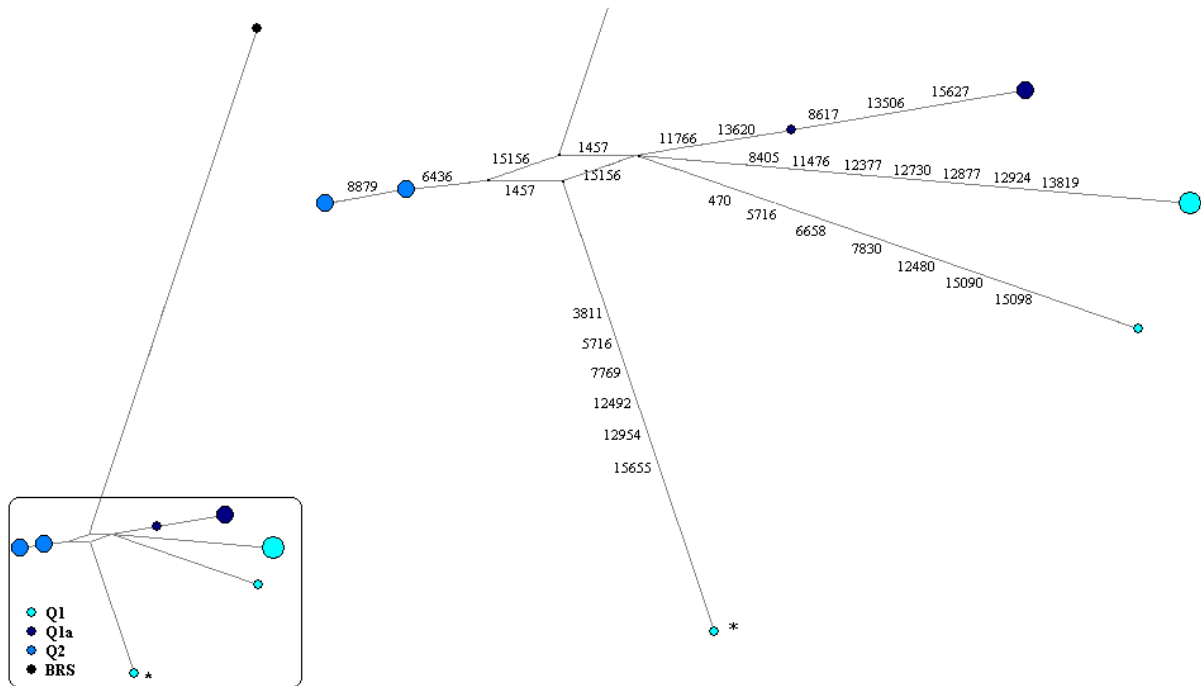
**Figure 2.** Phylogenetic neighbor-joining tree of the population pairwise  $F_{ST}$ s between analyzed breeds.

### Q haplotype analysis

The individual BT831 displayed the mutation motif 169G-15953G-16255C in the control region, so it was preliminarily classified as belonging to the Q haplogroup. To confirm this assignment, as well as to compare this individual with the other Q lineages previously described, complete mtDNA sequence was performed. The nucleotide frequencies were 0.27071 T, 0.26060 C, 0.33461 A, and 0.13409 G. The presence of all of the polymorphisms that characterise the Q haplogroup and the polymorphism 1457A confirmed the haplogroup of this individual as Q1. In addition to the typical Q mutations, the following polymorphisms were found: 3811C, 5716T, 7769A, 12492A, 12954T, 15156A, 15655G and 16057A, the latter in the control region. To confirm the presence of Q in individuals of the same lineage, two offspring were found and studied. The

relationships between BT831 and their probable descendants were established by the comparison of the genetic profiles of 12 microsatellite loci obtained from each individual (table S2). The comparisons of these profiles showed that BT831 shared one allele of each marker with each of the other individuals. Thus, a maternal relationship was verified between BT831 and its descendants. Then, polymorphisms in the mtDNA coding region of BT831 were analysed in the descendants. Both individuals showed the same polymorphisms as those previously observed. Thus, the finding of three Q1 mitochondrial lineages in the Pirenaica breed was confirmed. This finding places the Q haplogroup in South Western Europe and represents for the first time a confirmed mitochondrial lineage belonging to Q outside of Italy.

An MJ network was made with the confirmed sequences belonging to the Q haplogroup as described in Italian breeds by Aquilli et al., (2008, 2009) and Bonfiglio et al., (2010) (Figure 3). A clear separation between the branches belonging to the Q1 and Q2 sub-haplogroups is observed. However, the Q1 haplotype of BT831 is placed between the two groups, because aside from having the polymorphism 1457A, the characteristic of Q1, it also has the polymorphism 15156A, which is only one of the three characteristic polymorphisms of Q2. The divergence times were estimated to have a mutation rate of 3172 years by substitution in the coding region (Achilli et al., 2009), obtaining a value of  $46.5 \pm 10.7$  for the QT node,  $20.3 \pm 4.9$  ky for the Q haplogroup and  $19 \pm 4.5$  ky for the Q1 subhaplogroup.



**Figure 3.** Median-joining network of the Q haplogroup. The framed region has been expanded to the right to detail polymorphisms. Q haplotypes in our study are marked with an asterisk (\*). Identical haplotypes were combined and their respective frequencies are shown by the size of the circles.

## Discussion

As expected, the Terreña and Pirenaica breeds studied here show a preponderance of the T3 haplogroup with a reduced diversity and the sporadic presence of T, T1 and Q1 haplogroups. The high prevalence of T3 is possibly related to origin in the Middle East of these breeds, the centre of the domestication of this specie, which probably established the primary haplotypes observed nowadays (Troy et al., 2001). The low diversity of the T macro-haplogroup seems to be the result of a narrow bottleneck effect in the recent evolutionary history of *B. taurus* (Achilli et al., 2009), in part because of the small number of initial breeding females (Bollongino et al., 2012). The clustering of native breeds in the Basque region into a single NJ tree branch and the absence of other breeds on the same branch indicates the phylogenetic relationship of these two breeds, even though Pirenaica has been subjected to genetic improvement and has consequently experienced a loss of mtDNA diversity. Other Iberian breeds are not grouped together despite having common geographic

distributions as described by Kantanen et al., (2009), who performed a phylogeographic analysis of European cattle breeds that showed a weak relationship between the geographic distance and the degree of genetic differentiation between breeds.

Among the Pirenaica animals studied, the presence of three related individuals belonging to Q was noted. Thus far, this haplogroup has been only confirmed by the analysis of the complete mtDNA in taurine breeds from Italy. The fact that the Q haplogroup is found only in the Pirenaica breed, indicates that despite the recent bottleneck due to intensive exploitation, Pirenaica maintains a greater diversity than Terreña, in which only the presence of T was observed.

The sample assigned as Q1 in this study has seven mutations in the coding region: 3811C, 5716T, 7769A, 12492A, 12954T, 15156A, and 15655G. Only six other samples confirmed as Q have the same number of changes in the coding region (Bonfiglio et al., 2010). There hadn't been found any other samples showing more than the aforementioned seven polymorphisms, therefore the lineage of this Iberian breed has the same age as the oldest lineages of Q described to date. It is also interesting to note that this sample not only had the polymorphism 1457A which assigns it to the Q1 haplogroup, but also the polymorphism 15156A characteristic of Q2, although it lacked the typical polymorphisms of this sub-haplogroup 6436A and 15921A. It is therefore likely that position 15156A could have been a back mutation.

Up to 2010, the only known Q lineages were the 16 studied by Bonfiglio et al., (2010). Same authors performed a search of 4770 D-loop sequences. Seven samples were found in different countries (in Europe, the Middle East and Asia) containing the mutation motif 169G-15953G-16255C. In order to update the D-loop sequences census of samples belonging to Q, this search increased by 1075 the sequences published in GeneBank. In this additional search, no new complete sequence of mtDNA belonging to the Q haplogroup was found and only three new sequences with the motif 169G-15953G-16255C were found; one in South Africa (KF163085) (Horsburgh et al., 2013), one in Finland (KF233438) (unpublished) and one in Israel (FN562615) (unpublished). In addition, five other sequences were found with changes in positions 15953G- 16255C, but without sequencing the 169G position.



Regarding the South African sample, the control region sequence showed that in addition to having the three characteristic positions of Q, it also had the mutations 16113C and 16050T characteristic of T1. However, the analysis of the coding region showed that it lacked the remaining changes required to belong to the Q haplogroup. The presence of the mutation motif 169G-15953G-16255C and subsequent assignment to another haplogroup reinforces the theory of Achilli et al., (2008), which states that the assignment to Q haplogroup cannot be verified without checking the coding region polymorphisms.

The confirmation through coding region analysis of all samples that had been assigned as Q using only the D-loop sequence would make the geographical distribution of this haplogroup wider and similar to the T haplogroup, strengthening the hypothesis that it is a minor lineage of T and had a common phylogenetic origin during domestication emerged in the Middle East (Bonfiglio et al., 2010). Besides, the appearance of the African sample with the mutation motif 169G-15953G-16255C and the subsequent assignment to haplogroup T1a, could indicate that several of the individuals that were assigned as Q haplogroup only by analysing the control region, were not correctly classified. This would alter the proposed geographical distribution and would dismiss the hypothesis that the Q haplogroup is a minor lineage of the T haplogroup.

## Conclusion

The geographical isolation of the Terreña and Pirenaica Breeds has been established by their mitochondrial DNA lineages that point to these breeds being separated from other Iberian Peninsula breeds.

This study reinforces the need to analyse the coding region of mtDNA for correct assignment to the Q haplogroup after finding a lineage with the mutation motif 169G-15953G-16255C. The study of the coding regions, and subsequent confirmation, could provide a better view of the geographical distribution of the Q haplogroup.

The present study identifies for the first time three related individuals belonging to the *B. taurus* Q haplogroup outside of Italy. These individuals belong to the Pirenaica breed, which is native

to the Basque region. The first individual was confirmed by sequencing the entire mtDNA and the other two, offspring of the first, by sequencing the polymorphisms found in the progenitor. These findings extend the geographic distribution of the Q haplogroup to the south west of the European continent. These samples belonging to the Q1 sub-haplogroup has seven polymorphisms in the coding region, so this lineage is probably as old as the oldest lineage described in Italy.

### Acknowledgements

A. Lopez-Oceja and D. Gamarra thank the Department of Economic Development and Competitiveness of the Government of the Basque Country for their predoctoral fellowships and the IT-833-13 Consolidated Group and UFI11/32 UPV/EHU. The authors are grateful to PhD Maite Alvarez for her technical and human support provided by the DNA Bank Service (SGIker) of the University of the Basque Country (UPV/EHU). The help provided by ETEFE, UAGA and Abeltzain Associations is very much appreciated.

### Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### Bibliography

Achilli A, Olivieri A, Pellecchia M, Ubaldi C, Colli L, Al-Zahery N, Accetturo M, Pala M, Hooshiar Kashani B, Perego UA, Battaglia V, Fornarino S, Kalamati J, Houshmand M, Negrini R, Semino O, Richards M, Macaulay V, Ferretti L, Bandelt HJ, Ajmone-Marsan P & Torroni A. (2008). Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr Biol* 18: R157-8.

- Achilli A, Bonfiglio S, Olivieri A, Malusà A, Pala M, Hooshiar Kashani B, Perego UA, Ajmone-Marsan P, Liotta L, Semino O, Bandelt HJ, Ferretti L & Torroni A. (2009). The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One* 4: e5753.
- Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F & Young IG. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol* 156: 683-717.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Beja-Pereira A, Alexandrino P, Bessa I, Carretero Y, Dunner S, Ferrand N, Jordana J, Laloe D, Moazami-Goudarzi K, Sanchez A & Cañon J. (2003). Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *J Hered* 94: 243-50.
- Boletín oficial del estado, España. BOE núm.39. (2012). Pág.13452-13455. BOE-A-2012-2254.
- Bollongino R, Burger J, Powell A, Mashkour M, Vigne JD & Thomas MG. (2012). Modern taurine cattle descended from small number of near-eastern founders. *Mol Biol Evol* 29: 2101-4.
- Bonfiglio S, Achilli A, Olivieri A, Negrini R, Colli L, Liotta L, Ajmone-Marsan P, Torroni A & Ferretti L. (2010). The enigmatic origin of bovine mtDNA haplogroup R: sporadic interbreeding or an independent event of *Bos primigenius* domestication in Italy? *PLoS One* 5: e15760.
- Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P & Loftus RT. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5131-5.
- Cymbron T, Loftus RT, Malheiro MI & Bradley DG. (1999). Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proc Biol Sci* 266: 597-603.
- Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF, Larson G, Ho SY, Heupink TH, Shapiro B, Freeman AR, Thomas MG, Arbogast RM, Arndt B, Bartosiewicz L, Benecke N, Budja M, Chaix L, Choyke AM, Coqueugniot E, Döhle HJ, Göldner H, Hartz S, Helmer D, Herzig B, Hongo H, Mashkour M, Ozdogan M, Pucher E, Roth G, Schade-Lindig S, Schmöcke U, Schulting RJ, Stephan E, Uerpman HP, Vörös I, Voytek B, Bradley DG & Burger J. (2007). Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc Biol Sci* 274: 1377-85.
- Excoffier L, Laval G & Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.

- Ginja C, Penedo MC, Melucci L, Quiroz J, Martínez López OR, Revidatti MA, Martínez-Martínez A, Delgado JV & Gama LT. (2010). Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Anim Genet* 41: 128-41.
- Hammer Ø, Harper D & Ryan P. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- Horsburgh KA, Prost S, Gosling A, Stanton JA, Rand C & Matisoo-Smith EA. (2013). The genetic diversity of the Nguni breed of African Cattle (*Bos* spp.): complete mitochondrial genomes of haplogroup T1. *PLoS One* 8: e71956.
- Kantanen J, Edwards CJ, Bradley DG, Viinalass H, Thessler S, Ivanova Z, Kiselyova T, Cinkulov M, Popov R, Stojanović S, Ammosov I & Vilkki J. (2009). Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity (Edinb)* 103: 404-15.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-8.
- Marshall OJ. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20: 2471-2.
- Scherf BD. (2000). World Watch List – For domestic animal diversity. 3rd edition. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Publication. FAO, Rome, Italy.
- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC & Bradley DG. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410: 1088-91.

Mitochondrial DNA Journal. Doi: 10.3109/19401736.2015.1079823

## New Q lineage found in bovine (*Bos taurus*) of Iberian Peninsula

Lopez-Oceja A, Muro-Verde A, Gamarra D, Cardoso S, de Pancorbo MM\*

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.

Corresponding author. Marian M. de Pancorbo Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; email: marian.mdepancorbo@ehu.eus

**Keywords:** mtDNA, D-loop, *Bos taurus*, Q haplogroup, Iberian Peninsula.

### Supplementary data

**S1 Table.** Analysed populations.

<i>Bos taurus</i> breed	N	Country	Reference
Limousin	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Charolais	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Ramo Grande	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Mirandesa	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Minhota	15	Portugal	Ginja et al. 2009
Marinhua	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Garvonesa	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Cachena	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Arouquesa	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Alentejana	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Barrosa	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Friesian	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Maronesa	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Mertolencia	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Preta	16	Portugal	Ginja et al. 2009
Brava de Lide	16	Spain	Ginja et al. 2009
Mostrenca	16	Spain	Ginja et al. 2009
Palmera	16	Spain	Ginja et al. 2009
Canaria	16	Spain	Ginja et al. 2009
Terrena	76	Spain	Present study
Pirenaica	79	Spain	Present study

**S2 Table.** Relationship between 3 individual was analysed by autosomal STR profiles.

	TGLA227		BM2113		TGLA53		ETH10		SPS115		TGLA126		TGLA122		INRA23		BM1818		ETH3		ETH225		BM1824	
	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2	al. 1	al. 2
<b>BT 831</b>	14	21	18		26		20		22	28	19	22	17	20	22		16		22	26	21	24	13	14
<b>BT 821</b>	14	20	17	18	22	26	20	21	22	28	22		17	21	15	22	16	18	22	23	23	24	12	14
<b>BT 825</b>	14	20	18	19	22	26	20		22	28	18	19	20	21	18	22	16	19	22	26	23	24	13	14

### 4.2.2 Estudio 2: “Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps (*Ovis aries*) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence.”

Este estudio se centra alcanzar el primer objetivo general de este trabajo mediante la consecución del objetivo específico 2.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar los linajes maternos a través del análisis de la región control del ADNmt de ovejas de raza Latxa, pertenecientes a las subrazas Latxa de cara negra y Latxa de cara rubia, ambas autóctonas del País Vasco. Los datos obtenidos, al igual que en el **Estudio 1**, nos permitirán la comparación de los datos de este estudio y los datos del **Estudio 3**, relacionado con ovejas prehistóricas encontradas en yacimientos del País vasco, y analizar si hay una continuidad genética entre las dos poblaciones, separadas entre ellas por un máximo de 7.000 años.

En la actualidad la mayoría de los óvidos se clasifican dentro de dos haplogrupos mayoritarios, ambos con una distribución global. El haplogrupo A es mayoritario en ovejas asiáticas, mientras que el haplogrupo B es el mayoritario en óvidos europeos. También hay otros haplogrupos minoritarios como son el C, D y E.

El presente estudio muestra datos de linajes maternos similares a los descritos previamente en ovejas europeas, donde la mayoría de los individuos pertenecen al haplogrupo mayoritario en Europa, el B (98,8%), mientras que el haplogrupo A solo se encontró en dos de los individuos estudiados (1,2%).

El ADNmt de ovejas muestra en la región control un motivo de repetición de 75 pb, que habitualmente se encuentra repetido cuatro veces, pero que puede variar en casos excepcionales. Autores como Hiendleder et al., (2002) teorizaron sobre la posibilidad de que este motivo de repetición indicase la especie del óvido, pero análisis posteriores demostraron que no era un método adecuado para identificación de la especie, aunque sí lo era para la asignación de haplogrupos (Demirci et al., 2013). En el presente estudio se han encontrado dos individuos, uno de cada variedad de la raza Latxa, Latxa de cara negra y Latxa de cara rubia, con una repetición extra del

motivo de repetición de 75 pb. Hasta el presente trabajo solo se habían encontrado 33 ovejas con un quinto motivo de repetición, lo que representa el 0,3% de la población ovina total cuyas secuencias de este fragmento se encuentran en el GenBank.

Este motivo de repetición de 75 pb se encuentra en una región denominada ETAS1, relacionada con una posible función reguladora de los procesos de replicación y transcripción del ADNmt. Para conocer si este motivo de repetición extra hace variar la expresión de los genes mitocondriales, se cuantificó la expresión de cuatro genes situados a lo largo del ADNmt. Aunque se pudo apreciar que la expresión génica de los individuos con el quinto motivo de repetición era ligeramente inferior, las diferencias obtenidas no eran significativas, por lo que la unidad extra de repetición del motivo 75/76 pb no parece afectar a la expresión de los genes codificados por el ADNmt.



Electrophoresis Journal (en revisión)

## Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps (*Ovis aries*) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence.

Lopez-Oceja, A. <sup>1</sup>, Gamarra, D. <sup>1</sup>, Cardoso, S. <sup>1</sup>, Palencia-Madrid, L. <sup>1</sup>, Juste, R.A. <sup>2</sup>, De Pancorbo, M.M.\* <sup>1</sup>

<sup>1</sup>BIOMICs Research Group, University of the Basque Country (UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz, Spain. (ALO, DG, SC, LPM, MMDP)

<sup>2</sup>Animal Health Department, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Derio, Bizkaia, Spain. (RAJ)

\*Correspondent: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Abstract

The Basque Country is home to the Latxa sheep breed, divided in several varieties such as the Latxa Black Face and Latxa Blonde Face. A study of the mitochondrial DNA control region was performed with the objective of characterizing the matrilineal lineages of these two varieties, that are the basis for the production of the famed Idiazabal type of cheese. Mitochondrial lineages of 174 male sheep were analyzed and most of the individuals were classified into B haplogroup (98.85%), while A haplogroup was much less frequent. Two Latxa individuals, both belonging to B haplogroup, presented an additional 75/76 bp tandem repeat motif. Only 33 other sequences with this repeat motif were found among 11,061 sheep sequences included in the GenBank database. Gene expression was analyzed because of the presence of a fifth 75/76 bp repeat motif inside ETAS1, a domain with a possible function in regulation of replication and transcription. The mRNA from four mitochondrial genes *ND1*, *ND2*, *COI* and *cyt b* was analyzed in the two individuals of this study with a fifth repeat motif and four without it. Although lower transcription was noticed when the additional 75/76 bp repeat motif was present no statistically significant differences were observed. Therefore, the variation in the number of the 75/76 repeat motif does not seem to modify the gene expression rate in analyzed mitochondrial genes.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, Control region, Gene expression, *Ovis aries*.

## Introduction

The sheep (*Ovis aries*) has a great economic and commercial importance in the Spanish livestock industry. In fact, in terms of number of sheep livestock, Spain is the third country in Europe just behind Russia and the United Kingdom (<http://www.fao.org/docrep/017/i3138e/i3138e09.pdf>). The Basque Country is a region with several autochthonous breeds of different livestock species, being the Latxa the ovine representative. Belonging to the churro trunk, Latxa is historically one of the most primitive ovine breeds of the Iberian Peninsula and the most abundant in the Basque Country because of their great adaptability to the humid climate of this region of the north of Iberian Peninsula. Latxa breed is subdivided into two main varieties, Latxa Black Face (LBKF) and Latxa Blonde Face (LBLEF), according to the hair color in the face. The females usually have an average weight of 55 kg and males 75 kg and they have characteristic rough long fleece that gives its basque name (latxa). The milk is traditionally used for cheese production and is commercialized under the quality label of “Idiazabal” in the Basque Country. There is also a tradition for lamb meat consumption, by the seasonal commercialization of suckling lambs.

These native varieties have suffered a long adaptive process and are well adapted to the environment in which they live. It is possible that these long-established breeds may have accumulated variations in their DNA. The mitochondrial DNA (mtDNA) has a high mutation rate and provides important phylogeographic information (Bruford et al., 2003), thus being a useful marker for monitoring maternal lineages.

Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in *O. aries* have identified five different haplogroups, A, B, C, D and E (Meadows et al., 2007). In the Iberian Peninsula, solely the first three haplogroups have been described (Pedrosa et al., 2007). The A and B haplogroups were described initially (Wood and Phua, 1996, Hiendleder et al., 1998), and currently remain as the most widely distributed. The A haplogroup is also known as Asian haplogroup because of its wide distribution in Asia, although it has a worldwide distribution. The B haplogroup or European haplogroup is the

most common among European sheep, and also presents a global distribution. The peculiarity of B haplogroup is that is phylogenetically related to European mouflon (*Ovis musimon*) (Hiendleder et al., 2002). This does not happen with other haplogroups, since phylogenetic relationships with other wild species of the genus *Ovis* have not been found. The C haplogroup (Guo et al., 2005, Pedrosa et al., 2005) is widely distributed and has been described in Asia, Middle East and Europe (Pereira et al., 2006). This haplogroup has a greater genetic diversity than A and B haplogroups (Pedrosa et al., 2005). The recently described D and E haplogroups have been found in isolated individuals from Caucasus and Middle East (Tapio et al., 2006, Meadows et al., 2007).

The control region is the major control site for mtDNA expression because it contains the leading-strand origin of replication and the major promoters for transcription (Taanman, 1999). The control region contains three major domains including the extended termination associated sequences (TAS), the central domain, and the conserved sequence blocks (CSB) (Sbisà et al., 1997). The mtDNA control region of the sheep has generally a length of 1,180 bp. In this region, there is a 75/76 bp tandem repeat motif, mostly repeated four times in the domain ETAS1, which is one of the two preserved regions described within the TAS, with a possible functional role in regulation of replication and transcription (Sbisà et al., 1997). Hiendleder et al., (1998) found that, exceptionally, some individuals showed variations in the number of repeat units. Initially, the number of these tandem repeats was associated with different Ovine species (Hiendleder et al., 2002), as a distinctive feature between species. However, this hypothesis has been discarded by the finding of individuals with different number of repeats in the same species. Furthermore, this tandem repeat motif has been related to haplogroup determination, being the 75 bp repeat indicative of A, B or D haplogroups and the 76 bp repeat in the second and subsequent repeats indicative of C or E haplogroups (Demirci et al., 2013).

The objective of this study was the genetic characterization of mtDNA lineages of the two singular varieties of Latxa breed, natives from the Basque Country. The discovery of two individuals with an additional repeat in the 75/76 bp motif led us to investigate about its effect on mtDNA gene transcription. For that purpose, four mitochondrial genes, NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*), NADH dehydrogenase subunit 2 (*ND2*), Cytochrome c oxidase I (*COI*) and Cytochrome b (*cyt b*) were chosen and their mRNAs were quantified.

## Materials and methods

### Samples

Blood samples from 174 male sheep of two different varieties of Latxa were collected: 97 LBKF y 77 LBLF. All samples were obtained from Ardiekin Artificial Insemination Centre.

### DNA extraction and quantification

Blood samples were collected into 10 mL BD Vacutainer EDTA tubes (BD Vacutainer, Plymouth, UK). DNA was extracted by the salting-out method, using the Genra Puregene blood kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and diluted to 10 ng/ $\mu$ L.

### Control region amplification and sequencing

The mtDNA control region was amplified in *O. aries* between positions 15,356 and 50 (1,310 bp). Amplification was carried out using the L15376 (5'-3'-CCAACCTCCCTAAGACTCAAG) and H30 (5'-3'-GACTCATCTAGGCATTTTCAG) primers designed with the software PerlPrimer v.1.1.17 (Marshall, 2004). The PCR mix reaction consisted of 0.5  $\mu$ L of dNTPs (2.5  $\mu$ M) (BioTaq, Bioline, UK), 0.75  $\mu$ L of  $MgCl_2$  (50  $\mu$ M) (BioTaq), 2.5  $\mu$ L of 10X buffer (BioTaq), 0.5  $\mu$ L of each primer at a concentration of 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ L of bovine serum albumin (BSA 10 ng/mL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.15  $\mu$ L Taq polymerase (5 U /mL) (BioTaq), sterile water to a final volume of 21  $\mu$ L and 4  $\mu$ L of DNA template (10 ng/ $\mu$ L). The reaction was carried out in a Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA) with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 3 minutes; 10 cycles 94°C for 45 seconds, 70°C for 60 seconds (with a gradient of -1 °C every cycle) and 72°C for 90 seconds; 25 cycles 94°C for 45 seconds, 60°C for 60 seconds and 72°C for 90 seconds with a final elongation of 10 minutes at 72 °C.

Sequencing was carried out in two reactions using the L15376 and L15988 (5'-3' AGCATGTAGGGTATTAAGCTG) primers, the latter also designed with PerlPrimer v.1.1.17 software. The direct cycle sequencing was performed with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA) following the instructions of the manufacturer. Capillary electrophoresis was conducted on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the sequences were analyzed using the Sequencing Analysis v 5.2 software (Applied Biosystems).

### **RNA Extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR.**

RNA extraction was performed by using PureLink Total RNA Blood Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), following the manufacturer's instructions. The obtained RNA was quantified fluorometrically by QuBit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA). The analysis of the RNA quality and integrity was performed with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using RNA 6000 Nano chips (Agilent Technologies) in combination with the Eukaryote Total RNA Nano Assay (Agilent Technologies). The cDNA synthesis was performed using SuperScript® VILO™ Synthesis kit (Life Technologies), following the manufacturer's instructions.

The mRNA of *ND1*, *ND2*, *COI* and *cyt b* genes was quantified in triplicate in two samples with the 75/76 bp repeat motif in the mtDNA control region, Oa128 belonging to LBLF and Oa184 belonging to LBKF, and four random individuals which did not have any repetition motif (Oa11, Oa17, Oa29, Oa76).

The mRNA of *ND1*, *ND2*, *COI* and *cyt b* mitochondrial genes was quantified by qPCR. Beta-Actin (*ACTB*) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), as well as the mitochondrial Succinate dehydrogenase complex subunit A (*SDHA*) were used as housekeeping genes (Zang et al., 2011, Passmore et al., 2009). The primers used (Supporting Information S1) in these analyses were designed with the PerlPrimer v.1.1.17 software (Marshall et al., 2004). The rtPCR was performed with the following reagents: 5 µL of SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) and 1 µL of each primer at a concentration of 10 µM, 1 µL cDNA 10 ng/µL was added and RNase free distilled water to a final volume of 9 µL. The reaction was carried out in a CFX96 Real-time system (Bio-Rad, Hercules,

CA) with the following conditions: initial denaturation 98 °C for 3 minutes; 40 cycles 98 °C for 5 seconds and 60 °C for 5 seconds.

The cDNA Ct values were obtained by qPCR using the Bio-Rad CFX Manager™ v.3.0 (Bio-Rad) software. The comparative threshold cycle method ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) was applied to calculate the relative quantification of gene expression based on the following formula:  $(\text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping gene}})$ , where housekeeping genes Ct is calculated by mean values of the different housekeeping genes.

### Phylogenetic and Statistical Analysis

The mtDNA control region was edited between positions 15,437 and 16,616 using ChromasPro v.1.7.4 software (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, QLD, Australia). Sequences were aligned and compared to the reference sequence NC\_001941.1 (Hiendleder et al., 1998b) using ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007) and SeaView v.4.3.0 (Gouy et al., 2010) to determine the variations present in each individual. The mtDNA control region haplotypes obtained in this study can be consulted in GenBank with the accession numbers KT879003 - KT879186.

The number of different and shared haplotypes, as well as haplotype and nucleotide diversity and  $F_{ST}$  genetic distances were calculated using the Arlequin v3.5.1.3 software (Excoffier et al., 2005). The phylogenetic relationships between breeds were inferred by median-joining networks (MJ) using the software Network v.4.5.1.6 (Bandelt et al., 1999). The *Ovis ammon* sequence NC\_020656.1 (Meadows et al., 2011) was chosen as outgroup.

A search of individuals with five repeats in the 75/76 bp repeat motif was performed in GenBank. For this purpose, 11,061 mtDNA sequences from *O. aries* were downloaded. Sequences were aligned and compared with ClustalX v.2.0.11 software (Larkin et al., 2007). The phylogenetic relationships among individuals with an additional repetition of 75/76 bp motif found in our study and in GenBank, were represented by a phylogenetic tree obtained with the neighbor-joining method (NJ) performed with ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007) and Figtree v.1.4.2. ([Http://tree.bio.ed.ac.uk](http://tree.bio.ed.ac.uk)).

The comparison of normalized  $\Delta\Delta Ct$  values of *ND1*, *ND2*, *COI* and *cyt b* genes was performed with the Mann-Whitney U test using SPSS v22.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA ).

## Results

### Diversity parameters

The mtDNA genetic characterization of the two varieties of Basque native sheep, LBKF and LBLF, was carried out by sequencing the fragment comprised between positions 15,437 and 16,616 of the mtDNA control region in 174 individuals. The length observed in most individuals was 1,180 bp except in two samples, Oa128 and Oa184, that showed a variability in the length of the sequences due to the different number of copies of the 75/76 bp repeat motif, with five copies instead of four. The two samples found with this extra repetition motif, had the second and subsequent repetitions of 75 bp. The Latxa sheep showed a total of 144 different haplotypes (Table 1), 86 in LBKF (n = 97) and 63 in LBLF (n = 77). It is noteworthy that the percentage of unique haplotypes in LBKF was 77.32% and 67.53% in LBLF.

**Table 1.** Diversity parameters for Latxa Black Face (LBKF) and Latxa Blonde Face (LBLF), as well as the global diversity parameters for the Latxa breed.

	Latxa black face LBKF N= 97	Latxa blonde face LBLF N=77	Latxa N=174
<b>Different haplotypes</b>	86	63	144
<b>Shared haplotypes</b>	11	11	22
<b>Genetic diversity (H)</b>	0.9970 ± 0.0022	0.9927 ± 0.0040	0.9975 ± 0.0011
<b>Nucleotide diversity (Pi)</b>	0.0110 ± 0.0055	0.0098 ± 0.0050	0.0105 ± 0.0053
<b>Mean Pairwise differences (D)</b>	13.0648 ± 5.9323	11.6829 ± 5.3483	12.5231 ± 5.6774

Sequence diversity was calculated for the two Latxa varieties, obtaining a value of  $0.9970 \pm 0.0022$  for LBKF and  $0.9927 \pm 0.0040$  for LBLF, and a nucleotide diversity of  $0.0110 \pm 0.0055$  and

0.0098 ± 0.0050, respectively. The results of the  $F_{ST}$  statistical analysis between LBKF and LBLF showed a value of 0.0089 ( $p > 0.05$ ), indicating the absence of genetic substructure between breeds.

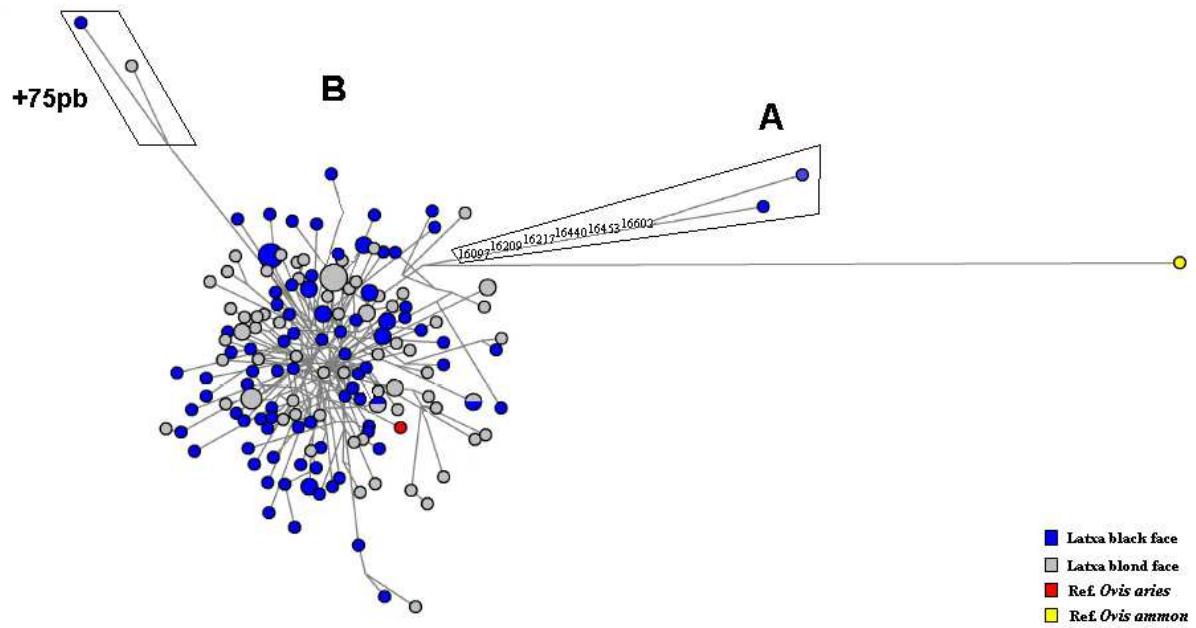
### Phylogeographical analysis

Haplogroup classification was carried out according to Meadows et al., (2007). Most of the individuals, 172 out of 174 (98.85%), belonged to the B haplogroup (95 LBKF and 77 LBLF). Only two individuals, both LBKF, were classified into the A haplogroup, representing 1.15% of the whole sample set.

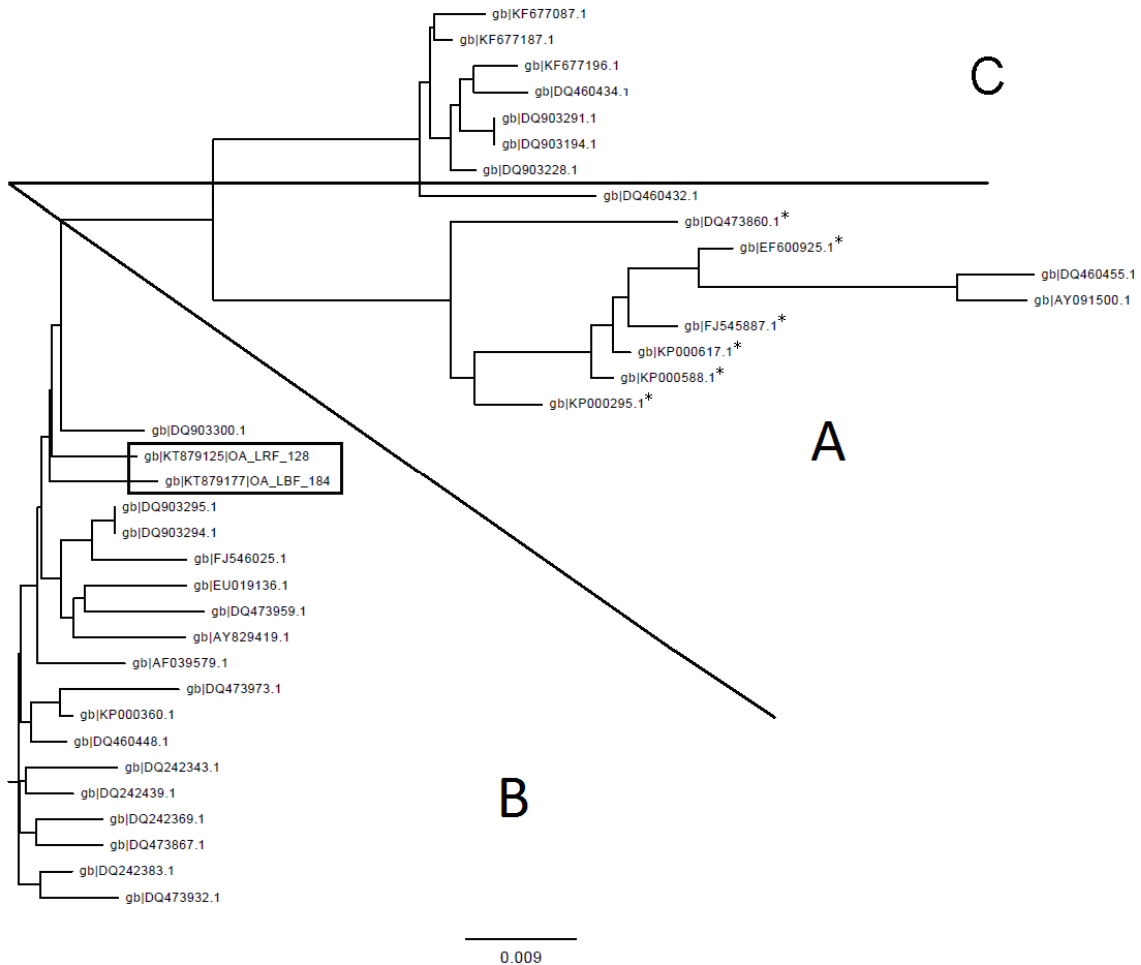
The phylogenetic relationships among haplotypes that characterize these two varieties of the Latxa breed are shown in the MJ network (Figure 1). Separate branches are observed in haplotypes from A and B haplogroups. Oa128 and Oa184 haplotypes are located in a separate branch of B haplogroup due to the extra unit of the 75/76 bp repeat motif.

A search on GenBank was performed to determine the incidence of individuals with five repeats of the 75/76 bp motif. Among 11,061 *O. aries* mtDNA sequences, a total of 33 individuals with a fifth repetition were found, representing 0.30% of the sequences. Figure 2 shows the phylogenetic relationships among individuals found in GenBank and the two 75/76 bp samples of the present study. A clear division between A, B and C haplogroups is observed. Nineteen individuals, including those analyzed in this study Oa128 (Acc. KP879125) and Oa184 (Acc. KP879177), belong to B haplogroup, eight individuals are in A haplogroup branch, while the other eight individuals are located in the branch of the C haplogroup.





**Figure 1.** Median-joining network of the mtDNA control region haplotype data of two varieties of Latxa: Latxa Black Face (LBKF) and Blonde Latxa face (LBLF). A and B indicates the different haplogroups. The legend "+75/76" indicates samples with an extra repeat of the 75/76 bp repeat motif. The "Ref. *Ovis aries*" sample corresponds to the GenBank accession number NC\_001941.1, while "Ref. *Ovis ammon*" has been used as outgroup and corresponds to the sample with the accession number NC\_020656.1.

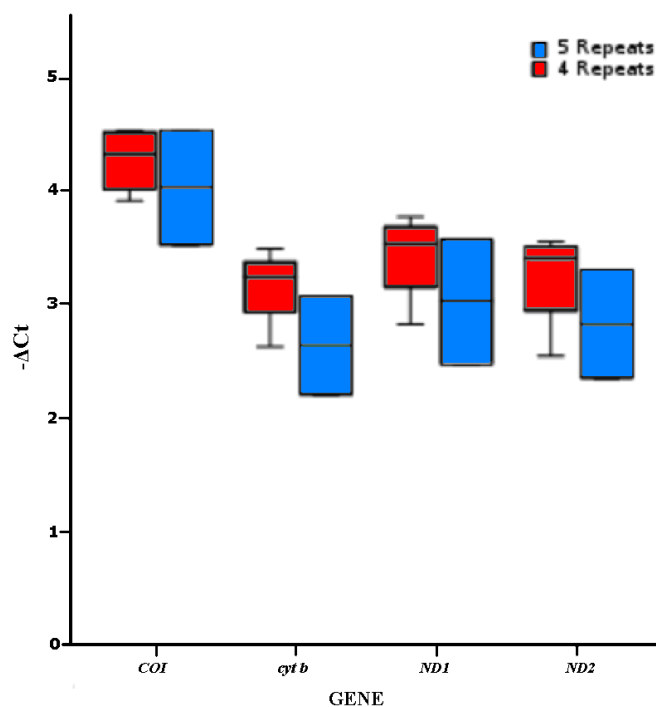


**Figure 2.** Phylogenetic neighbor-joining tree of the mtDNA control region in the 35 individuals with a fifth 75/76 bp repeat motif. Letters A, B and C indicates the haplogroups. The samples in a square are the ones analyzed in this study. Individuals marked with an asterisk (\*) corresponds to those downloaded from GenBank, and could not be fully classified as A haplogroup.

## Gene expression

In order to study a possible effect in mtDNA gene expression due to the variation in the number of repeats of the 75/76 bp motif observed in individuals Oa128 and Oa184, gene transcription analysis was made in triplicate. Four mitochondrial genes were selected, distributed along the mtDNA sequence, *cyt b*, *COI*, *ND1* and *ND2*. The *ACTB* and *GAPDH* genes were chosen as nuclear housekeeping genes and the *SDHA* as mitochondrial housekeeping gene.

The amounts of mRNA of the four genes analyzed were obtained in the two individuals with the extra repetition of the 75/76 bp motif and compared to four individuals with four repeats. Individuals with an extra repetition showed slightly lower levels of expression in the *cyt b*, *COI*, *ND1* and *ND2* genes (Figure 3). The average  $-\Delta\Delta Ct$  average of the *COI* gene was  $4.2775 \pm 0.3083$  for samples with four repeats and  $4.0350 \pm 0.7141$  for samples with five repeats. In the *cyt b* gene,  $-\Delta\Delta Ct$  values of  $3.1600 \pm 0.3719$  and  $2.6450 \pm 0.6151$  were observed, respectively. For *ND1* and *ND2* genes, values of  $3.4250 \pm 0.4152$  and  $3.0300 \pm 0.7778$ , and  $3.2325 \pm 0.4640$  and  $2.8350 \pm 0.6717$  were obtained, respectively. However, the differences were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3.** Relative expression of *COI*, *cytb*, *ND1*, and *ND2* mtDNA genes in the two samples with five repetitions of the 75/76 bp motif and four samples with four repeats. Genes were expressed in relative amount ( $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta Ct$ ) following comparative threshold cycle method ( $\Delta\Delta Ct = Ct$  target gene -  $Ct$  housekeeping gene). Negative values were shown ( $-\Delta\Delta Ct$ ) for a better comprehension of the figure.

## Discussion

In the present study the mtDNA control region in the Latxa sheep, a native breed from the Basque Country in the north of the Iberian Peninsula is characterized. The results revealed that virtually all individuals analyzed belong to B haplogroup except by two individuals belonging to A haplogroup. These results are consistent with previous studies which highlighted that most sheep in the Iberian Peninsula and Europe belong to B haplogroup (Tapio et al., 2006, Pedrosa et al., 2007). The existence of the B mtDNA haplogroup in Latxa sheep had been previously described by San Primitivo et al., (2007). Our study, with a larger sample size, has also detected individuals belonging to A haplogroup, although with a low frequency. The presence of A haplogroup could be explained by the sheep trade between the Europe and Asia as described by Meadows et al., (2005).

The Latxa has been described as one of the breeds with less genetic variability of the Iberian Peninsula, both in mtDNA control region (San Primitivo et al., 2007) as in microsatellite loci (Arranz et al., 2001). However, in our work a nucleotide variability significantly higher than that previously reported has been observed. The nucleotide diversity of the Latxa breed in this study is higher than that obtained in studies of San Primitivo et al., (2007) for the churro trunk (0.0105 vs. 0.0071), and also greater than those observed for merino and entrefino trunks (0.0081 and 0.0087 respectively). The nucleotide diversity of the Latxa breed was only slightly lower than the showed by the Iberian trunk (0.0116), despite the wide distribution of these breeds compared to the Latxa.

The length of mtDNA control region of most individuals analyzed was 1,180 bp, except for two individuals whose length was 1,256 and 1,257 bp. This variability in the length of the sequences is due to the presence of a fifth 75/76 bp repeat motif. Hiendleder et al., (2002) theorized about the possibility that a specific number of these tandem repeats could discriminate between Ovine species, but subsequent studies showed that individuals of the same species present different number of the repeat motif (Wang et al., 2007, Meadows et al., 2011), therefore the number of repetitions is not associated with the species.

In the present study, the two individuals with a fifth repeat of 75/76 bp motif belong to B haplogroup. In addition, a search in GenBank database has provided 33 individuals with an extra 75/76 bp repeat motif. The 35 carriers of the fifth repetition motif are divided into three haplogroups, A, B and C. The majority of individuals belonged to B haplogroup (54.28%), whereas A

and C were less represented (22.85% in both cases). The origin of these 35 individuals is from Asia (mainly from China), Near East and Europe, showing a global geographical distribution, even though their presence among sheep individuals included in the GenBank is only about 0.30%.

Demirci et al., (2013) proposed that the length of the second and subsequent repetitions of the 75/76 bp repeat motif could differentiate among the five haplogroups of domestic sheep in two genetic clusters; the first consisting of A, B and D haplogroups and a second composed of C and E haplogroups. The 35 samples analyzed in this study, with a fifth repeat motif, have been located within haplogroups assigned to each type of repetition. It is worth noting the case of sample DQ460432.1 that have all polymorphisms to be assigned as C haplogroup except for 16133C, so it has been classified as A haplogroup, although a back mutation in position 16133C may have occurred. This individual has also shown the second and subsequent repetitions of 76 bp, but not the third repetition. Despite these two differences, this sample is represented in the NJ tree with samples belonging to C haplogroup because of their phylogenetic proximity and is located in a different branch to its assigned haplogroup.

The control region for mtDNA contains the major promoters for transcription (Taanman, 1999). Thus, the presence of a fifth 75/76 bp repeat motif in ETS1 region related to regulating function of replication and transcription factors, might alter the expression of mtDNA genes. Due to the location of the repeated sequences in the regulatory TAS region and their properties in terms of variable conformations, the initiation of replication of the H-strand and subsequently the efficiency of mtDNA replication could be affected (Sbisà et al., 1997). The present study shows that gene expression in the analyzed genes does not vary depending on the number of repeats in the 75/76 bp motif. It has been determined that, although a lower level of gene expression in individuals with an additional repeat motif is detected, the differences were not significant.

## Conclusions

The analysis of mtDNA control region in the Latxa, an autochthonous breed to the north of the Iberian Peninsula, has shown that as occurs in other European sheep breeds, most of the animals belong to a single haplogroup, known as B or European. Nevertheless, two individuals belonging to A

haplogroup have been described for the first time in Latxa breed. Despite their low geographical dispersion both Latxa varieties, LBLF and LBKF have shown a high number of different haplotypes and high genetic diversity indicating the presence of a large variety of mtDNA lineages.

In addition, it is noteworthy that a fifth repeat of 75/76 bp motif located in the control region has been identified in two individuals in our study, along with other 33 individuals of the GenBank database, belonging to A, B and C haplogroups with a global geographical distribution. Also, it has been observed that the number of repetitions of the 75/76 bp repeat motif, located in the ETAS1 regulatory region, does not significantly influence the expression of the analyzed mitochondrial genes. Albeit, it would be interesting a more detailed study, with a larger number of individuals holding variation in this repetition motif, to confirm the lack of influence in the mtDNA gene expression.

### **Acknowledgements**

A. Lopez-Oceja and D. Gamarra thank the Department of Economic Development and Competitiveness of the Government of the Basque Country for their predoctoral fellowships and the IT-833-13 Consolidated Group and UFI11/32 UPV/EHU. The authors are grateful to PhD Maite Alvarez for her technical and human support provided by the DNA Bank Service (SGIker) of the University of the Basque Country (UPV/EHU) and Felisa Arrese from Ardiekin Insemination Centre. The authors report no conflicts of interest.

### **Supporting information**

Supporting Information S1. Nucleotide sequence of the primers used in the transcription analysis of samples Oa128, Oa184 with the fifth 75/76bp motif and Oa11, Oa17, Oa29, Oa76 with the normal repeat motif.

### **Literature cited**

- Arranz J.J., Y. Bayón and F.S. Primitivo. 2001. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Rumin Res* 39: 3-10.
- Bandelt H.J., P. Forster and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Bruford M.W., D.G. Bradley and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* 4: 900-10.
- Demirci S., E. Koban Baştanlar, N.D. Dağtaş, E. Pişkin, A. Engin, F. Ozer, E. Yüncü, S.A. Doğan and I. Togan. 2013. Mitochondrial DNA diversity of modern, ancient and wild sheep (*Ovis gmelinii anatolica*) from Turkey: new insights on the evolutionary history of sheep. *PLoS One* 8: e81952.
- Excoffier L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
- Gouy M., S. Guindon and O. Gascuel. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221-4.
- Guo J., L.X. Du, Y.H. Ma, W.J. Guan, H.B. Li, Q.J. Zhao, X. Li and S.Q. Rao. 2005. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim Genet* 36: 331-6.
- Hiendleder S., K. Mainz, Y. Plante and H. Lewalski. 1998a. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *J Hered* 89: 113-20.
- Hiendleder S., H. Lewalski, R. Wassmuth and A. Janke. 1998b. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol* 47: 441-8.
- Hiendleder S., B. Kaupe, R. Wassmuth and A. Janke. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc Biol Sci* 269: 893-904.

- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-8.
- Marshall O.J. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20: 2471-2.
- Meadows J.R., K. Li, J. Kantanen, M. Tapio, W. Sipos, V. Pardeshi, V. Gupta, J.H. Calvo, V. Whan, B. Norris and J.W. Kijas. 2005. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J Hered* 96: 494-501.
- Meadows J.R., I. Cemal, O. Karaca, E. Gootwine and J.W. Kijas. 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics* 175: 1371-9.
- Meadows J.R., S. Hiendleder and J.W. Kijas. 2011. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity (Edinb)* 106: 700-6.
- Passmore M., M. Nataatmadja and J.F. Fraser. 2009. Selection of reference genes for normalisation of real-time RT-PCR in brain-stem death injury in *Ovis aries*. *BMC Mol Biol* 10: 72.
- Pedrosa S., M. Uzun, J.J. Arranz, B. Gutiérrez-Gil, F. San Primitivo and Y. Bayón. 2005. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc Biol Sci* 272: 2211-7.
- Pedrosa S., J.J. Arranz, N. Brito, A. Molina, F. San Primitivo and Y. Bayón. 2007. Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet Sel Evol* 39: 91-103.
- Pereira F., S.J. Davis, L. Pereira, B. McEvoy, D.G. Bradley and A. Amorim. 2006. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol Biol Evol* 23: 1420-6.
- San Primitivo F., A. Molina Alcalá, S. Pedrosa, J.J. Arranz, N.V. Brito and Y. Bayón. 2007. Variabilidad del DNA mitocondrial en razas ovinas ibéricas.



- Sbisà E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole and C. Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-40.
- Taanman J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410: 103-23.
- Tapio M., N. Marzanov, M. Ozerov, M. Cinkulov, G. Gonzarenko, T. Kiselyova, M. Murawski, H. Viinalass and J. Kantanen. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol Biol Evol* 23: 1776-83.
- Wang X., Y.H. Ma, H. Chen and W.J. Guan. 2007. Genetic and phylogenetic studies of Chinese native sheep breeds (*Ovis aries*) based on mtDNA D-loop sequences. *Small Ruminant Research* 72: 232-6.
- Wood N.J. and S.H. Phua. 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim Genet* 27: 25-33.
- Zang R., J. Bai, H. Xu, L. Zhang, J. Yang, L. Yang, J. Lu and J. Wu. 2011. Selection of suitable reference genes for real-time quantitative PCR studies in Lanzhou fat-tailed sheep (*Ovis aries*). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 789-804.



Electrophoresis Journal (en revisión)

## Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps (*Ovis aries*) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence.

Lopez-Oceja, A. <sup>1</sup>, Gamarra, D. <sup>1</sup>, Cardoso, S. <sup>1</sup>, Palencia-Madrid, L. <sup>1</sup>, Juste, R.A. <sup>2</sup>, De Pancorbo, M.M.\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BIOMICs Research Group, University of the Basque Country (UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz, Spain. (ALO, DG, SC, LPM, MMDP)

<sup>2</sup>Animal Health Department, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Derio, Bizkaia, Spain. (RAJ)

\*Correspondent: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Supporting Information

**Supporting Information S1.** Nucleotide sequence of the primers used in the transcription analysis of samples Oa128, Oa184 with the fifth 75/76bp motif and Oa11, Oa17, Oa29, Oa76 with the normal repeat motif.

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Reference
ACTB	CCAAGGCCAACCCTGAGA	AGCCTGGATGGCCACGT	Passmore <i>et al.</i> 2009.
GAPDH	ATGCCTCCTGCACCACCA	AGTCCCTCCACGATGCCAA	Passmore <i>et al.</i> 2009.
SDHA	CATCCACTACATGACGGAGCA	ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	Zang <i>et al.</i> 2011.
ND1	ACACTCATCATTCTATTCTCC	TGAAGAGTTTAATTGCGTCCG	Present Study
ND2	CGTTATGATTAGCACCCACTG	GGCTGTTGATTGAGTTAGGA	Present Study
COX	CCTTCTATTTGGTGCCTGAG	GTTGTAGATTTGGTCATCTCCGA	Present Study
CYTB	AACAACGCATTCATTGATCTCC	TCAGGTGTATAGTGTATTGCTAGG	Present Study

### 4.2.3 Estudio 3: “Determinación de especie y linajes maternos de restos prehistóricos bovinos y ovicaprinos del País Vasco.”

Este estudio se centra en el primer objetivo general de este trabajo mediante la consecución del objetivo específico 3.

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar el gen mitocondrial *cyt b* y los linajes maternos mediante el análisis de la región control del ADNmt en vacas y ovejas prehistóricas encontradas en yacimientos del País Vasco. Los datos obtenidos permitirán la comparación con los datos de los **Estudios 1 y 2** sobre razas autóctonas actuales y de esta forma analizar la posible continuidad genética de las razas óvidas y bóvidas a lo largo de 7.000 años.

El *cyt b* es el gen mitocondrial más ampliamente utilizado para la identificación de especies en casos forenses. El análisis de este gen en el presente estudio se debe a la duda existente respecto a la especie correspondiente a las muestras analizadas de hace 2.000, 4.000 y 7.000 años. Debido al tiempo transcurrido, las muestras podrían pertenecer tanto a las especies domesticadas actuales (*Bos taurus* u *Ovis aries*) como a las especies primitivas salvajes, como es el caso de *Bos primigenius*.

Todos los restos de bóvidos analizados demostraron pertenecer a la especie *Bos taurus*. En el caso de los óvidos, todos los restos pertenecían a la especie *Ovis aries*, a excepción de un individuo cuya secuencia del gen *cyt b* resultó diferente a la de cualquier ovino o caprino conocido en la actualidad. Esto lleva a pensar que puede tratarse de un individuo de una especie extinta o de una especie minoritaria de la que no existe información genética en la base de datos de GenBank.

La confirmación molecular de que los restos prehistóricos corresponden a *Bos taurus* y *Ovis aries* sitúa con seguridad la presencia de estas especies domésticas como mínimo hace 7.000 años. La presencia de animales domésticos, en particular de las ovejas, constituye un indicador de la llegada del Neolítico a la región del País Vasco.

Los linajes maternos hallados en estos animales prehistóricos muestran datos muy similares a los obtenidos en la actualidad. Las vacas han mostrado una mayoría de individuos pertenecientes al haplogrupo T3 y tan solo un individuo perteneciente al haplogrupo T. Por otro lado, las ovejas han mostrado todas ellas su pertenencia al haplogrupo B y además todas ellas compartían el mismo haplotipo, indicando una baja variabilidad. Los perfiles obtenidos de los linajes maternos prehistóricos, tanto de vacas como de ovejas, coinciden con múltiples linajes actuales tanto de razas autóctonas vascas, como de distintas razas europeas, indicando la continuidad genética de los animales existentes en el País Vasco desde hace como mínimo 7.000 años hasta la actualidad.

## Determinación de especie y linajes maternos de restos prehistóricos bovinos y ovicaprinos del País Vasco.

Lopez-Oceja A.<sup>1</sup>, Cardoso S.<sup>1</sup>, Palencia-Madrid L.<sup>1</sup>, Castaños P.<sup>2</sup>, Mugika J.A.<sup>3</sup>, Fernández Eraso J.<sup>3</sup>, de Pancorbo M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo BIOMICs / BIOMICs Research Group, Universidad del País Vasco UPV/EHU.

<sup>2</sup>Sociedad de Ciencias Aranzadi.

<sup>3</sup>Departamento de Prehistoria. Facultad de Letras UPV/EHU.

### Resumen

En la actualidad existe una gran variedad de razas de bóvidos y óvidos en el País Vasco, donde desde el punto de vista arqueológico existe constancia de una importante presencia de estas especies desde tiempos prehistóricos. La Biología Molecular puede representar una herramienta de gran utilidad para estudiar la historia de estas especies, en especial mediante el análisis de ADN a partir de restos arqueológicos. Así, los objetivos principales de este estudio son aplicar la identificación genética a la determinación de la especie en restos arqueológicos mediante el análisis del gen citocromo b (*cyt b*); determinar la posible existencia de continuidad genética entre los individuos analizados y las cabañas bovina y ovina actuales; y establecer el tiempo de asentamiento de las diferentes razas en la región. Para ello se analizaron 6 muestras de bóvidos y 8 muestras de origen ovicaprino, con una antigüedad máxima en torno a 7.000 años. El análisis del gen *cyt b* permitió clasificar la muestras de bóvidos como *Bos taurus*. Las muestras ovicaprinas resultaron ser *Ovis aries*, a excepción de la muestra CPL. 17310 que no tuvo similitudes con ninguna de las especies de la subfamilia caprinae por lo que no pudo ser clasificada dentro de ninguna especie conocida en la actualidad. Este hecho podría indicar que se trata de un individuo de una especie de la que no haya datos genéticos o el hallazgo de una especie extinta sin clasificar. El haplogrupo mayoritario en los bóvidos fue T3, mientras que en óvidos fue el haplogrupo B, siendo ambos los más habituales en Europa. De esta manera se confirma la presencia de ganado de las especies *Bos taurus* y *Ovis aries* desde hace aproximadamente 7.000 años en el País Vasco. Asimismo, la presencia de muestras prehistóricas y actuales con un mismo haplotipo refleja la existencia de continuidad genética desde

hace 7.000 años hasta la actualidad, lo que podría indicar que algunas razas llevan asentadas en esta región desde hace varios miles de años.

**Palabras clave:** *Bos taurus*, *Ovis aries*, ADN mitocondrial, *cyt b*, D-loop

### Introducción

El País Vasco alberga en su territorio diversas razas autóctonas de ganado bovino y ovino cuyo asentamiento en la zona podría remontarse a varios miles de años atrás. Por ello, desde una perspectiva genética, es probable que a lo largo de este tiempo estas especies hayan acumulado cambios en su ADN, algunos de los cuales pueden haber tenido valor adaptativo.

En la actualidad existen una gran variedad de razas de bóvidos y óvidos en el norte de la Península. En el caso de los bóvidos se encuentran hasta 4 razas consideradas autóctonas: *Betizu*, que se encuentra principalmente en País Vasco, Navarra y País Vasco Francés; *Monchina*, con rebaños en el País Vasco, Cantabria y norte de Burgos; *Terreña*, localizada principalmente en el macizo de Gorbea, entre Bizkaia y Araba y *Pirenaica*, extendida a lo largo de todo el Pirineo occidental. En lo referente a los óvidos, en el País Vasco se distinguen siete variedades de oveja: *Latxa de cara rubia*, *Latxa de cara negra*, *Latxa del Gorbea*, *Latxa cara negra navarra*, *Sasi ardi*, *Carranzana cara rubia* y *Carranzana cara negra*. Algunas de ellas son razas con un gran arraigo en la región, en particular, la raza Latxa. Este tipo de ovejas se caracterizan por ser animales bien adaptados a un medio sumamente difícil para el ganado ovino, ya que habitan en zonas con un elevado índice de humedad.

Tanto las razas autóctonas bovinas como las ovinas son de gran importancia en la producción de productos de denominación de origen de calidad del País Vasco denominado Eusko Label. Éste es el caso, por ejemplo, de la raza bovina *Pirenaica*, que es actualmente una de las más importantes a nivel económico, ya que proporciona las denominaciones de origen de Euskal Okela en el País Vasco y Ternera de Navarra en la Comunidad Foral de Navarra. Otro ejemplo de especial relevancia es el de las ovejas de razas Latxa y Carranzana, cuya leche es empleada en la producción de queso bajo la Denominación de Origen Idiazabal.

Desde el punto de vista arqueológico existe constancia de la existencia de una importante presencia bovina y ovina en el área del País Vasco desde tiempos prehistóricos, como así lo reflejan los numerosos restos encontrados en los yacimientos de Arenaza y Cueva Peña Larga en Araba o Forua, Arcaya y Errekatxuetako Atxa en Bizkaia, entre otros.

Sin embargo, en ocasiones resulta de elevada dificultad clasificar algunos restos arqueológicos como pertenecientes a una especie concreta. Así por ejemplo, podría darse el caso de que un resto perteneciente a oveja (*Ovis aries*) fuese clasificado como cabra (género *Capra*) y viceversa, o los Uros o *Bos primigenius* pueden ser clasificados como *Bos taurus*. La Biología Molecular aporta la capacidad de la identificación precisa de la especie mediante el análisis del ADN de los restos biológicos. En este campo resulta de especial interés el análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) debido a su elevado número de copias que permite su análisis incluso en ADN altamente degradado (Stock et al., 2009). La mayoría de estos estudios con ADN antiguo (ADNa) se centran básicamente en el análisis de ADNmt dada su abundancia en la célula, lo que permite el análisis gracias a la posibilidad de conservación de algunos fragmentos de ADN que hayan podido escapar a la degradación impuesta por el tiempo y las condiciones a las que los restos puedan haber estado expuestos.

La región codificante del ADNmt aporta a la arqueología una herramienta de especial interés. En esta región se encuentra el gen *cyt b*, ampliamente utilizado en estudios filogenéticos e investigación forense (Zehner et al., 1998, Bataille et al., 1999, Parson et al. 2001). Este es un gen especie-específico, cuya secuencia de bases permite determinar de forma inequívoca la especie de origen de prácticamente cualquier resto actual o arqueológico, principalmente de especies de vertebrados. Así, mientras el estudio morfológico de numerosos restos sólo permite llegar a una clasificación del género sin alcanzar un diagnóstico de especie, el uso de la información aportada por el análisis del gen *cyt b* resulta de gran utilidad para conocer la especie de forma eficaz y con elevada fiabilidad.

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la especie *Bos taurus* (*B. taurus*), muchos de ellos destinados a esclarecer su posible relación con los uros o *Bos primigenius* (*B. primigenius*), especie actualmente extinguida; hoy en día se considera que *B. primigenius* es el ancestro salvaje de



*B. taurus*. Destacan los estudios realizados por Edwards et al., (2010) y Mona et al., (2010) en restos de *B. primigenius*, o Troy et al., (2001), Stock et al., (2009) y Anderung et al., (2005) en restos de *B. taurus*. No obstante, actualmente no existen datos disponibles sobre restos arqueológicos del área del País Vasco.

En el caso de los óvidos, la información sobre especímenes prehistóricos es todavía más escasa, si bien se ha llevado a cabo algún estudio sobre restos arqueológicos de *O. aries* en Asia (Cai et al., 2007). En definitiva, el origen de las especies de ganado bovino y ovino es un campo muy poco explorado, especialmente en el caso de la Península Ibérica y más aún en el caso del País Vasco, donde existen varias razas autóctonas de gran importancia para la economía de esta zona.

La ausencia de recombinación determina que el ADNmt, transmitido a lo largo de las generaciones acumule en su secuencia cambios que reflejan la historia genética-evolutiva de los linajes maternos sin interferencias debidas a la recombinación genética y por tanto, su estudio permite establecer comparaciones entre los linajes actuales y los obtenidos de restos prehistóricos. La región hipervariable del ADNmt, o región D-loop acumula el principal número de variantes y por ello, cada linaje es portador de variantes características. Así, el estudio de los linajes maternos permite establecer relaciones filogenéticas y por ello puede resultar de gran utilidad para establecer la posible existencia de continuidad genética de las razas autóctonas de bóvidos y óvidos del País Vasco desde tiempos neolíticos hasta la actualidad. La posibilidad de establecer relaciones entre la cabaña actual y los rebaños prehistóricos resulta de gran interés para determinar, entre otras cuestiones, el posible origen de las actuales razas autóctonas que se encuentran en el área del País Vasco. Hasta la fecha se han descrito en *Bos taurus* 6 linajes principales de ADNmt: T, T1, T2, T3, T4 y T5 con diferente distribución geográfica (Achilli et al., 2008), siendo el más frecuente en Europa el linaje T3 (Troy et al., 2001). En el caso de *O. aries*, se han identificado 5 linajes principales de ADNmt, A, B, C, D y E (Meadows et al., 2007); el linaje mayoritario en las poblaciones ovinas europeas y, más concretamente, en la Península Ibérica es el linaje B (Pedrosa et al., 2007). Tanto en el caso de las poblaciones bovinas como en el de las ovinas, la distribución geográfica de los diferentes linajes identificados sugiere un inicio de la domesticación a partir de un ancestro común en Oriente Próximo y una posterior diversificación desde ese foco hacia el resto de Europa.

Los linajes de ADNmt que actualmente caracterizan a las razas de la Península Ibérica son el linaje T3 de *B. taurus* y el linaje B de *O. aries*. Sin embargo, la información sobre la distribución de linajes maternos en poblaciones prehistóricas es muy escasa. En los últimos años se han llevado a cabo grandes avances tecnológicos en el campo de la Biología Molecular que han permitido el análisis de ADN a partir de restos prehistóricos de especies domésticas de gran antigüedad (Anderung et al., 2005, Cai et al., 2007, Ludwig et al., 2009).

Los principales objetivos del presente trabajo han sido la determinación de la especie de restos arqueológicos de bóvidos y óvidos de yacimientos del País Vasco mediante el análisis del gen mitocondrial *cyt b*, y la determinación de la posible existencia de continuidad genética entre las razas autóctonas de ganado bovino y ovino que actualmente viven en el área del País Vasco y la de individuos recuperados de yacimientos arqueológicos de la zona, mediante el análisis de linajes mitocondriales y establecer el tiempo de asentamiento de las razas autóctonas actuales.

## Materiales y métodos

### Muestras analizadas

Se analizaron 14 restos arqueológicos procedentes de yacimientos del País Vasco, seis de los cuales se clasificaron morfológicamente como bovinos (género *Bos*) y ocho como oviscaprino (géneros *Ovis* o *Capra*). Estas muestras fueron cedidas para su estudio, a través del Dpto. de Patrimonio de Gobierno Vasco, desde el Museo BIBAT (Vitoria-Gasteiz) y el Arkeologi Museoa (Bilbao).

En la tabla 1 se muestran las principales características de las muestras analizadas. Estas corresponden a tres periodos diferentes: Neolítico, Calcolítico y Romano. Además, se seleccionaron individuos de la vertiente atlántica e individuos de la vertiente mediterránea.

### **Análisis molecular de muestras arqueológicas (ADN antiguo)**

Las muestras arqueológicas necesitan un tratamiento especial ya que su nivel de degradación tiende a ser muy elevado y generalmente la cantidad de ADN hallada en estas muestras es muy baja o puede encontrarse altamente degradado. En primer lugar, las muestras se procesan en una cabina pre-extracción utilizada para la limpieza, corte y pulverización de las muestras y, en segundo lugar, la muestra pulverizada se traslada a otra cabina para llevar a cabo la extracción de ADN.

**Tabla 1:** Relación de las muestras analizadas en el estudio.

<b>Muestras</b>	<b>Origen</b>	<b>Yacimiento</b>	<b>Epoca</b>	<b>Edad</b>
<b>Bovino</b>				
AI.22B.107.IC5 6412	Arkeologi museoa	Arenaza I (Bizkaia)	Nedítico	~ 7.000
CPL.B3.9.265.15328	EIBAT	Cueva Peña Larga (Alava)	Nedítico	~ 7.000
AI.16Z.107.IB2 s/n	Arkeologi museoa	Arenaza I (Bizkaia)	Calcolítico	~ 4.000
CPL.A2.5.230.25060	EIBAT	Cueva Peña Larga (Alava)	Calcolítico	~ 4.000
F.II.146.4	Arkeologi museoa	Forua (Bizkaia)	Romano	~ 2.000
ARC-2.E3.EMTNA s/n	EIBAT	Arcaya (Alava)	Romano	~ 2.000

<b>Muestras</b>	<b>Origen</b>	<b>Yacimiento</b>	<b>Epoca</b>	<b>Edad</b>
<b>Ovicapino</b>				
AI.22B.113.IC 6700	Arkeologi museoa	Arenaza I (Bizkaia)	Nedítico	~ 7.000
AI.14Z.111.IB1 s/n	Arkeologi museoa	Arenaza I (Bizkaia)	Nedítico	~ 7.000
CPL.N.IV	Javier F. Eraso	Cueva Peña Larga (Alava)	Nedítico	~ 7.000
CPL. 471	Javier F. Eraso	Cueva Peña Larga (Alava)	Calcolítico	~ 4.000
CPL. 2359	Javier F. Eraso	Cueva Peña Larga (Alava)	Calcolítico	~ 4.000
ARC-2.E3.ANWT.AM s/n	EIBAT	Arcaya (Alava)	Romano	~ 2.000
F.II.103.4	Arkeologi museoa	Forua (Bizkaia)	Romano	~ 2.000
CPL. 17310	Javier F. Eraso	Cueva Peña Larga (Alava)	Nedítico	~ 7.000

Estos dos laboratorios tienen unas medidas de control muy estrictas para evitar la posible contaminación de las muestras con ADN exógeno actual. Las medidas especiales también se aplican a la vestimenta y al material del laboratorio. Las prendas utilizadas en esta sala son usadas exclusivamente en ellas y consisten en un pijama de dos piezas, bata de laboratorio, mascarilla, gorro y dos pares de guantes, ya que el par superior se cambia con frecuencia y así se evita que las manos estén al descubierto en el laboratorio. El material usado en estas cabinas de ADN es exclusivo de las mismas y antes de ser introducido es sometido a un riguroso proceso de limpieza y/o esterilización.

Durante el procesamiento de muestras en estas salas, todo el material utilizado con cada muestra (pipetas, gradillas, etc.) ha de ser descontaminado antes de ser usado con una nueva muestra. Este proceso incluye limpieza con hipoclorito sódico 50%, agua milli-Q y alcohol 70%, en el orden indicado. Además, se lleva a cabo el autoclavado de aquellos materiales que puedan soportar este proceso.

### Pretratamiento de las muestras

Todas las muestras analizadas en este estudio fueron piezas dentales. En primer lugar se llevó a cabo un registro fotográfico de cada muestra ya que la técnica de análisis es parcialmente destructiva en el caso de piezas grandes o incluso totalmente destructiva en el caso de piezas pequeñas (Figura 1).

En primer lugar se raspa las superficies con un bisturí para retirar la capa superficial que suele incluir tierra y otros sedimentos acumulados a lo largo del tiempo. A continuación se limpia la superficie con una gasa estéril empapada en hipoclorito sódico al 50%. Por último se retiran los restos de hipoclorito de sódico mediante aclarado con agua milliQ estéril. Después se procede a irradiar toda la superficie con luz UV a  $450 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  durante 30 minutos por cada zona. La pieza descontaminada es pulverizada en un molino criogénico FreezerMill 6750 SPEX SamplePrep. La pulverización de la pieza sumergida en Nitrógeno líquido previene una mayor degradación del ADN por el calor generado en el proceso de pulverización.



**Figura 1.** Fotografía de la muestra bovina AI.16Z.107.IB3.S/N, tras el proceso de limpieza.

### Extracción del ADN

Se tomaron 0.5 gr de cada muestra triturada y se procedió a su descalcificación. Se añaden

tres mL de EDTA 0,5M pH8 en cada tubo de muestra, se asegura el tapón del tubo con dos tiras de Parafilm® y se deja incubando en rotación a temperatura ambiente entre 18 y 24 horas.

A continuación se centrifugan las muestras a 1.800xg durante 10 minutos y se retira el sobrenadante. Se añaden 3mL de Buffer ES (EDTA 0,5M + Sarkosyl 1%) y 150 µL de proteinasa K (20 mg/mL) a cada muestra y nuevamente se incuban en rotación durante 18 a 24 horas, en esta ocasión a 55 °C.

Finalmente se lleva a cabo la extracción del ADN propiamente dicha mediante columnas de afinidad y posterior concentración del ADN por ultrafiltración. Tras centrifugar a 2.240xg durante 5 minutos se recupera el sobrenadante (3mL aproximadamente) y se lleva a otro tubo Falcon nuevo. Se añaden 15 mL de Binding Buffer (PB) (Qiagen) y se voltea vigorosamente el tubo. De forma paralela se prepara otro tubo con una columna Hi-Flow® DNA Purification Spin Column (Generon) para cada muestra y se le añaden 9 mL de volumen del tubo que contenía la muestra junto con el Binding Buffer y se centrifuga a 2.240xg durante 5 minutos. Este proceso hay que realizarlo dos veces para pasar por la columna la totalidad del volumen del tubo que contenía la muestra. A continuación se realizan tres lavados añadiendo 5mL de Washing Buffer (PE) y se centrifuga a 2.240xg durante 5 minutos. Finalmente se coloca la columna en un tubo nuevo y se añaden 100 µL de Elution Buffer (EB). Se deja actuar durante 5 minutos y posteriormente se centrifuga durante 1 minuto a 2.240xg para eluir el ADN atrapado en la columna. Este paso de elución se repetirá 4 veces, de forma que finalmente se recupera el extracto de ADN en un volumen de 400 µL. La posterior concentración de ADN representa el último paso del proceso de extracción. Para concentrar las muestras se usan columnas de ultrafiltración Amicon 30 (Millipore). Se añaden los 400 µL obtenidos en el paso anterior y se centrifuga durante 12 minutos a 6.000xg. Posteriormente se invierte esa columna en un tubo nuevo y se centrifuga a 1.350xg durante 4 minutos. Así se obtiene el ADN en un volumen final de aproximadamente 35 µL.

### **Análisis de ADNmt**

Se analizaron mediante amplificación por PCR una región del gen especie-específico *cyt b* y una región del D-loop de *B. taurus* y *O. aries*. Los fragmentos analizados en este estudio se

encuentran entre las bases 14.600 y 14.804 para el gen del *cyt b* y 15.950 a 16.307 para el D-loop en *B. taurus* y entre las bases 14.245 y 14.449 para el gen del *cyt b* y 15.508 a 15.610 para el D-loop en *O. aries*.

La amplificación se llevó a cabo utilizando las parejas de cebadores que se muestran en la tabla 2. El diseño de estos cebadores de amplificación y secuenciación, el análisis de presencia de dímeros de cebadores, horquillas y otras estructuras se realizó con el programa PerlPrimer v.1.1.17 (Marshall et al., 2004).

La amplificación PCR del gen *cyt b* fue llevada a cabo con los siguientes reactivos y condiciones: 2 µl de dNTPs (Bioline) (2,5µ µM), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 µµM) (Bioline), 2,5 µl de Buffer (10X) (Bioline), 0,4 µl de cada cebador (ThermoFisher) con una concentración de 12,5 µ µM, 0,4 µl de albúmina sérica bovina (BSA 10ng/mL) (Roche), y 0,4 µl de BioTaq™ DNA polimerasa (5 U/mL) (Bioline) en un volumen final de 22 µl con agua estéril y se añadieron 3 µl de ADN.

**Tabla 2:** Cebadores para las diferentes especies y fragmentos a amplificar.

Muestras	Primers				Tamaño amplificado (pb)
Bovino	Forward	Secuencia 5'-3'	Reverse	Secuencia 5'-3'	
Cyt-b	L14244-OV	CTCCCAGCTCCATCAAATATTTTCAT	H14343-OV	CAAATGTGGGTTACAGAGGAGAAT	150
	L14337-OV	GCAATACACTATACACCTGACACAA	H14448-OV	CATAGTATAGGCCTCGTCCTACA	160
D-loop	L15967-BT	CCTACGCAAGGGGTAAATG	H16143-BT	ATTAAGCTCGTGATCTAATGG	215
	L16124-BT	CCGCAAATTCATTCTTGATAGTA	H16287-BT	TGGACCGTTTAGATGAGAT	206

Muestras	Primers				Tamaño amplificado (pb)
Ovicapino	Forward	Secuencia 5'-3'	Reverse	Secuencia 5'-3'	
Cyt-b	L14244-OV	CTCCCAGCTCCATCAAATATTTTCAT	H14343-OV	CAAATGTGGGTTACAGAGGAGAAT	150
	L14337-OV	GCAATACACTATACACCTGACACAA	H14448-OV	CATAGTATAGGCCTCGTCCTACA	160
D-loop	L15508-OV	GCCTCTCCAGTATTAACCTTGCTA	H15609-OV	AAGACAGACATAAGATATGTTGGGT	151

La reacción fue llevada a cabo en un Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95 °C durante 11 minutos; 10 ciclos 94 °C durante 35 segundos, 60 °C durante 60 segundos (con un gradiente de -1 °C cada ciclo) y 72 °C durante 50 segundos; 30 ciclos a 94 °C durante 35 segundos, 50 °C durante 50 segundos y 72 °C durante 50 segundos.

La amplificación PCR de la región D-loop fue optimizada con los siguientes reactivos y condiciones: 0,5µL de dNTPs (2,5 µM), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 µM), 2,5 µL de Buffer (10X), 0,25 µL de cada cebador con una concentración de 10 µM, 1µL de BSA 10 ng/mL y 0,2 µL de BioTaq™ (5 U/mL), se llevó hasta un volumen final de 24 µL con agua estéril y se añadieron 1 µL de ADN.

La reacción fue llevada a cabo en un Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95 °C durante 3 minutos; 37 ciclos 94.5 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 60 segundos y una elongación de 72 °C durante 10 minutos. El resultado de cada amplificación se comprobó mediante electroforesis de 1 µL del producto de PCR en gel de agarosa al 1,5 % durante 30 minutos.

A continuación se retiraron los restos de cebadores y nucleótidos sobrantes del proceso de PCR, añadiendo 1,5 mL de ExoSAP-IT® (USB Corporation), a 5 µL de los productos de PCR.

Finalmente se llevó a cabo la secuenciación utilizando BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). La mezcla de reacción para cada cebador se preparó de la siguiente forma: 1,5 µL de BDT master mix, 0,5 µL de cebador, 6 µL de agua estéril y 2 µL del producto de la PCR de amplificación limpio. La reacción se llevó a cabo en un Thermal Cycler 9800 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA). La posterior purificación de este producto de PCR se realizó mediante Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Análisis bioinformático de las secuencias de ADNmt**

La edición de las secuencias se realizó mediante el programa ChromasPro v.1.34 (<http://www.technelysium.com.au/Chromas Pro.html>) y el alineamiento de las mismas con respecto a las respectivas secuencias de referencia con los programas ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007) y



SeaView v.4.3.0 (Gouy et al., 2010). Las secuencias de referencia de GenBank usadas en cada caso fueron: NC\_006853 en el caso de *B. taurus* y NC\_001941 en el caso de *O. aries*. También se descargaron todas las secuencias completas del gen *cyt b* de la subfamilia Caprinae halladas en GenBank (Tabla 3) que comprende muestras de 36 especies pertenecientes a 11 géneros diferentes. El alineamiento de las secuencias de referencia de la subfamilia Caprinae se realizó con los programas ClustalX v.2.0.11 (Larkin et al., 2007) y SeaView v.4.3.0 (Gouy et al., 2010) y los árboles Neighbor-Joining (NJ) que representan las relaciones filogenéticas entre cada una de las especies se representó mediante el software FigTree v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Los cálculos estadísticos y de intercomparación haplotípica se realizaron mediante el software Arlequin v3.1. (Excoffier et al., 2005).

## Resultados

El ADN extraído de seis piezas dentales de bóvidos y ocho de ovicaprinos mostraron resultados positivos para 11 de ellas, cuatro de bóvidos y siete de ovicaprinos. Estos resultados tienen un valor excepcional ya que se trata del primer estudio de ADN que se realiza de restos arqueológicos bovinos y ovinos del País Vasco. Además, en el caso de las muestras ovinas, los resultados de este estudio son los primeros datos de ADN mitocondrial de ovejas prehistóricas en Europa.

### Análisis de ADNmt de restos bovinos

El análisis del gen *cyt b* realizado en las muestras de bóvidos confirmó que los cuatro restos bovinos pertenecen a la especie *B. taurus*. Todas comparten una misma secuencia de *cyt b* y son iguales a la secuencia de referencia de Anderson et al., (1982) (GenBank AN. NC\_006853).

**Tabla 3:** Listado de las especies utilizadas de la subfamilia Caprinae para la realización del árbol Neighbor-Joining.

Genero	Especie	Numero acceso GenBank
Ammotragus	<i>Ammotragus lervia</i>	gij148543101:14154-15293
Budorcas	<i>Budorcas taxicolor</i>	gij255506396:14155-15294
Capra	<i>Capra aegagrus</i>	gij944541672:14151-15290
	<i>Capra caucasica</i>	gij475655868:14151-15290
	<i>Capra cylindricornis</i>	gij98991067 gb DQ514543.1
	<i>Capra falconeri</i>	gij470228648:14151-15290
	<i>Capra hircus</i>	gij316926505:14153-15292
	<i>Capra ibex</i>	gij470228693:14150-15288
	<i>Capra nubiana</i>	gij470228771:14153-15292
	<i>Capra pyrenaica</i>	gij470228814:14148-15287
	<i>Capra sibirica</i>	gij83284866 gb DQ246800.1
	<i>Capra walie</i>	gij170293699 gb EU368863.1
	Capricornis	<i>Capricornis crispus</i>
<i>Capricornis milneedwardsii</i>		gij584593643:14152-15291
<i>Capricornis sumatraensis</i>		gij470229102:14149-15288
<i>Capricornis swinhoei</i>		gij187250409:14152-15291
<i>Capricornis thar</i>		gb KT345703.1 :14152-15291
Hemitragus	<i>Hemitragus hylocrius</i>	gij66736095 gb AY846792.1
	<i>Hemitragus jayakari</i>	gij470228582:14157-15296
	<i>Hemitragus jemlahicus</i>	gij470229052:14154-15292
Naemorhedus	<i>Naemorhedus baileyi</i>	gij470235352:14152-15291
	<i>Naemorhedus caudatus</i>	gij284177699:14142-15281
	<i>Naemorhedus goral</i>	gij511534103:14149-15288
	<i>Naemorhedus griseus</i>	gij475655910:14153-15292
Oreamnos	<i>Oreamnos americanus</i>	gij470229148:14157-15296
Ovibos	<i>Ovibos moschatus</i>	gij470229219:14151-15290
Ovis	<i>Ovis ammon</i>	gij470231162:14159-15298
	<i>Ovis aries</i>	gij5835554:14159-15298
	<i>Ovis canadensis</i>	gij342240245:14156-15295
	<i>Ovis dalli</i>	gij178925164 gb EU365992.1
	<i>Ovis nivicola</i>	gij66840822 emb AJ867262.1
	<i>Ovis orientalis</i>	gij745999525:14160-15299
	<i>Ovis vignei</i>	gij745999539:14160-15299
Pseudois	<i>Pseudois nayaur</i>	gij470229271:14160-15299
	<i>Pseudois schaeferi</i>	gij372291351:14160-15299
Rupicapra	<i>Rupicapra pyrenaica</i>	gij475662388:14158-15300
	<i>Rupicapra rupicapra</i>	gij470229345:14155-15297

Una vez determinada la especie, se analizó la región D-loop. Los resultados han mostrado que los haplotipos de los restos de *B. taurus* analizados se dividen en dos haplogrupos, tres haplotipos pertenecientes al haplogrupo T3 y otro al haplogrupo T. De los cuatro restos pertenecientes a T3, dos de ellos presentaron el mismo haplotipo y en otros dos se hallaron haplotipos exclusivos. En la tabla 4 se muestran las variantes y haplogrupos de las muestras analizadas.

Las muestras AI.22B.107, AI.16Z.107 presentan el mismo haplotipo en el D-loop. Además, su secuencia es idéntica a la secuencia de referencia de Andreson et al., (1981), por lo que pertenecen al haplogrupo T3, el más común en la actualidad en Europa. Su haplotipo coincide con el de 26 muestras de Terreña, 25 de Pirenaica y 4 de Asturiana de los valles incluidas en la base de datos de ADNmt de *B. taurus* del Banco de ADN de la UPV/EHU.

**Tabla 4:** Relación de polimorfismos y haplogrupos de cada muestra de *B. taurus*.

Muestra	16.231C	16.255T	Haplogrupo
AI.22B.107.I05 6412	.	.	T3
CPL.B3.9.265.15328	.	C	T
AI.16Z.107.IB2 s/n	.	.	T3
CPL.A2.5.230.25060	T	.	T3
F.II.146.4	-	-	-
ARC-2.E3.EMTNA s/n	-	-	-

La muestra CPL.A2.230 tiene una variación con respecto a la secuencia de referencia en la posición nucleotídica 16.231. Esta posición no es característica de ningún haplogrupo, de forma que este haplotipo también se incluye en la rama T3 del árbol filogenético de ADNmt. El haplotipo de esta muestra es único y no es compartido con ninguna otra muestra analizada. En la bibliografía se han encontrado varios individuos que coinciden con el haplotipo de la muestra CPL.A2.230: dos muestras de raza Jersey y otras dos de raza Hereford (Ginja et al., 2010), ambas de origen americano, una vaca de raza Charolesa de origen europeo (Bradley et al., 1996) y dos muestras prehistóricas de yacimientos europeos de raza desconocida y aproximadamente del año 5.000 A.C. (Bollongino et al., 2005)

La muestra CPL.B3.265 tiene una única posición variable en la base 16.255 con respecto a la secuencia de referencia. Este polimorfismo es diagnóstico del haplogrupo T, un linaje más primitivo que el T3 y que actualmente sigue presente en la Península Ibérica aunque con una frecuencia muy baja (Beja-Pereira et al., 2006, Pellechia et al., 2007). Este haplotipo coincide con la muestra BT753 de raza “Asturiana de los valles” incluida en la base de datos de ADNmt de *B. taurus* del Banco de ADN de la UPV/EHU. Dicha muestra, CPL.B3.265, tiene también el mismo haplotipo que dos muestras halladas en la bibliografía, una de raza Podolia (Kantanen et al., 2009) y otra de raza Hereford (Bradley et al., 1996).

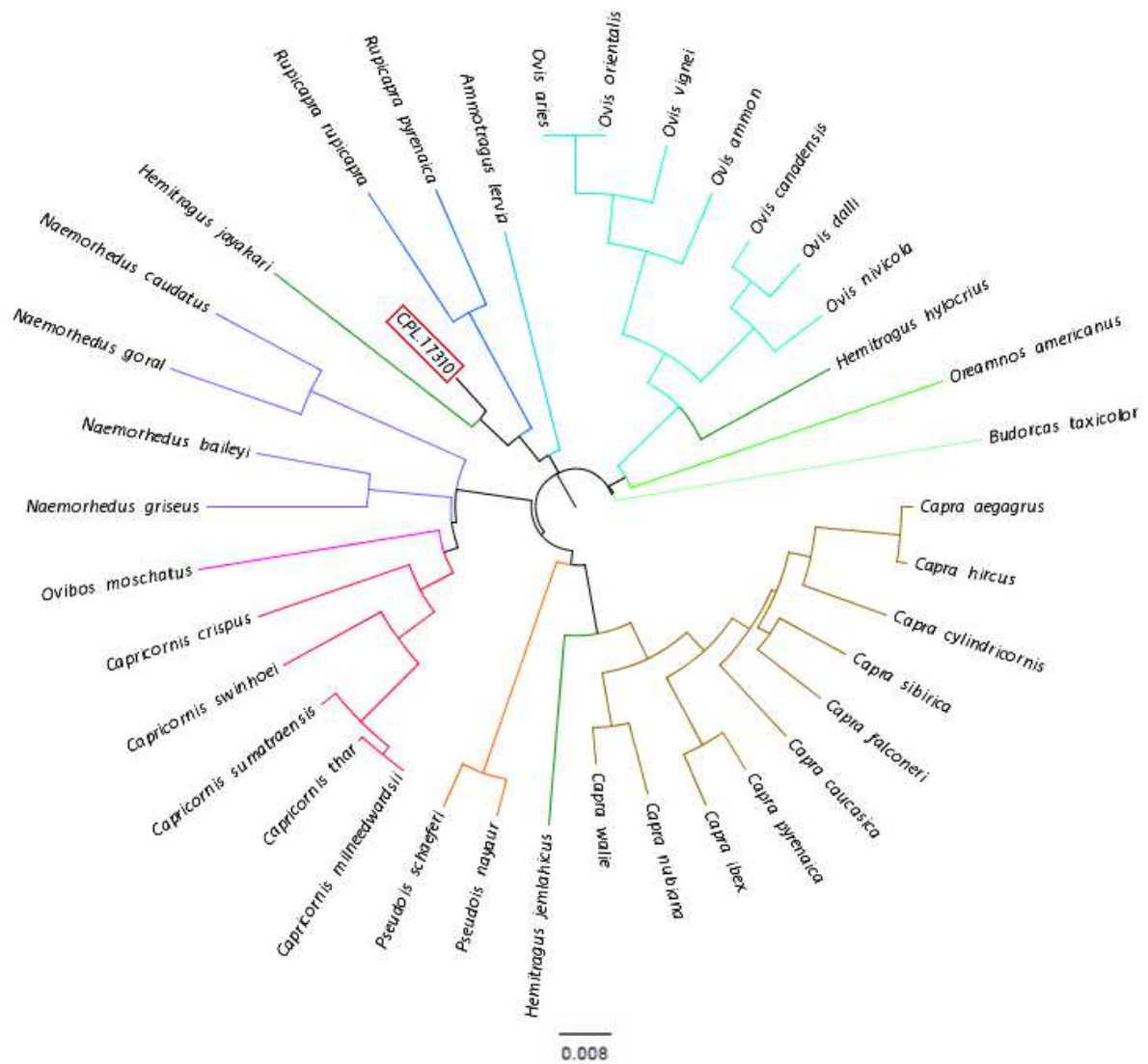
**Análisis de ADNmt de restos ovicaprinos**

El análisis del gen del *cyt b* realizado a las muestras ovicaprinas confirmó que 6 de las 7 muestras pertenecen a la especie *O. aries* ya que estas muestras tienen una secuencia del gen *cyt b* idéntica a la de la secuencia de referencia (AN NC\_001941).

Sin embargo, la muestra CPL. 17310 no se pudo asignar a la especie *O. aries* debido al elevado número de cambios que presenta con respecto a la secuencia de referencia, en concreto hasta 16 cambios en el fragmento de 205 pb analizados. También se llevó a cabo el alineamiento con la secuencia de la especie *Capra hircus* (AN NC\_005044), pero estos alineamientos tampoco permitieron confirmar la especie a la que pertenece el resto arqueológico CPL. 17310, ya que se encontraron hasta 17 posiciones variables con respecto a las secuencias consenso (Tabla 5). El árbol NJ realizado con muestras con las 36 especies de 11 géneros diferentes de la subfamilia caprinae existentes en GenBank y la muestra CPL. 17310, muestra una clara diferencia con respecto a cualquiera de las especies analizadas en el presente estudio (Figura 2).

**Tabla 5:** Diferencias en la secuencia de bases de la muestra CPL. 17310 con respecto a las secuencias consenso de *Ovis* y *Capra*.

Muestra	Secuencia de referencia
Ref Ovis	105T 117T 135T 169C 171C 174C 179C 210C 222C 225T 243T 259G 267A 270T 285T 289G 292A 294C
Ref Capra	081C 102A 114A 117T 121C 126C 132A 139G 174C 189T 201T 225T 234C 267A
CPL.17310	T C C C C T T G C A T C T T C C T T T C T C G G C C A G A



**Figura 2:** Árbol filogenético NJ de 36 especies de 11 Géneros de la subfamilia caprinae y la muestra CPL. 17310 analizada en este estudio. La muestra CPL. 17310 aparece marcada mediante un cuadro en color rojo.

El posterior análisis de la región del D-loop de las seis muestras clasificadas genéticamente como *O. aries* demostró que la secuencia del D-loop analizada era idéntica a la secuencia de referencia (AN NC\_001941), es decir, las 6 presentan el mismo haplotipo. A su vez esto permite confirmar que todas las muestras estudiadas pertenecen al haplogrupo B, el más común de Europa en la actualidad.

## Discusión

El avance de las técnicas de análisis en Biología Molecular ha permitido abordar estudios como el que se presenta en el presente trabajo, donde se muestran por primera vez datos genéticos sobre vacas prehistóricas en el País Vasco y sobre ovejas prehistóricas en Europa.

El rendimiento de la extracción de ADN fue significativamente elevado ya que se obtuvieron resultados de casi la totalidad de los restos analizados. El hecho de que algunas muestras no presentasen la suficiente cantidad de ADN podría ser debido a la elevada degradación. Además, se da la circunstancia de que las muestras de las que no fue posible extraer ADN proceden de yacimientos al aire libre. Esta localización pudo haber contribuido a una mayor degradación a pesar de tratarse de muestras mucho más recientes (época romana) que otras incluidas en este estudio.

En el caso de los bóvidos analizados, todos pertenecen a la especie *B. taurus*. No se ha detectado la presencia de *B. primigenius*, el ancestro de *B. taurus* entre las muestras analizadas, ello no descarta que hace 7.000 años esta especie aún se encontrase en la zona geográfica a la que pertenecen los restos analizados, si bien, los yacimientos arqueológicos de rebaños domésticos de las zonas estudiadas presentan linajes maternos exclusivamente de la especie *B. taurus*.

La mayoría de los individuos bovinos analizados, con antigüedades comprendidas entre los 7.000 y los 4.000 años, se incluyen dentro del haplogrupo T3, el haplogrupo actualmente más común en Europa (Achilli et al., 2009, Troy et al., 2001, Kantanen et al., 2009). De esta forma, es posible afirmar que la especie *B. taurus* ya se encontraba en el área del País Vasco, tanto en la vertiente mediterránea como en la atlántica desde hace aproximadamente 7.000 años. Este resultado parece confirmar que la domesticación, y por tanto, la ola neolítica proveniente de Oriente Próximo había llegado a este extremo de Europa hace 7.000 años, justo en el límite de lo postulado por Oms et al., (2014) y Antolin et al., (2015a y 2015b) quienes afirman que el Neolítico llegó a la Cornisa Cantábrica en el periodo 5.400-2.300 AC.

Además, hay que tener en cuenta que uno de los haplotipos encontrados coincide con el de un individuo actual BT753 del norte de la Península Ibérica incluido en la base de datos de ADNmt del Banco de ADN de la UPV/EHU. Esto podría reflejar un largo periodo de permanencia de este linaje en esta región y por tanto, una posible existencia de continuidad genética de los linajes maternos, no

solo a nivel de haplogrupos sino también de haplotipos. De esta forma, podría pensarse que existe una conexión genética entre los individuos que habitaron esta región desde el Neolítico peninsular hasta las actuales razas autóctonas de la zona. Por otro lado, la coincidencia del haplotipo en un individuo prehistórico y otro actual puede no ser debida a identidad por descendencia, sino por estado, lo que no apoyaría la continuidad del haplotipo. Sin embargo, la escasa frecuencia de este polimorfismo indica que esta posición no es un hot-spot de mutación en el ADNmt lo que refuerza la hipótesis de que estos haplotipos puedan ser idénticos por descendencia.

En el caso de las muestras prehistóricas de origen ovicaprino, resulta especialmente destacable el hecho de que la muestra CPL. 17310 no haya podido ser clasificada mediante análisis del *cyt b*, ni como *O. aries*, ni como especie conocida de la subfamilia Caprinae. Las diferencias en su secuencia de bases con respecto a las diferentes secuencias de *Ovis* y *Capra* analizadas hacen pensar que pueda tratarse de una especie extinta o una especie de la que actualmente no se dispone aún de datos genéticos en ninguna base de datos. Este hecho ha sido confirmado mediante el árbol filogeográfico NJ realizado (Figura 2) que muestra una clara separación de la muestra CPL. 17310, situándola separada de las demás especies en una rama independiente. Este hecho podría indicar el hallazgo de una especie extinta que tal vez el análisis de un mayor número de muestras ovicaprinas en el futuro, tanto actuales como arqueológicas, podría ayudar a conocer el origen de este espécimen.

Todas las muestras de D-loop de *O. aries* analizadas pertenecen al haplogrupo B; este linaje es el más frecuente en Europa actualmente (Pedrosa et al., 2007, Pereira et al., 2006, Tapio et al., 2006). De la misma forma que ocurre para el haplogrupo T3 en bóvidos, la presencia del haplogrupo B es mayoritario respecto a los demás haplogrupos en todas las épocas analizadas, incluyendo el Neolítico, y en ambas vertientes mediterránea y atlántica. Por un lado, esto confirma nuevamente que la domesticación ya había llegado a la Cornisa Cantábrica hace aproximadamente 7.000 años y por otro lado, apoya la continuidad genética en la región a través del linaje B desde el Neolítico hasta la actualidad.

En síntesis, el análisis del gen del *cyt b* del ADNmt se confirma como una herramienta de gran utilidad en la determinación de la especie de origen en muestras arqueológicas. Además,

mediante la identificación especie-específica de restos de *B. taurus* y *O. aries* correspondientes al Neolítico, se ha podido determinar que la domesticación ya había llegado a la Cornisa Cantábrica hace aproximadamente 7.000 años. Por otro lado, se ha observado la existencia de continuidad genética de las dos especies y en ambas vertientes, mediterránea y atlántica, desde el Neolítico hasta la actualidad. Se ha podido determinar incluso que algunos animales autóctonos actuales tienen haplotipos que ya se encontraban en la zona 7.000 años atrás, lo que muestra una larga continuidad del asentamiento de las especies domésticas en la Cornisa Cantábrica.

### Conclusiones

Los resultados de este estudio confirman la presencia en el área del País Vasco de especies de ganado doméstico actual, tanto bovino, *Bos taurus*, como ovino, *Ovis aries*, desde el Neolítico, hace aproximadamente 7.000 años. Asimismo, asumiendo como principal foco de domesticación el Oriente Próximo, estos resultados suponen una prueba de que la ola de neolitización proveniente del este ya había llegado a la Cornisa Cantábrica, incluyendo la vertiente atlántica, hace aproximadamente 7.000 años.

Por otro lado, el hecho de compartición de un mismo haplotipo en un resto prehistórico y un individuo bovino actual parece indicar la existencia de continuidad genética en la zona desde la época neolítica. Esto a su vez permite inferir que al menos algunas de las razas autóctonas actuales podrían llevar asentadas en la zona desde hace varios miles de años. En este sentido, sería necesario analizar en mayor profundidad los linajes de ADNmt con el objetivo de estudiar su grado de adaptación al medio.

Señalar también que el análisis del gen *cyt b* de la muestra caprina CPL. 17310 no reveló similitudes con ninguna de las especies de la subfamilia caprinae con las que se ha comparado por lo que no pudo ser clasificada dentro de ninguna especie conocida. Este hecho podría indicar el hallazgo de una especie extinta sin clasificar o una especie de la que actualmente no se dispone aún de datos genéticos en ninguna base de datos.



## Agradecimientos

A. López-Oceja agradece al Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno del País Vasco por su beca predoctoral y al grupo consolidado TI-833-13 y UFI 11/32 de la UPV / EHU. Los autores agradecen a la Dr. Maite Álvarez por su apoyo técnico y humano proporcionado por el Servicio de Banco de ADN (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV / EHU).

## Bibliografía

- Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., Al-Zahery N., Accetturo M., Pala M., Hooshiar Kazan B., Perego U.A., Battaglia V., Fornarino S., Kalamati J., Houshmand M., Negrini R., Semino O., Richards M., Macaulay V., Ferretti L., Bandelt H., Ajmone-Marsan P., Torroni A. (2009). Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr Biol.* 18: 157-158.
- Anderson S., M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, I. C. Eperon F. Sanger and I. G. Young. (1981) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. Laboratory of Molecular Biology The Medical Research Council Centre, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, England.
- Anderung C., Bouwman A., Persson P., Carretero J.M., Ortega A.I., Elburg R., Smith C., Arsuaga J.L., Ellegren H., Götherström A. (2005). Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated by genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(24):8431-8435.
- Bataille M., Crainic K., Leterreux M., Durigon M., de Mazancourt P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci Int.* 99: 165-170

- Beja-Pereira A. et al. (2006). The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8113-8118.
- Bradley DG, Machugh DE, Cunningham P, Loftus RT (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5131–5135.
- Bollongino R., C. J. Edwards, K. W. Alt, J. Burger and D. G. Bradley (2005). Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA. *Biol. Lett.* 2, 155–159
- Bruford M.W., Bradley D.G. and Luikart G. (2003). DNA Markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet.* 4(11):900-910.
- Cai D.W., Han L., Zhang X.L., Zhou H., Zhu H. (2007) DNA analysis of archaeological sheep remains from China. *Journal of Archaeological Science.* 34: 1347-1355.
- Cooper A. & Poinar H. (2000). Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science.* 289 (5482): 1139
- Edwards C.J., Magee D.A., Park S.D.E., McGettigan P.A., Lohan A.J., Murphy A., Finlay E.K., Shapiro B., Chamberlain A.T., Richards M.B., Bradley D.G., Loftus B.J., MacHugh D.E. (2010). A Complete Mitochondrial Genome Sequence from a Mesolithic Wild Aurochs (*Bos primigenius*). *PLOS One.* 5:2:e9255
- Ginja C, Penedo MC, Melucci L, Quiroz J, Martínez López OR, Revidatti MA, Martínez-Martínez A, Delgado JV & Gama LT. (2010). Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Anim Genet* 41: 128-41.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010). SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution.* 27(2):221-224.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R. and Janke A. (1998). The Complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* 47 (4): 441-448
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947-2948.
- Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Castañón P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspinas A.S., Slatkin M., Hofreiter M. (2009). Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication. *Science.* 324 ( 5926): 485.

- Marshall O.J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20(15):2471-2472 .
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E. and Kijas J.W. (2007). Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. *Genetics* 175: 1371-1379.
- Mona S., Catalano G., Lari M., Larson G., Boscato P., Casoli A., Sineo L., Di Patti C., Pecchioli E., Caramelli D., Bertorelle G. (2010). Population dynamic of the extinct European aurochs: genetic evidence of a north-south differentiation pattern and no evidence of post-glacial expansion. *BMC Evol Biol.*10(1):83.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M. (2004). Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38: 645-79.
- Pedrosa S., Arranz J.J., Brito N., Molina A., San Primitivo F., Bayón Y. (2007). Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet Sel Evol.* 39:91-103.
- Pereira F., Davis SJM., Pereira L., McEvoy B., Bradley DG., Amorim A. (2006). Genetic Signatures of a Mediterranean Influence in Iberian Peninsula Sheep Husbandry. *Mol Biol Evol* 23 (7): 1420-1426.
- Stock F., Edwards C. J., Bollongino R., Finlay E. K., Burger J., Bradley D. G. (2009). Cytochrome b sequences of ancient cattle and wild ox support phylogenetic complexity in the ancient and modern bovine populations. *Anim Genet.* 40(5):694-700.
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Činkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H., Kantanen J. (2006). Sheep Mitochondrial DNA Variation in European, Caucasian, and Central Asian Areas. *Mol Biol Evol.* 23 (9): 1776-1783.
- Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C., Bradley D.G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature.* 410(6832):1088-91.
- Zehner R., Zimmermann S., Mebs D. (1998). RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int. J. Legal Med.* 111: 323-327

### Paginas web

<http://www.technelysium.com.au/Chromas Pro.html>

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>



### **4.3 Grupo 2: Identificación y screening de especies mediante el desarrollo de una nueva pareja de cebadores universales situados en el gen *cyt b*.**

#### **4.3.1 Estudio 4: “New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysis”**

Este estudio se centra en el segundo objetivo general de este trabajo mediante la consecución de los objetivos específicos 4 y 5.

La identificación de especies mediante herramientas moleculares se ha convertido en una herramienta imprescindible en la práctica de la rutina forense. Los genes citocromo oxidasa I (*COI*) y citocromo b (*cyt b*) son los marcadores moleculares comúnmente más utilizados, siendo el *cyt b* el más utilizado en el campo forense. Estos genes tienen regiones altamente conservadas entre individuos de la misma especie, las cuales se vuelven más diferentes a medida que las especies se distancian filogenéticamente.

Los cebadores universales diseñados para genes como el *cyt b* han sido ampliamente utilizados. En el *cyt b* la región más utilizada para el diseño de cebadores universales ha sido la región de las primeras 400 pb (Linacre et al., 2011). Cebadores como los diseñados por Parson et al., (2000) son comúnmente utilizados en el campo forense, pero su tamaño de 358 pb, podría suponer un problema en muestras altamente degradadas. En casos de muestras muy degradadas, la utilización de cebadores que amplifican regiones inferiores a 200 pb tienen mayores probabilidades de éxito de amplificación (Hajibabaei et al., 2006 y 2007).

El objetivo del presente trabajo ha sido la creación de una pareja de cebadores universales que amplifiquen una pequeña región (148 pb) del gen mitocondrial *cyt b* en el mayor número de especies posible, incluso en muestras degradadas o con poco ADN.

El diseño inicial se hizo mediante la descarga de las secuencias del *cyt b* de las 751 especies que se hallaron en GenBank. Se seleccionaron varias zonas del gen con una alta variabilidad interespecífica

y rodeadas de regiones altamente conservadas donde diseñar la pareja de cebadores. Finalmente, se eligió entre las regiones seleccionadas la que tenía un mayor poder de discriminación entre especies.

Una vez diseñados los cebadores, se optimizó su análisis en mamíferos y se probaron con la mayor cantidad de especies posibles, incluidas especies no mamíferas. Se analizaron muestras de 63 especies con un alto interés forense, alimentario y ecológico pertenecientes a 38 Familias y 14 Ordenes, de 5 Clases diferentes (Mamíferos, Aves, Reptiles, Actinopterygios y Malacostráceos). El 100% de las especies analizadas pudieron ser amplificadas y secuenciadas correctamente con los cebadores diseñados.

Se pudo apreciar que aunque el fragmento amplificado con los cebadores diseñados en el presente estudio pueden tener algunas limitaciones a la hora de clasificar las especies filogenéticamente, los resultados son similares a los de cebadores que amplifican regiones mayores de *cyt b*, como los descritos por Hebert et al., (2003) o Parson et al., (2000) ya que éstos no proporcionan una mayor información filogenética. Incluso fragmentos mucho más largos como el *cyt b* completo muestran también limitaciones, con el inconveniente de falta de eficacia para amplificar muestras de ADN degradado.

Forensic Science International: Genetics. Doi: 10.1016/j.fsigen.2016.05.001

## New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysis

Lopez-Oceja A.<sup>1</sup>, Gamarra D.<sup>1</sup>, Borragan S.<sup>2</sup>, Jiménez-Moreno S.<sup>3</sup>, de Pancorbo M.M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>BIOMICS Research Group, University of the Basque Country, UPV/EHU. 01006, Vitoria-Gasteiz, Spain.

<sup>2</sup>Parque de la Naturaleza de Cabárceno. 39693, Obregón (Cantabria), Spain.

<sup>3</sup>Area of Forensic and Legal Medicine, Pathology and Surgery Dept., Miguel Hernández University of Elche. 03550, Elche (Alicante), Spain.

Corresponding author: Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; Email: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Abstract

Analysis of mitochondrial DNA, and in particular the cytochrome b gene (*cyt b*), has become an essential tool for species identification in routine forensic practice. In cases of degraded samples, where the DNA is fractionated, universal primers that are highly efficient for the amplification of the target region are necessary. Therefore, in the present study a new universal *cyt b* primer set with high species identification capabilities, even in samples with highly degraded DNA, has been developed. In order to achieve this objective, the primers were designed following the alignment of complete sequences of the *cyt b* from 751 species from the Class of Mammalia listed in GenBank. A highly variable region of 148 bp flanked by highly conserved sequences was chosen for placing the primers. The effectiveness of the new pair of primers was examined in 63 animal species belonging to 38 Families from 14 Orders and 5 Classes (Mammalia, Aves, Reptilia, Actinopterygii, and Malacostraca). Species determination was possible in all cases, which shows that the fragment analyzed provided a high capability for species identification. Furthermore, to ensure the efficiency of the 148 bp fragment, the intraspecific variability was analyzed by calculating the concordance between individuals with the BLAST tool from the NCBI (National Center for Biotechnological Information). The intraspecific concordance levels were superior to 97% in all species. Likewise, the

phylogenetic information from the selected fragment was confirmed by obtaining the phylogenetic tree from the sequences of the species analyzed. Evidence of the high power of phylogenetic discrimination of the analyzed fragment of the *cyt b* was obtained, as 93.75% of the species were grouped within their corresponding Orders. Finally, the analysis of 40 degraded samples with small-size DNA fragments showed that the new pair of primers permits identifying the species, even when the DNA is highly degraded as it is very common in forensic samples.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, cytochrome b, forensic.

## Introduction

Species identification of biological samples of unknown origin is a critical aspect in routine forensic practice. It is commonly used in criminal cases when non-human samples are involved [1]. In addition to the identification of domestic animal species in routine forensic casework, the determination of other species is also of importance, for instance, in entomological species [2][3], in alleged wildlife crimes [4][5] involving poaching, illegal trading of endangered species or traffic accidents, and in food industry to avoid adulteration of foodstuffs [6][7].

The most frequent loci used for species identification in forensic, phylogenetics, and biodiversity studies are mitochondrial cytochrome b (*cyt b*) [1][8][9] and cytochrome c oxidase subunit 1 (*COI*) [10]. Moreover, the 12S ribosomal RNA [11] and 16S ribosomal RNA [12] genes have also been used for molecular analysis in species determination. In mammals the *cyt b* locus provides an accurate reconstruction of the phylogeny at the levels of Superorder, Order, and Family [13]. Nowadays, DNA analysis by PCR has become routinely used method for identifying species [14], as it allows amplifying regions of specific genes of interest. The conserved regions suitable for primer design allow the use of universal primer sets in species identification. The criteria for an ideal species marker, is to be a sequence which show sufficient variability between species and no or little intraspecies variation, such that two closely related members of the same genus could be separated [15], are short enough to be sequenced in a reaction, and possess a conserved region for the location of universal primers [16]. The first primer set that amplified a section of the *cyt b* was designed by Paavo et al., [8] and later modified by Kotcker et al., [17] and Hsieh et al., [9]. Several universal primer sets that discriminates a high number of species, have been developed for forensic



purposes in the *cyt b* gene, being typically selected the first 400 bases [5]. However, in certain taxonomic groups, there could be enough variation in the flanking segments on either side of the selected fragment which may limit amplicon success [18].

Current *cyt b* primers [1][9] are very useful for species identification in samples that contain undegraded DNA fragments, but the applicability of such amplicons could be compromised in feces and other forensic samples in which high degradation is frequent [19]. Given that DNA fragments <200 bp are the average template size in highly degraded samples [20][21], smaller amplicons are the best option for an efficient species identification. For this reason, Hajibabaei et al., [22][23] developed mini-barcodes from the *COI* and *cyt b* whose sequences are short and therefore suitable for degraded samples, while could provide excellent resolution capacity at the species level, but they have been tested almost only in datasets.

Elaborating on this same idea, the purpose of the study was to increase the species identification capability in samples with highly degraded DNA by finding new regions in which to design universal primers in the *cyt b* gene, because it is the most commonly used in forensic laboratories. The alignment of the mtDNA sequences from 751 mammal species available at GenBank permitted identifying a fragment of 148 bp in this gene that showed to be highly variable between species, and flanked by highly conserved regions which allowed primers to be designed to either end. With the aim of checking the effectiveness of the designed primers, we proceeded to analyze 63 species belonging not only to the Class Mammalian but also to the Classes Aves, Reptilia, Actinopterygii, and Malacostraca. The results showed that the fragment analyzed permits identifying each one of the species, even in samples whose DNA is highly degraded.

## Materials and methods

For the primer design, complete *cyt b* sequences of 751 mammal species (about 1140 bp) were downloaded from GenBank (Table S1). These sequences were aligned with ClustalX v.2.0.11 software [24]. Once the alignments for the *cyt b* gene were obtained, and in order to permit the identification of the greatest possible number of species, we proceeded to search for highly variable zones between species that might be flanked by better conserved regions. A fragment of 148 bp was selected, excluding the primer sequence, between nucleotide positions 15601 and 15748 of human mtDNA in accordance with the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) [25]. Primer design

was carried out with PerlPrimer software [26]. The forward primer was called L15601: 5'-TACGCAATCCTACGATCAATTCC-3' and the reverse primer was called H15748: 5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTAG-3'.

Then, a set of 63 species belonging to 38 Families from 14 Orders and 5 different Classes were collected to verify the effectiveness of the designed primers (Table 1). This wide diversity of genera and Families was chosen in order to observe the efficiency of the primers beyond the mammalia group from which they were designed. Moreover, species selection was made keeping forensic, food, and ecological interests in mind. Individuals from three domestic miniature species (*Ovis aries*, *Capra hircus*, and *Equus ferus caballus*) were also analyzed, as well as from two breeds of geographically isolated domesticated species, the Watusi breed from Africa belonging to *Bos taurus* and the pot-bellied breed from Vietnam belonging to *Sus scrofa domesticus*. Samples from domestic animals came from saliva and samples from taxonomically common edible species were obtained from blood and muscle tissue from entire animals. Additionally, 40 degraded samples from wild species originated from feces were obtained at the Cabárceno Natural Park, where each species is located in enclosed areas.

**Table 1.** Analyzed species arranged according to their Class, Order, and Family. Bl: blood; Ti: muscle tissue; Fe: feces; N: Number of sequences with the fragment of 148 bp of the *cyt b* from GenBank utilized for each species. ANI: Average nucleotide identity.

Class	Order	Family	Common name	Scientific name	Accession no.	Matrix	N	ANI	
Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	Cattle	<i>Bos taurus</i>	KT009008	Bl	321	99.88	
			Cattle (Watusi)	<i>Bos taurus</i>	KT009009	Fe	321	99.88	
			Gaur	<i>Bos gaurus</i>	KT008977	Fe	7	99.86	
			Yak	<i>Bos grunniens</i>	KT009010	Fe	81	99.67	
			Sheep	<i>Ovis aries</i>	KT008993	Bl	439	99.68	
			Miniature sheep	<i>Ovis aries</i>	KT008994	Fe	439	99.68	
			Goat	<i>Capra hircus</i>	KT008956	Bl	176	99.89	
			Miniature goat	<i>Capra hircus</i>	KT008957	Fe	176	99.89	
			Waterbuck	<i>Kobus</i>	KT008966	Fe	5	99.00	
				<i>ellipsiprymnus</i>					
			Lechwe	<i>Kobus leche</i>	KT008967	Fe	4	100.00	
			Addax	<i>Addax</i>	KT008943	Fe	2	100.00	
				<i>nasomaculatus</i>					
			Water buffalo	<i>Bubalus bubalis</i>	KT008952	Fe	77	98.68	
		European bison	<i>Bison bonasus</i>	KT008948	Fe	6	99.67		
		Common eland	<i>Tragelaphus oryx</i>	KT008972	Fe	4	98.50		
		Suidae	Domestic pig	<i>Sus scrofa domesticus</i>	KT008961	Bl	410	97.93	
			Domestic pig (Pot-bellied)	<i>Sus scrofa domesticus</i>	KT008962	Fe	410	98.64	
			Wild boar	<i>Sus scrofa</i>	KT008982	Ti	26	98.31	
			Warthog	<i>Phacochoerus</i>	KT008974	Fe	5	96.20	

Class	Order	Family	Common name	Scientific name	Accession no.	Matrix	N	ANI
		Cervidae	Red deer	<i>africanus</i> <i>Cervus elaphus</i>	KT008964	Ti	103	98.24
			Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	KT008971	Ti	53	99.38
			Reeves's muntjac	<i>Muntiacus reevesi</i>	KT008990	Fe	4	99.75
		Camelidae	Bactrian camel	<i>Camelus bactrianus</i>	KT008958	Fe	31	98.97
		Giraffidae	Giraffe	<i>Giraffa camelopardalis</i>	KT008978	Fe	64	98.73
		Hippopotamidae	Hippopotamus	<i>Hippopotamus amphibius</i>	KT008980	Fe	27	99.96
	Perissodactyla	Equidae	Horse	<i>Equus ferus caballus</i>	KT008954	Bl	490	98.99
			Miniature horse	<i>Equus ferus caballus</i>	KT008955	Fe	490	99.77
			Donkey	<i>Equus asinus</i>	KT008953	Fe	74	99.12
			Somali wild ass	<i>Equus asnius somalicus</i>	KT008944	Fe	6	99.50
			Grévy's zebra	<i>Equus grevyi</i>	KT008959	Fe	5	99.40
		Rhinocerotidae	White rhinoceros	<i>Ceratotherium simum</i>	KT009002	Fe	6	99.50
	Lagomorpha	Leporidae	European rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	KT008969	Ti	49	97.82
	Carnivora	Canidae	Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	KT008998	Fe	653	99.93
			Wolf	<i>Canis lupus</i>	KT008987	Fe	84	99.69
		Felidae	Cat	<i>Felis silvestris</i>	KT008976	Fe	11	99.27
			Jaguar	<i>Panthera onca</i>	KT008983	Fe	4	100.00
			Tiger	<i>Panthera tigris</i>	KT009004	Fe	44	99.32
			Lion	<i>Panthera leo</i>	KT008985	Fe	54	99.22
			Eurasian lynx	<i>Lynx lynx</i>	KT008986	Fe	3	100.00
		Hyaenidae	Spotted hyena	<i>Crocuta crocuta</i>	KT008979	Fe	7	98.14
		Ursidae	Brown bear	<i>Ursus arctos</i>	KT008992	Fe	187	98.89
	Primates	Hominidae	Human	<i>Homo sapiens</i>	KT008981	Bl	1000*	100.00
	Rodentia	Muridae	Brown rat	<i>Rattus norvegicus</i>	KT009001	Ti	239	98.76
		Chinchillidae	Long-tailed chinchilla	<i>Chinchilla lanigera</i>	KT008963	Fe	1	100.0
		Caviidae	Guinea pig	<i>Cavia porcellus</i>	KT008965	Fe	37	99.08
		Sciuridae	Black-tailed prairie dog	<i>Cynomys ludovicianus</i>	KT008997	Fe	11	99.09
		Hystricidae	Cape porcupine	<i>Hystrix africaeaustralis</i>	KT009000	Fe	1	94.00
Aves	Galliformes	Phasianidae	Chicken	<i>Gallus gallus domesticus</i>	KT008975	Ti	111	99.88
			Wild turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	KT008996	Ti	3	100.00
	Struthioniformes	Struthionidae	Common quail	<i>Coturnix coturnix</i>	KT008968	Ti	6	100.00
			Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	KT008945	Fe	7	99.00
		Dromaiidae	Emu	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	KT008973	Fe	3	100.0
Reptilia	Testudines	Agrionemys	Russian tortoise	<i>Testudo horsfieldii</i>	KT009007	Fe	26	99.46
		Testudinidae	Red-footed tortoise	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	KT009006	Fe	17	97.94
			African spurred tortoise	<i>Geochelone sulcata</i>	KT009005	Fe	1	100.00
Actinopterygii	Anguilliformes	Congridae	European conger	<i>Conger conger</i>	KT008970	Ti	-	-
		Salmonidae	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	KT009003	Ti	14	99.36
	Perciformes	Bramidae	Atlantic pomfret	<i>Brama brama</i>	KT008995	Ti	2	98.50
		Xiphiidae	Swordfish	<i>Xiphias gladius</i>	KT008999	Ti	15	99.67
		Scombridae	Albacore	<i>Thunnus alalunga</i>	KT008950	Ti	21	99.00
		Polyprionidae	Atlantic wreckfish	<i>Polyprion americanus</i>	KT008989	Ti	2	97.00
		Sparidae	Blackspot seabream	<i>Pagellus bogaraveo</i>	KT008947	Ti	8	100.00
	Gadiformes	Gadidae	Blue whiting	<i>Micromesistius poutassou</i>	KT008946	Ti	16	98.50
		Phycidae	Greater forkbeard	<i>Phycis blennoides</i>	KT008988	Ti	6	100.00
	Pleuronectiformes	Soleidae	Common sole	<i>Solea solea</i>	KT008984	Ti	310	98.68
Malacostraca	Decapoda	Cancriidae	Brown crab	<i>Cancer pagurus</i>	KT008951	Ti	-	-
		Majidae	European spider crab	<i>Maja squinado</i>	KT008960	Ti	-	-
		Nephropidae	Common lobster	<i>Homarus</i>	KT008949	Ti	1	100.00

Class	Order	Family	Common name	Scientific name	Accession no.	Matrix	N	ANI
		Portunidae	Velvet crab	<i>gammarus</i> <i>Necora puber</i>	KT008991	Ti	-	-

DNA from each of these matrices was extracted differently, and in all cases the manufacturers' recommendations were followed. Blood samples were collected into 10 mL BD Vacutainer EDTA tubes (BD Vacutainer, Plymouth, UK). DNA was extracted by saline precipitation following the Genra Puregene Blood Kit (Qiagen) protocol. Five mg were taken from each muscle tissue sample, whose DNA was extracted by saline precipitation with the Genra Puregene Tissue Kit (Qiagen). Two hundred mg were taken from each feces sample and its DNA was extracted with the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). DNA samples were quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and diluted to 1 ng/ $\mu$ L.

PCR amplification was optimized under the following conditions: 1.5  $\mu$ L of dNTPs (2.5  $\mu$ M), 1  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ M), 2.5  $\mu$ L of buffer (10X), 0.6  $\mu$ L of each primer at a 5  $\mu$ M concentration, 1  $\mu$ L of bovine serum albumin (BSA, 10 ng/mL), and 0.3  $\mu$ L of Taq polymerase (5 U/mL); sterile water was used to bring it to a final volume of 20  $\mu$ L, and 5  $\mu$ L of DNA (1 ng/ $\mu$ L) were added. The reaction was carried out in a Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) under the following conditions: initial denaturalization for 11 min at 95°C; 32 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 45 s at 72°C; then a final extension for 5 min at 72°C. Direct cycle sequencing was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and primers L15601 and H15748. The amplified DNA products were sequenced on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). These sequences were edited with ChromasPro v.1.34 software (Technelysium Pty Ltd.). Once edited, they were aligned using ClustalX v.2.0.11 [24]. The sequences obtained in this study for the *cyt b* gene were loaded in GenBank with accession numbers KT008943 - KT009010.

The differences between species and the intraspecific homology in the set of sequences from each species were estimated by calculating the average nucleotide identity (ANI) provided by the BLAST analysis [27] [28].

A neighbor-joining (NJ) tree based on the 148 bp *cyt b* fragment from the studied species was constructed in order to visualize the phylogenetic information provided by the amplified

fragment. Additionally, to confirm that the studied fragment provided phylogenetic information similar to the complete *cyt b* gene a NJ tree was constructed based on a set of 751 mammal species. NJ trees from other fragments commonly used in species identification such as the 358 bp *cyt b* fragment [1] and the 658 bp *COI* fragment [10] were also built for comparison purposes, including 58 and 61 species respectively. The NJ trees were constructed using ClustalX v.2.0.11 [24] and FigTree v.1.4.2 software [29].

## Results

Complete *cyt b* sequences of 751 mammal species were downloaded from GenBank, and we proceeded with their alignment in order to search for a highly conserved zone in which to place a pair of primers that would permit amplification of a highly variable fragment between the species (Figure S1). Regions with greater variability were sought first. The degree of variability of the different regions of the *cyt b* gene was analyzed with the sequences from the 751 species by the score column values obtained with ClustalX v.2.0.11 software (Figure 1). Six regions showed high variability between species. Region VI of 148 bp from *cyt b*, located between 15601-15748 bp from the rCRS sequence [25], was chosen for the design of the primers that were positioned within the flanking regions and called L15601 and H15748. This fragment was chosen because it showed the greatest degree of variability between the selected regions, in addition to possessing an adequate length for correct intraspecific discrimination.



**Figure 1.** Alignment results of the sequences from the *cyt b* of 751 mammalian species by ClustalX v.2.0.11 software. The numbered regions indicate zones with high variability, regions I to V have not been selected, while Region VI is that which has been selected. The framed areas flanking Region VI correspond to primers L15601 and H15748.

To verify the species identification capability of the selected fragment, biological samples were taken from 63 individuals belonging to different species within a wide taxonomic spectrum of mammals, birds, reptiles, fish, and crustaceans. Samples of saliva, blood, or muscle tissue were taken from edible and domesticated animals, while feces were so from those wild. Using the new universal primer pair L15601 and H15748, we successfully PCR amplified and sequenced the *cyt b* fragment in all individuals from the different species. Comparison of 58 of the sequences obtained with those existing at GenBank showed good concordance with each one of the starting species; therefore, the identification capability of the chosen segment proved to be adequate throughout the entire wide range of the analyzed species. Sequences from four species (*Conger conger*, *Cancer pagurus*, *Maja squinado*, and *Necora puber*) could not be compared because no registries existed for them in the

GenBank database. These sequences are now available under the accession numbers KT008970, KT008951, KT008960 and KT008991, respectively.

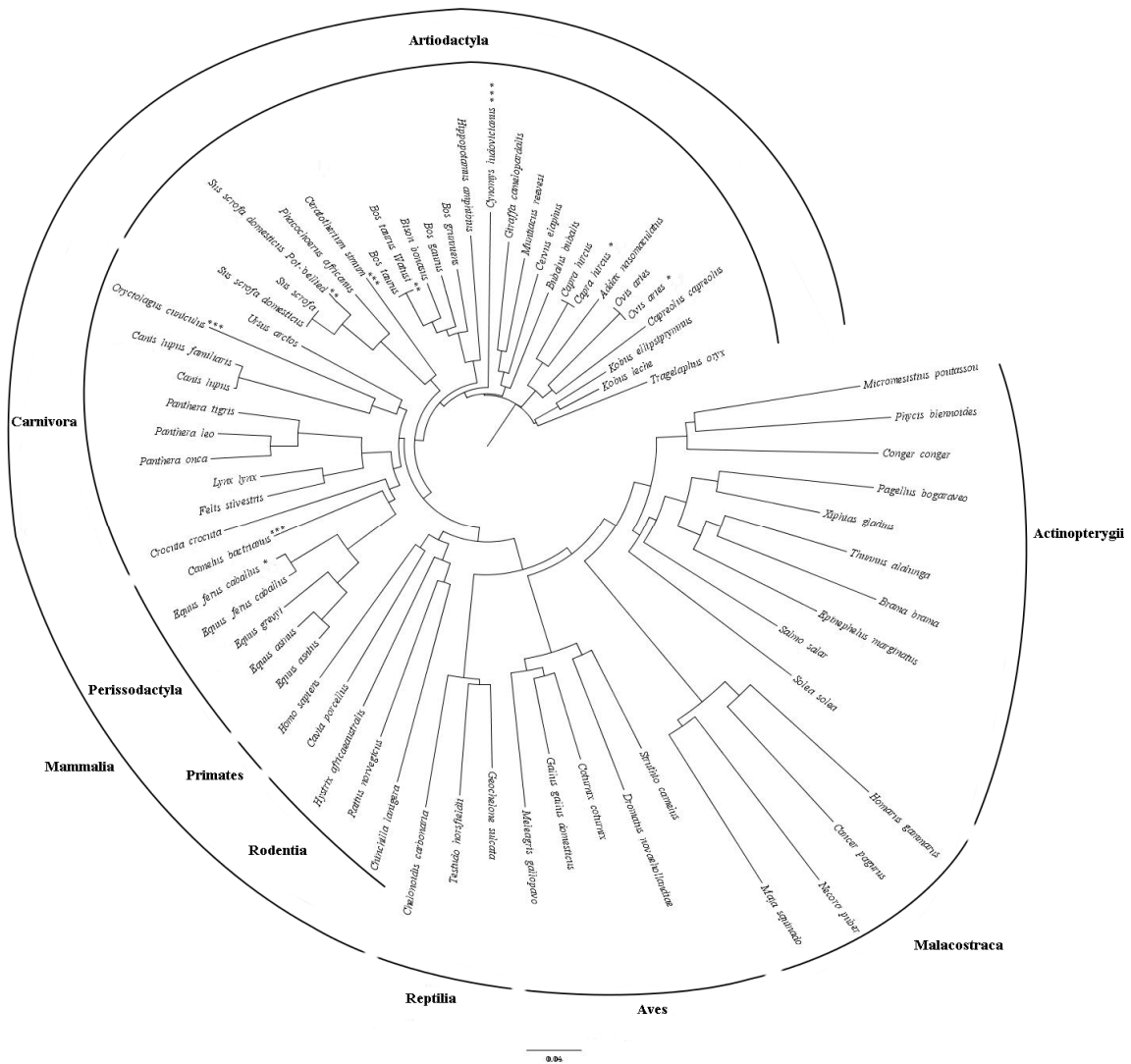
A representation of the 148 bp *cyt b* fragment of the species studied was created in a NJ tree (Figure 2) in order to visualize the phylogenetic information content provided by the amplified fragment. All species were clearly arranged in their five taxonomic Classes. The Class represented most abundantly in this study was that of mammals, with 46 individuals belonging to 41 species divided into six different Orders. In turn, 42 of these individuals (93.75%) were grouped into clusters within their corresponding Orders. Only four species (*Cynomys ludovicianus*, *Ceratotherium simum*, *Oryctolagus cuniculus*, and *Camelus bactrianus*) were placed in Orders different from where they corresponded. Another three NJ trees were performed to compare the phylogenetic information. The NJ tree generated with 751 mammal species in the entire *cyt b* (Figure S2), despite showing the species of *Cynomys ludovicianus*, *Oryctolagus cuniculus*, and *Camelus bactrianus* within their corresponding Orders, shows *Ceratotherium simum* located in the Order of Artiodactyla instead of in the Order in which it corresponds, Perissodactyla. The NJ tree of the 358 bp *cyt b* fragment (Figure S3) displays only two species located in different Orders, and individuals from Carnivora appear separated in different branches as well as Rodentia individuals. The NJ tree of the 658 bp *COI* fragment (Figure S4) shows three species located in different Orders, and individuals from Artiodactyla appears separated in different branches.

The intraspecific identity of this fragment was estimated with the ANI as shown in Table 1. In order to obtain these values, the 148 bp fragments of the *cyt b* from all the individuals found at GenBank were downloaded for each of the species analyzed. In the case of *Homo sapiens*, not all sequences were compared due to their elevated number; instead, 1000 randomly chosen sequences from all of those found were taken. In the studied species, the intraspecific identity of the fragment studied was above 97%. Only two species, warthog and Cape porcupine, showed greater intraspecific variability: 4% and 6%, respectively.

## Discussion

Some of the universal primers used most have been those described by Hebert et al., [10] and Parson et al., [1], and have shown to be extremely useful in species identification from biological vestiges. However, the amplified size of 358 bp and 658 bp, respectively, is very large for the analysis of highly degraded samples, so its efficiency may be reduced [20]. In this situation, a smaller amplification is the best choice for a successful and complete sequencing of the desired fragment. Hajibabaei et al., [22] [23], developed mini-barcodes from the *COI* and *cyt b* whose short sequences are adequate for samples with degraded DNA, maintaining an excellent resolution capability at the species level. However, these mini-barcodes only were tested in mammal datasets and experimentally in museum specimens. Another advantage of small amplification sizes is that they permit analysis of amplicons by means of other techniques, such as high resolution melting (HRM) and pyrosequencing, which are highly useful techniques for species identification as shown by Naue et al., [30] and Shokralla et al., [31].





**Figure 2.** NJ tree of the species analyzed according to the 148 bp *cyt b* fragment. Species with one asterisk (\*) represent miniature species. Species with two asterisks (\*\*) represent the breeds of Watusi in *Bos taurus* and Pot-bellied in *Sus scrofa domesticus*. Species with three asterisks (\*\*\*) represent species located outside their corresponding Order.

Accordingly, the aim of the present study was to design a pair of universal primers capable of reducing the amplification size to below 200 bp in the *cyt b* gene, without diminishing the identifying capability between species, with a widely application in taxonomic and forensic research [1] [9]. Specifically, a pair of primers was designed that generate a short amplicon of 148 bp that was able to successfully identify the 100% of the analyzed species, 63 animal species belonging to 38 Families from 14 Orders and 5 Classes, even in highly degraded samples from feces.

The universal primers used in DNA barcodes, like those described by Hebert et al., [10] that produce amplicons of 658 bp, are capable of discriminating between more than 97% of mammalian species [23], birds [32], and fish [33]. Shorter amplicons, like that presented in this study, may display some limitations in the power of discrimination between species. However, such limitations are reduced, as it is shown in the comparison of four phylogenetic NJ trees obtained from: the 148 bp *cyt b* fragment of the present study (Figure 1), the 358 bp *cyt b* fragment described by Parson et al., [1] (Figure S3), the 658 bp *COI* fragment described by Hebert et al., [10] (Figure S4), and the complete *cyt b* sequence (Figure S2). The analysis of the 148 bp *cyt b* fragment of the present study allowed the correct assignment of all the species in their corresponding Orders, except for four mammal species. The NJ tree of the 358 bp fragment shows two species in a different Order to which they belong; in addition, two Orders were bifurcated in different branches. In comparison, the NJ tree of the 658 bp fragment displays three species in a different Order, and one Order, Artiodactyla, is also divided in two branches. The capability of assignment of species of the complete *cyt b* gene is also limited. In the NJ tree generated with 751 mammal species, despite showing the species of *Cynomys ludovicianus*, *Oryctolagus cuniculus*, and *Camelus bactrianus* within their corresponding Orders, shows *Ceratotherium simum* located in the Order of Artiodactyla instead of in the Order in which it corresponds, Perissodactyla, just the same as occurs in the phylogenetic tree completed in the present study. In view of the above, it appears that the small size of *cyt b* gene fragment analyzed does not involve a loss in the ability to assign species correctly.

The intraspecific identity of the fragment studied in our species was positioned above 97% except warthog and porcupine, which showed greater intraspecific variability: 4% and 6%, respectively. These results of high variability obtained from a very small number of individuals (Table 1) would have to be confirmed by means of a study employing a larger number of samples from well-defined geographical areas. Upon performing BLAST analysis of the analyzed *cyt b* fragment, it was observed that individuals from some phylogenetically close species were found within the range of intraspecific variability of the species analyzed. In this manner, some coincidences were observed between domestic species or between domestic and wild species of the same genus, like is the case of *Bos taurus* with *Bos indicus*; *Ovis aries* with *Ovis orientalis* and *Ovis musimon*; *Gallus gallus domesticus* with *Gallus sonneratii*; *Capra hircus* with *Capra aegragus*, *Capra falconeri*, *Capra caucasica*, and *Capra cylindricornis*; *Sus scrofa domestica* with *Sus scrofa*; and *Canis lupus familiaris*

with *Canis lupus*. However, the sample's geographic location could contribute to species identification when there is a lack of similar species within the same area. It was also observed that *Equus ferus caballus* and *Bos taurus* share sequences with their respective primitive extinct species, *Equus ferus przewalskii* and *Bos primigenius*. For *Bos taurus*, 4 sequences equal to those of its ancestor were found, while for *Equus ferus caballus*, 10 primitive sequences were found with an intraspecific identity superior to 99% with the sequence obtained in this work. These results are consistent with the high conservation of these fragments of the *cyt b* throughout the history of these domesticated species, as noted by Edwards et al., [34] and Goto et al., [35].

## Conclusion

The original design of the universal primers L15601 and H15748 aimed to achieve the amplification of a short fragment of 148 bp of the *cyt b* of the largest quantity possible of mammalian species for their subsequent identification. This objective was empirically proven by analyzing 41 species from this Class. Additionally, these primers have shown that their effectiveness encompasses numerous species belonging to other animal Classes. We have confirmed their identification capability in 22 species belonging to 4 Classes that comprise 8 Orders and 19 different Families not included among mammals. Therefore, the results obtained with this large number of species tested demonstrate the universal nature of primers L15601 and H15748 for species identification. Furthermore, the amplified fragment's short length favors the use of this pair of primers, even in samples with highly degraded DNA, as it is usual in forensic practice.

## Acknowledgements

A. Lopez-Oceja and D. Gamarra thank the Department of Economic Development and Competitiveness of the Government of the Basque Country for their predoctoral fellowships and the IT-833-13 Consolidated Group and UFI11/32 UPV/EHU. The authors are grateful to Dr. Maite Alvarez, PhD, for her technical and human support provided by the DNA Bank Service (SGiker) of the University of the Basque Country (UPV/EHU).

## Bibliography

- [1] Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. & Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 114(1-2), 23-28. doi: 10.1007/s004140000134
- [2] GilArriortua, M., Bordas, M. I. S., Cainé, L. M., Pinheiro, F., & de Pancorbo, M. M. (2013). Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic science international*, 228(1), 132-136.
- [3] Amendt, J., Krettek, R., & Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91(2), 51-65.
- [4] Tobe, S. S., & Linacre, A. (2010). DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. *Forensic science, medicine, and pathology*, 6(3), 195-206.
- [5] Linacre, A., & Tobe, S. S. (2011). An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative genetics*, 2(1), 1.
- [6] Primrose, S., Woolfe, M., & Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 582-590.
- [7] Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review. *Food Analytical Methods*, 7(10), 1933-1949.
- [8] Pääbo, S., Gifford, J. A., & Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic acids research*, 16(20), 9775-9787.
- [9] Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., Lai, S. Y., Huang, N. E., Linacre, A. & Lee, J. C. I. (2001). Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International*, 122(1), 7-18. doi: 10.1016/S0379-0738(01)00403-0
- [10] Hebert, P. D., Cywinska, A. & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- [11] Melton, T., Holland, C. (2007). Routine forensic use of the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene for species identification. *J Forensic Sci* 52: 1305–7.

- [12] Guha, S., & Kashyap, V. K. (2005). Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16s rRNA gene for identification of seven pecora species. *BMC genetics*, 6(1), 1.
- [13] Tobe, S. S., Kitchener, A. C. & Linacre, A. M. (2010). Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS One*, 5(11), e14156. doi: 10.1371/journal.pone.0014156
- [14] Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M., & de Mazancourt, P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic science international*, 99(3), 165-170.
- [15] Naidu, A., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., & Culver, M. (2012). Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Molecular ecology resources*, 12(2), 191-196.
- [16] Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811. doi: 10.1098/rstb.2005.1730
- [17] Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
- [18] Arif, I. A., Khan, H. A., Al Sadoon, M., & Shobrak, M. (2011). Limited efficiency of universal mini-barcode primers for DNA amplification from desert reptiles, birds and mammals. *Genet Mol Res*, 10(4), 3559-3564.
- [19] Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3(1), 11.
- [20] Wandeler, P., Hoeck, P. E. & Keller, L. F. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(12), 634-642. doi: 10.1016/j.tree.2007.08.017
- [21] Xie, J., Zhu, W., Zhou, Y., Liu, Z., Chen, Y., & Zhao, Z. (2015). Identification of mammalian species using the short and highly variable regions of mitochondrial DNA. *Mitochondrial DNA*, 26(4), 550-554.

- [22] Hajibabaei, M., Smith, M., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B. & Hebert, P. D. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959-964. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x
- [23] Hajibabaei, M., Singer, G. A., Clare, E. L. & Hebert, P. D. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC biology*, 5(1), 24. doi: 10.1186/1741-7007-5-24
- [24] Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
- [25] Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147-147. doi: 10.1038/13779
- [26] Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15), 2471-2472. doi: 10.1093/bioinformatics/bth254
- [27] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- [28] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- [29] FigTree software. Available via <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- [30] Naue, J., Hansmann, T. & Schmidt, U. (2014). High-Resolution Melting of 12S rRNA and Cytochrome b DNA Sequences for Discrimination of Species within Distinct European Animal Families. *PLoS One*, 9(12), e115575. doi: 10.1371/journal.pone.0115575
- [31] Shokralla, S., Zhou, X., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Landry, J. F., Jacobus, L. M. & Hajibabaei, M. (2011). Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, 6(7), e21252. doi: 10.1371/journal.pone.0021252
- [32] Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2, 1657-1663. doi: 10.1371/journal.pbio.0020312
- [33] Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. doi: 10.1098/rstb.2005.1716

[34] Edwards, C. J., Magee, D. A., Park, S. D., McGettigan, P. A., Lohan, A. J., Murphy, A. et al. (2010). A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS One*, 5(2), e9255. doi: 10.1371/journal.pone.0009255

[35] Goto, H., Ryder, O. A., Fisher, A. R., Schultz, B., Pond, S. L. K., Nekrutenko, A. & Makova, K. D. (2011). A massively parallel sequencing approach uncovers ancient origins and high genetic variability of endangered Przewalski's horses. *Genome Biology and Evolution*, 3, 1096-1106. doi: 10.1093/gbe/evr067

Forensic Science International: Genetics. Doi: 10.1016/j.fsigen.2016.05.001

## New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysis

Lopez-Oceja A.<sup>1</sup>, Gamarra D.<sup>1</sup>, Borrigan S.<sup>2</sup>, Jiménez-Moreno S.<sup>3</sup>, de Pancorbo M.M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>BIOMICS Research Group, University of the Basque Country, UPV/EHU. 01006, Vitoria-Gasteiz, Spain.

<sup>2</sup>Parque de la Naturaleza de Cabárceno. 39693, Obregón (Cantabria), Spain.

<sup>3</sup>Area of Forensic and Legal Medicine, Pathology and Surgery Dept., Miguel Hernández University of Elche. 03550, Elche (Alicante), Spain.

Corresponding author: Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; Email: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Supplementary material

**Table S1.** List of the 751 mammal species with the corresponding GenBank accession number for the complete mtDNA reference sequence used for primer desing.

Scientific name	Accecion number	Scientific name	Accecion number
Acinonyx jubatus	gi 38349475:15061-16200	Aotus nancymaae	gi 394831062:14143-15282
Acomys cahirinus	gi 470235646:14102-15242	Apodemus agrarius	gi 359422094:14127-15270
Addax nasomaculatus	gi 470231667:14152-15291	Apodemus chejuensis	gi 372290831:14127-15270
Aepyceros melampus	gi 470231714:14151-15293	Apodemus chevrieri	gi 383931127:14124-15267
Ailuropoda melanoleuca	gi 148298631:15529-16668	Apodemus draco	gi 426405861:14133-15276
Ailurus fulgens	gi 195934696:14171-15310	Apodemus latronum	gi 426405875:14136-15279
Ailurus fulgens styani	gi 153127838:14173-15312	Apodemus peninsulae	gi 351000111:14124-15267
Akodon montensis	gi 726972119:14125-15264	Arctocephalus forsteri	gi 21449916:14185-15324
Alcelaphus buselaphus	gi 470231757:14148-15287	Arctocephalus pusillus	gi 115494705:14183-15322
Alces alces	gi 470231815:14156-15295	Arctocephalus townsendi	gi 115494817:14188-15327
Allenopithecus nigroviridis	gi 608788068:14170-15310	Arctodus simus	gi 195661255:15026-16165
Allocricetulus eversmanni	gi 821317868:14137-15279	Arctonyx collaris	gi 470230205:14175-15314
Alouatta caraya	gi 529217124:14131-15270	Artibeus jamaicensis	gi 5835666:14150-15289
Ammotragus lervia	gi 148543101:14154-15293	Artibeus lituratus	gi 375267177:14163-15302
Anomalurus sp.	gi 126215501:14202-15341	Ateles belzebuth	gi 429221962:14138-15277
Anoura caudifer	gi 545601058:14167-15306	Avahi laniger	gi 529217152:14182-15321
Anourosorex squamipes	gi 669026548:14200-15339	Axis axis	gi 471193785:14155-15294
Antidorcas marsupialis	gi 475655854:14152-15291	Axis porcinus	gi 470231969:14157-15296
Antilocapra americana	gi 470231907:14157-15296	Balaena mysticetus	gi 38707506:14197-15336
Antilope cervicapra	gi 223976106:14155-15294	Balaenoptera acutorostrata	gi 38707492:14204-15343
Aotus azarai	gi 529217138:14147-15286	Balaenoptera bonaerensis	gi 62184354:14204-15343
Aotus azarai azarai	gi 394831045:14149-15288	Balaenoptera borealis	gi 62184312:14199-15338
Aotus lemurinus	gi 429221948:14143-15282	Balaenoptera brydei	gi 62184480:14198-15337



Balaenoptera edeni	gi 91176188:14196-15335	Capricornis milneedwardsii	gi 584593643:14152-15291
Balaenoptera musculus	gi 5834995:14610-15749	Capricornis sumatraensis	gi 470229102:14149-15288
Balaenoptera omurai	gi 91176262:14192-15331	Capricornis swinhoei	gi 187250409:14152-15291
Balaenoptera physalus	gi 5819095:14613-15752	Carollia perspicillata	gi 545601087:14162-15301
Beatragus hunteri	gi 589144691:14147-15286	Catopuma temminckii	gi 821318749:15075-16214
Berardius bairdii	gi 38707598:14190-15329	Cavia porcellus	gi 5835988:14164-15303
Bison bison	gi 225622211:14514-15653	Cebus albifrons	gi 14010679:14172-15308
Bison bonasus	gi 295065495:14513-15652	Cebus apella	gi 372290886:14165-15301
Bison priscus	gi 836614020:14513-15652	Cebus xanthosternos	gi 529217446:14170-15306
Blarinella quadraticauda	gi 608787900:14181-15320	Cephalophus adersi	gi 471193803:14151-15290
Blastocercus dichotomus	gi 470232025:14152-15291	Cephalophus callipygus	gi 470232164:14149-15288
Bos gaurus	gi 685496591:14149-15288	Cephalophus dorsalis	gi 470232239:14155-15294
Bos grunniens	gi 147744490:15046-16185	Cephalophus jentinki	gi 470232312:14149-15288
Bos indicus	gi 50234066:14517-15656	Cephalophus leucogaster	gi 470232394:14151-15290
Bos javanicus	gi 237869042:14515-15654	Cephalophus natalensis	gi 470232478:14151-15290
Bos mutus	gi 722490016:14515-15654	Cephalophus nigrifrons	gi 470232574:14151-15290
Bos primigenius	gi 292486447:14514-15653	Cephalophus ogilbyi	gi 470232662:14149-15288
Bos taurus	gi 60101824:14514-15653	Cephalophus rufilatus	gi 470232761:14151-15290
Boselaphus tragocamelus	gi 470228245:14158-15297	Cephalophus silvicultor	gi 470232909:14150-15289
Brachyphylla cavernarum	gi 545601073:14166-15305	Cephalophus spadix	gi 470233082:14151-15290
Bradypus variegatus	gi 62184298:14191-15330	Cephalorhynchus heavisidii	gi 470233273:14197-15336
Bubalus bubalis	gi 52220982:14530-15669	Ceratotherium simum	gi 5835401:14176-15315
Bubalus depressicornis	gi 470228310:14153-15292	Cercocebus chrysogaster	gi 529217194:14191-15331
Budorcas taxicolor	gi 255506396:14155-15294	Cercocebus torquatus	gi 608788054:14197-15337
Cacajao calvus	gi 529217530:14144-15280	Cercopithecus albogularis	gi 529217208:14193-15333
Caenolestes fuliginosus	gi 45685994:14154-15299	Cercopithecus diana	gi 608788040:14158-15298
Callicebus cupreus	gi 529217502:14139-15278	Cercopithecus lhoesti	gi 608788026:14167-15307
Callicebus donacophilus	gi 429221976:14147-15286	Cercopithecus mitis	gi 608788012:14170-15310
Callicebus lugens	gi 671729088:14154-15293	Cervus elaphus songaricus	gi 312233465:14146-15285
Callimico goeldii	gi 671729060:14142-15281	Cervus elaphus	gi 294494684:14162-15301
Callithrix geoffroyi	gi 529217166:14139-15278	Cervus elaphus yarkandensis	gi 288903528:14156-15295
Callithrix jacchus	gi 722490416:14141-15280	Cervus elaphus xanthopygus	gi 288903478:14143-15282
Callithrix kuhlii	gi 906476668:14141-15280	Cervus nippon kopschi	gi 357017882:14160-15299
Callithrix pygmaea	gi 529217180:14142-15281	Cervus nippon sichuanicus	gi 404333625:14161-15300
Callorhinus ursinus	gi 294514819:14181-15320	Cervus nippon hortulorum	gi 288903450:14162-15301
Callosciurus erythraeus	gi 722489805:14188-15327	Cervus nippon yakushimae	gi 68989228:14165-15304
Camelus bactrianus	gi 157011955:14161-15300	Cervus nippon centralis	gi 63025126:14155-15294
Camelus dromedarius	gi 157690784:14156-15295	Cervus nippon yesoensis	gi 62736193:14157-15296
Camelus ferus	gi 157011972:14160-15299	Cervus nippon taiouanus	gi 116014296:14163-15302
Canis latrans	gi 108561416:14185-15324	Chalinolobus tuberculatus	gi 11610804:14152-15291
Canis lupus laniger	gi 224178783:14186-15325	Cheirogaleus medius	gi 529217222:14270-15410
Canis lupus chanco	gi 171259238:14184-15323	Chinchilla lanigera	gi 511347823:14163-15302
Canis lupus lupus	gi 153128005:14184-15323	Chiropotes albinasus	gi 529217236:14149-15285
Canis lupus	gi 108561299:14186-15325	Chiropotes israelita	gi 671729074:14132-15268
Canis lupus familiaris	gi 17737322:14183-15322	Chlorocebus aethiops	gi 66276030:14165-15305
Caperea marginata	gi 38707520:14191-15330	Chlorocebus cynosuros	gi 688074869:14157-15297
Capra caucasica	gi 475655868:14151-15290	Chlorocebus pygerythrus	gi 156471191:14164-15304
Capra falconeri	gi 470228648:14151-15290	Chlorocebus sabaesus	gi 107736076:14732-15872
Capra hircus	gi 316926505:14153-15292	Chlorocebus tantalus	gi 156471205:14162-15302
Capra ibex	gi 470228693:14150-15288	Choloepus didactylus	gi 62184340:14181-15320
Capra nubiana	gi 470228771:14153-15292	Chrysochloris asiatica	gi 32402539:14146-15285
Capra pyrenaica	gi 470228814:14148-15287	Chrysocyon brachyurus	gi 642276518:14188-15327
Capra sibirica	gi 470228871:14153-15295	Coelodonta antiquitatis	gi 229925753:14177-15316
Capreolus capreolus	gi 470232093:14151-15290	Coendou insidiosus	gi 511657448:14190-15329
Capreolus pygargus	gi 699049576:14150-15289	Colobus guereza	gi 62161140:14203-15343
Capricornis crispus	gi 223976092:14153-15292	Connochaetes gnou	gi 470233679:14148-15287

<i>Connochaetes taurinus</i>	gi 470233881:14148-15287	<i>Eozapus setchuanus</i>	gi 902686283:14137-15276
<i>Cricetulus griseus</i>	gi 91176202:14123-15265	<i>Episoriculus caudatus</i>	gi 746000391:14197-15336
<i>Cricetulus kamensis</i>	gi 669032023:14121-15264	<i>Episoriculus fumidus</i>	gi 15079203:14209-15348
<i>Cricetulus longicaudatus</i>	gi 699257010:14142-15284	<i>Eptesicus serotinus</i>	gi 546143917:14164-15303
<i>Crocidura attenuata</i>	gi 749111901:14180-15319	<i>Equus asinus</i>	gi 5835345:14185-15324
<i>Crocidura beatus</i>	gi 836643230:14179-15318	<i>Equus burchellii</i>	gi 408772348:14180-15319
<i>Crocidura grayi</i>	gi 836643202:14181-15320	<i>Equus caballus</i>	gi 5835107:14188-15327
<i>Crocidura mindorus</i>	gi 836643216:14181-15320	<i>Equus grevyi</i>	gi 761520096:14178-15317
<i>Crocidura negrina</i>	gi 836643174:14178-15317	<i>Equus hemionus kulan</i>	gi 408772362:14182-15321
<i>Crocidura ninoyi</i>	gi 836614115:14178-15317	<i>Equus hemionus</i>	gi 351000125:14183-15322
<i>Crocidura orientalis</i>	gi 836643146:14175-15314	<i>Equus kiang</i>	gi 456351521:14181-15320
<i>Crocidura palawanensis</i>	gi 836643160:14181-15320	<i>Equus ovodovi</i>	gi 408772376:14186-15325
<i>Crocidura panayensis</i>	gi 836643188:14179-15318	<i>Equus przewalskii</i>	gi 615072396:14184-15323
<i>Crocidura russula</i>	gi 62161165:14172-15301	<i>Equus zebra hartmannae</i>	gi 408772334:14182-15321
<i>Crocidura shantungensis</i>	gi 511347977:14178-15317	<i>Equus zebra</i>	gi 459642525:14180-15319
<i>Crocota crocota</i>	gi 470231499:14975-16114	<i>Eremitalpa granti</i>	gi 166851946:14133-15272
<i>Ctenomys leucodon</i>	gi 470231373:14197-15336	<i>Erignathus barbatus</i>	gi 115494775:14166-15305
<i>Ctenomys sociabilis</i>	gi 470231359:14195-15334	<i>Erinaceus europaeus</i>	gi 133755332:14182-15321
<i>Cuon alpinus</i>	gi 262188097:14185-15324	<i>Erythrocebus patas</i>	gi 529217250:14174-15314
<i>Cynomys leucurus</i>	gi 769829460:14161-15300	<i>Eschrichtius robustus</i>	gi 38707478:14201-15340
<i>Cynomys ludovicianus</i>	gi 769829474:14171-15310	<i>Eubalaena australis</i>	gi 621844410:14189-15328
<i>Cynopterus brachyotis</i>	gi 755292109:14190-15329	<i>Eubalaena japonica</i>	gi 62184536:14191-15330
<i>Cystophora cristata</i>	gi 115494761:14162-15301	<i>Euchoreutes naso</i>	gi 885000413:14167-15306
<i>Dactylopsila trivirgata</i>	gi 108793294:14180-15325	<i>Eudorcas rufifrons</i>	gi 470234760:14156-15295
<i>Dama dama</i>	gi 470234101:14158-15297	<i>Eulemur fulvus mayottensis</i>	gi 238866918:14185-15324
<i>Dama mesopotamica</i>	gi 685496605:14157-15296	<i>Eulemur fulvus fulvus</i>	gi 238866890:14185-15324
<i>Damaliscus lunatus</i>	gi 589144733:14151-15290	<i>Eulemur macaco</i>	gi 238866946:14185-15324
<i>Damaliscus pygargus</i>	gi 470228980:14146-15285	<i>Eulemur mongoz</i>	gi 166851890:14194-15333
<i>Dasyypus novemcinctus</i>	gi 5835429:14171-15310	<i>Eulemur rubriventer</i>	gi 745999986:14187-15326
<i>Dasyurus hallucatus</i>	gi 83309015:14213-15358	<i>Eulemur rufus</i>	gi 529217264:14186-15325
<i>Daubentonia madagascariensis</i>	gi 166851876:14173-15312	<i>Eumetopias jubatus</i>	gi 34577124:14184-15323
<i>Delphinus capensis</i>	gi 222839860:14194-15333	<i>Felis catus</i>	gi 5835205:15038-16177
<i>Dendrohyrax dorsalis</i>	gi 166851904:14163-15302	<i>Feresa attenuata</i>	gi 426405917:14200-15339
<i>Desmodus rotundus</i>	gi 545601102:14140-15279	<i>Galago moholi</i>	gi 529217278:14241-15380
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	gi 229931178:14177-15316	<i>Galago senegalensis</i>	gi 238866834:14208-15347
<i>Diceros bicornis</i>	gi 229927523:14180-15319	<i>Galemys pyrenaicus</i>	gi 109156429:14213-15352
<i>Didelphis virginiana</i>	gi 5835037:14177-15325	<i>Galeopterus variegatus</i>	gi 21449889:14151-15290
<i>Dipus sagitta</i>	gi 885000399:14159-15298	<i>Gazella bennettii</i>	gi 470235113:14153-15292
<i>Distoechurus pennatus</i>	gi 108793280:14154-15299	<i>Gazella cuvieri</i>	gi 470235128:14150-15289
<i>Dorcatragus megalotis</i>	gi 470234396:14143-15282	<i>Gazella dorcas</i>	gi 470235142:14150-15289
<i>Dremomys rufigenis</i>	gi 755291913:14182-15321	<i>Gazella erlangeri</i>	gi 470235156:14149-15288
<i>Dromiciops gliroides</i>	gi 45685691:14136-15281	<i>Gazella gazella</i>	gi 470235170:14149-15288
<i>Dugong dugon</i>	gi 17981678:14155-15294	<i>Gazella leptoceros</i>	gi 470235184:14152-15291
<i>Echinops telfairi</i>	gi 34582602:14141-15280	<i>Gazella spekei</i>	gi 470235198:14153-15292
<i>Echinosorex gymnura</i>	gi 14530815:14202-15342	<i>Gazella subgutturosa</i>	gi 470235212:14150-15289
<i>Echymipera rufescens</i>	gi 83309085:14193-15338	<i>Genetta servalina</i>	gi 669026618:14166-15305
<i>Elaphodus cephalophus</i>	gi 120586738:14154-15296	<i>Giraffa camelopardalis</i>	gi 685496619:14154-15293
<i>Elaphurus davidianus</i>	gi 400201717:14155-15294	<i>Giraffa camelopardalis angolensis</i>	gi 223976120:14154-15293
<i>Elephantulus sp.</i>	gi 32402553:14124-15263	<i>Glis glis</i>	gi 5835484:14168-15307
<i>Elephas maximus</i>	gi 107122072:14148-15284	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	gi 734702827:14199-15338
<i>Enhydra lutris</i>	gi 153124122:14175-15314	<i>Globicephala melas</i>	gi 414574164:14199-15338
<i>Eospalax baileyi</i>	gi 393281696:14142-15285	<i>Gorilla gorilla</i>	gi 5835149:14169-15309
<i>Eospalax cansus</i>	gi 482651318:14145-15288	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	gi 195952353:14171-15311
<i>Eospalax rothschildi</i>	gi 403531222:14144-15287	<i>Grampus griseus</i>	gi 223471661:14197-15336
<i>Eothenomys chinensis</i>	gi 270267536:14126-15268	<i>Gulo gulo</i>	gi 153124655:14171-15310
<i>Eothenomys melanogaster</i>	gi 849123622:14121-15263	<i>Halichoerus grypus</i>	gi 5835009:15067-16206

Hapalemur griseus	gi 529217292:14178-15317	Lepus granatensis	gi 620695127:14175-15314
Helarctos malayanus	gi 159524371:15054-16193	Lepus hainanus	gi 733386237:14170-15309
Hemiechinus auritus	gi 32526842:14195-15334	Lepus sinensis	gi 699256814:14178-15317
Hemitragus jayakari	gi 470228582:14157-15296	Lepus timidus	gi 620695099:14175-15314
Hemitragus jemlahicus	gi 470229052:14154-15292	Lepus tolai	gi 726972147:14171-15310
Herpestes javanicus	gi 58578650:14169-15308	Lepus townsendii	gi 620695113:14170-15309
Heterocephalus glaber	gi 322422826:14149-15283	Lipotes vexillifer	gi 83309071:14196-15335
Hexaprotodon liberiensis	gi 470233486:14168-15307	Litocranium walleri	gi 470235282:14153-15292
Hippocamelus antisensis	gi 470235226:14152-15291	Lobodon carcinophaga	gi 115494803:14172-15311
Hippopotamus amphibius	gi 5836030:14172-15311	Lophocebus aterrimus	gi 529217348:14194-15334
Hipposideros armiger	gi 403531403:14161-15300	Lophostoma silvicolium	gi 545601116:14169-15308
Hippotragus equinus	gi 470235240:14153-15292	Loris lydekkerianus	gi 529217362:14206-15345
Hippotragus niger	gi 470235254:14145-15284	Loris tardigradus	gi 238908467:14208-15347
Homo heidelbergensis	gi 568192363:14746-15886	Loxodonta africana	gi 6137801:14147-15283
Homo sapiens	gi 251831106:14747-15887	Loxodonta cyclotis	gi 471193882:14150-15286
Homo sapiens neanderthalensis	gi 196123578:14742-15882	Lutra lutra	gi 209427658:14173-15312
Homo sp. altai	gi 292606408:14749-15889	Lynx lynx	gi 821317840:15056-16195
Hyaena hyaena	gi 470231485:14952-16091	Lynx rufus	gi 304322922:15064-16203
Hydropotes inermes argyropus	gi 391223836:14151-15290	Macaca arctoides	gi 693426964:14204-15344
Hydropotes inermis	gi 219524201:14150-15289	Macaca assamensis	gi 594448981:14719-15859
Hydrurga leptonyx	gi 115494635:14171-15310	Macaca cyclopis	gi 884997387:14739-15879
Hyemoschus aquaticus	gi 475655882:14161-15300	Macaca fascicularis	gi 229772910:14749-15889
Hylobates agilis	gi 295065480:14174-15314	Macaca fuscata	gi 722489592:14741-15881
Hylobates lar	gi 5835820:14167-15307	Macaca leonina	gi 902686847:15225-16365
Hylobates pileatus	gi 295065510:14177-15317	Macaca mulatta	gi 49146236:14741-15881
Hylomys suillus	gi 166851918:14184-15324	Macaca nemestrina	gi 817526666:14739-15876
Hylopetes phayrei	gi 755291927:14170-15309	Macaca nigra	gi 746000265:14205-15345
Hyperoodon ampullatus	gi 38707612:14191-15330	Macaca silenus	gi 694136534:14179-15319
Ictidomys tridecemlineatus	gi 836643793:14162-15301	Macaca sylvanus	gi 14010693:14217-15357
Indri indri	gi 745999944:14666-15805	Macaca thibetana	gi 211908556:14718-15858
Inia geoffrensis	gi 38707450:14199-15338	Macaca tonkeana	gi 694136548:14198-15338
Isoodon macrourus	gi 13786588:14165-15310	Macropus giganteus	gi 849123810:14181-15326
Jaculus jaculus	gi 40805123:14170-15309	Macropus robustus	gi 5835359:14184-15329
Kobus ellipsiprymnus	gi 470235268:14145-15284	Macroselides proboscideus	gi 21449903:14130-15269
Kobus leche	gi 404333736:14146-15285	Macrotis lagotis	gi 56548761:14090-15235
Kogia breviceps	gi 38707548:14191-15330	Madoqua kirkii	gi 470235296:14149-15288
Lagenorhynchus albirostris	gi 38707534:14199-15338	Madoqua saltiana	gi 470235310:14150-15289
Lagorchestes hirsutus	gi 108793336:14171-15316	Mammot americanum	gi 148922586:14154-15289
Lagostrophus fasciatus	gi 115532026:14152-15297	Mammuthus columbi	gi 333236151:14150-15285
Lagothrix lagotricha	gi 529217306:14139-15278	Mammuthus primigenius	gi 124056416:14151-15286
Lama glama	gi 223976134:14161-15300	Mandrillus sphinx	gi 529217376:14187-15327
Lama guanicoe	gi 219524215:14161-15300	Manis javanica	gi 803432048:14142-15276
Lama pacos	gi 9755345:14154-15293	Manis pentadactyla	gi 346506157:14142-15276
Lasiopodomys mandarinus	gi 699256468:14121-15263	Manis temminckii	gi 726972440:14130-15264
Lasiurus borealis	gi 375267205:14181-15320	Manis tetradactyla	gi 21449973:14133-15269
Leggadina lakedownensis	gi 312233395:14122-15265	Manis tricuspis	gi 803432034:14128-15262
Lemur catta	gi 21449875:14176-15315	Marmota himalayana	gi 400201868:14167-15306
Leontopithecus rosalia	gi 529217320:14140-15279	Martes americana	gi 470229937:14173-15312
Leopoldamys edwardsi	gi 722491745:14129-15269	Martes flavigula	gi 224588018:14170-15309
Lepilemur hubbardorum	gi 304322880:14165-15304	Martes foina	gi 470230029:14171-15310
Lepilemur ruficaudatus	gi 529217334:14194-15333	Martes martes	gi 525340932:14172-15311
Leptonychotes weddellii	gi 115494579:14171-15310	Martes melampus	gi 153124365:14171-15310
Lepus americanus	gi 620695141:14171-15310	Martes pennanti	gi 470231443:14165-15304
Lepus capensis	gi 339906915:14170-15309	Martes zibellina	gi 212725592:14170-15309
Lepus coreanus	gi 651424164:14174-15313	Mazama americana	gi 475655896:14153-15292
Lepus europaeus	gi 21492444:14168-15307	Mazama gouazoupira	gi 470235324:14147-15286

Mazama nemorivaga	gi 685496577:14152-15291	Myodes glareolus	gi 669017689:14128-15270
Mazama rufina	gi 470235338:14150-15292	Myodes regulus	gi 359422080:14126-15268
Megaladapis edwardsi	gi 745999846:14193-15332	Myospalax aspalax	gi 813428396:14304-15441
Megaptera novaeangliae	gi 62184326:14206-15345	Myospalax psilurus	gi 745999231:14134-15271
Meles anakuma	gi 153127162:14167-15306	Myotis brandtii	gi 699256772:14176-15315
Meles meles	gi 195934710:14170-15309	Myotis davidii	gi 722490100:14186-15325
Melogale moschata	gi 470230094:14171-15310	Myotis formosus	gi 339906775:14176-15317
Melursus ursinus	gi 159524390:15086-16225	Myotis ikonnikovi	gi 556505859:14183-15322
Mephitis mephitis	gi 470230512:14159-15298	Myotis macrodactylus	gi 556505801:14184-15323
Merionis unguiculatus	gi 570700659:14147-15286	Myrmecobius fasciatus	gi 221145603:14344-15489
Mesocricetus auratus	gi 260150985:14125-15265	Mytastacina tuberculata	gi 62184382:14168-15307
Mesoplodon densirostris	gi 529217628:14194-15333	Naemorhedus baileyi	gi 470235352:14152-15291
Mesoplodon europaeus	gi 511348629:14190-15329	Naemorhedus caudatus	gi 284177699:14142-15281
Mesoplodon ginkgodens	gi 902686693:14188-15327	Naemorhedus goral	gi 511534103:14149-15288
Mesoplodon grayi	gi 598324043:14191-15330	Naemorhedus griseus	gi 475655910:14153-15292
Metachirus nudicaudatus	gi 56548733:14137-15285	Nandinia binotata	gi 669026604:14174-15313
Micronycteris megalotis	gi 545601043:14166-15305	Nanger dama	gi 470235366:14154-15293
Microtus fortis calamorum	gi 326536021:14119-15261	Nanger granti	gi 470235380:14154-15293
Microtus fortis fortis	gi 326535993:14118-15260	Nanger soemmerringii	gi 470235394:14153-15292
Microtus kikuchii	gi 15079217:14116-15258	Nannospalax ehrenbergi	gi 40805109:14151-15290
Microtus levis	gi 107736027:14120-15262	Nannospalax gallii	gi 475662360:14150-15289
Mirounga leonina	gi 115494593:14172-15311	Nannospalax golani	gi 470235632:14143-15282
Mogera wogura	gi 32526814:14206-15345	Nannospalax judaei	gi 476409125:14151-15290
Monachus schauinslandi	gi 115494649:14177-15316	Nasalis larvatus	gi 109689539:14193-15327
Monodelphis domestica	gi 52547305:14185-15333	Nasua nasua	gi 470230425:14184-15323
Monodon monoceros	gi 38707570:14193-15332	Nectogale elegans	gi 575669443:14195-15334
Moschus anhuiensis	gi 435856335:14151-15290	Neodon irene	gi 351000056:14116-15258
Moschus berezovskii	gi 237642055:14153-15292	Neofelis nebulosa	gi 115531609:15066-16205
Moschus chrysogaster	gi 441403357:14153-15292	Neomys fodiens	gi 722489945:14176-15315
Moschus moschiferus	gi 284177727:14149-15288	Neophoca cinerea	gi 115494831:14188-15327
Muntiacus crinifrons	gi 28867217:14156-15295	Neophocaena asiaeorientalis	gi 755291997:14196-15335
Muntiacus muntjak	gi 28301754:14155-15294	Neophocaena phocaenoides	gi 511349008:14196-15335
Muntiacus revéís micrurus	gi 116235401:14157-15296	Neotetracus sinensis	gi 426406324:14191-15331
Muntiacus reevesi	gi 21908045:14156-15295	Neotragus batesi	gi 470235408:14134-15273
Muntiacus vuquangensis	gi 377823027:14162-15303	Neotragus moschatus	gi 475655924:14151-15290
Murina leucogaster	gi 733386856:14166-15305	Neovison vison	gi 470229835:14170-15309
Murina ussuriensis	gi 482651140:14171-15310	Niviventer confucianus	gi 608787998:14117-15257
Mus caroli	gi 699049534:14153-15296	Niviventer excelsior	gi 426406198:14125-15282
Mus cervicolor	gi 699049548:14147-15290	Nomascus gabriellae	gi 408772040:14170-15310
Mus cookii	gi 699049562:14150-15293	Nomascus leucogenys	gi 529217390:14169-15309
Mus fragilicauda	gi 699256524:14143-15286	Nomascus siki	gi 295065580:14169-15309
Mus musculus	gi 34538597:14145-15288	Notoryctes typhlops	gi 56548691:14070-15215
Mus musculus domesticus	gi 62198713:14146-15289	Nyctalus noctula	gi 836643118:14165-15304
Mus musculus molossinus	gi 62184368:14148-15291	Nyctereutes procyonoides	gi 283096345:14194-15333
Mus musculus castaneus	gi 225622215:14146-15289	Nycticebus bengalensis	gi 529217404:14201-15340
Mus musculus musculus	gi 167716836:14148-15291	Nycticebus coucang	gi 14010665:14202-15341
Mus spretus	gi 733386898:14142-15285	Ochotona collaris	gi 15055558:14156-15295
Mus terricolor	gi 187373153:14143-15286	Ochotona curzoniae	gi 193290196:14156-15294
Mustela altaica	gi 525340946:14165-15304	Ochotona princeps	gi 41353095:14153-15290
Mustela erminea	gi 722489651:14472-15611	Octodon degus	gi 470231401:14191-15330
Mustela frenata	gi 470229779:14170-15309	Odobenus rosmarus	gi 34577125:14173-15312
Mustela kathiah	gi 570700013:14163-15302	Odocoileus hemionus	gi 470235422:14154-15293
Mustela nigripes	gi 689357985:14168-15307	Odocoileus virginianus	gi 326536076:9207-10346
Mustela nivalis	gi 470229674:14164-15303	Okapia johnstoni	gi 471193825:14155-15294
Mustela putorius	gi 470229624:14170-15309	Orcaella brevirostris	gi 426405945:14191-15330
Mustela sibirica	gi 470229533:14167-15306	Orcaella heinsohni	gi 426405959:14197-15336

<i>Orcinus orca</i>	gi 605545818:14192-15331	<i>Pipistrellus abramus</i>	gi 42632257:14165-15304
<i>Oreamnos americanus</i>	gi 470229148:14157-15296	<i>Platanista minor</i>	gi 38707626:14191-15330
<i>Oreotragus oreotragus</i>	gi 471193844:14152-15291	<i>Plecotus auritus</i>	gi 331746951:14163-15302
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	gi 5836058:14186-15325	<i>Plecotus rafinesquii</i>	gi 375267191:14150-15289
<i>Orycteropus afer</i>	gi 5835764:14171-15310	<i>Pongo abelii</i>	gi 5835834:14201-15341
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	gi 5835526:14175-15313	<i>Pongo pygmaeus</i>	gi 5835163:14191-15331
<i>Oryx beisa</i>	gi 476409153:14151-15290	<i>Pontoporia blainvillei</i>	gi 38707584:14194-15333
<i>Oryx dammah</i>	gi 359421992:14150-15289	<i>Potamochoerus porcus</i>	gi 470235492:14168-15307
<i>Oryx gazella</i>	gi 359422006:14149-15288	<i>Potorous tridactylus</i>	gi 56548663:14176-15321
<i>Oryx leucoryx</i>	gi 470235436:14150-15289	<i>Presbytis melalophos</i>	gi 109689581:14187-15321
<i>Otolemur crassicaudatus</i>	gi 238866848:14205-15344	<i>Prionailurus bengalensis</i>	gi 357196668:15019-16158
<i>Ourebia ourebi</i>	gi 470235450:14148-15287	<i>Prionodon pardicolor</i>	gi 669026632:14173-15312
<i>Ovibos moschatus</i>	gi 470229219:14151-15290	<i>Procopra gutturosa</i>	gi 470235506:14146-15285
<i>Ovis ammon</i>	gi 470231162:14159-15298	<i>Procopra przewalskii</i>	gi 317097265:14147-15286
<i>Ovis aries</i>	gi 5835554:14159-15298	<i>Procapra capensis</i>	gi 32402525:14170-15309
<i>Ovis canadensis</i>	gi 342240245:14156-15295	<i>Procolobus verus</i>	gi 470457414:14200-15334
<i>Ovis orientalis</i>	gi 745999525:14160-15299	<i>Procyon lotor</i>	gi 131839173:1-1140
<i>Ovis vignei</i>	gi 745999539:14160-15299	<i>Proechimys longicaudatus</i>	gi 470457368:14161-15300
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	gi 470235744:14149-15288	<i>Proedromys liangshanensis</i>	gi 270267420:14117-15259
<i>Palaeopropithecus ingens</i>	gi 745999874:14206-15345	<i>Prolemur simus</i>	gi 529217418:14233-15372
<i>Pan paniscus</i>	gi 5835135:14166-15306	<i>Propithecus coquereli</i>	gi 194277529:14182-15321
<i>Pan troglodytes</i>	gi 5835121:14165-15305	<i>Propithecus diadema</i>	gi 745999790:14186-15325
<i>Panthera leo</i>	gi 391224118:15052-16191	<i>Propithecus edwardsi</i>	gi 745999818:14185-15324
<i>Panthera onca</i>	gi 558603537:15045-16184	<i>Przewalskium albirostris</i>	gi 372291711:14159-15298
<i>Panthera pardus</i>	gi 187250348:15127-16266	<i>Pseudocheirus peregrinus</i>	gi 56548677:14123-15268
<i>Panthera tigris amoyensis</i>	gi 313768475:15113-16252	<i>Pseudois nayaur</i>	gi 470229271:14160-15299
<i>Panthera tigris</i>	gi 187250362:15103-16242	<i>Pseudois schaeferi</i>	gi 372291351:14160-15299
<i>Pantholops hodgsonii</i>	gi 77020040:14153-15292	<i>Pseudomys chapmani</i>	gi 312233409:14113-15256
<i>Papio anubis</i>	gi 459485522:14168-15308	<i>Pseudorca crassidens</i>	gi 426405763:14201-15340
<i>Papio cynocephalus</i>	gi 459485525:14165-15305	<i>Pseudoryx nghetinhensis</i>	gi 470228379:14148-15287
<i>Papio hamadryas</i>	gi 5835638:14172-15312	<i>Pteromys volans</i>	gi 426406155:14168-15307
<i>Papio kindae</i>	gi 459485528:14165-15305	<i>Pteronotus parnellii</i>	gi 575669608:14162-15301
<i>Papio papio</i>	gi 459485530:14168-15308	<i>Pteronotus rubiginosus</i>	gi 545601130:14167-15306
<i>Papio ursinus</i>	gi 459485533:14162-15302	<i>Pteropus alecto</i>	gi 568192518:14172-15311
<i>Pecari tajacu</i>	gi 223976148:14162-15301	<i>Pteropus dasymallus</i>	gi 11386118:14182-15321
<i>Pelea capreolus</i>	gi 470235464:14145-15284	<i>Pteropus scapulatus</i>	gi 11602891:14182-15321
<i>Peponocephala electra</i>	gi 426405931:14197-15336	<i>Pteropus vampyrus</i>	gi 761546307:14178-15317
<i>Perameles gunnii</i>	gi 56548705:14157-15302	<i>Pudu mephistophiles</i>	gi 471193858:14149-15291
<i>Perodicticus potto</i>	gi 238866862:14200-15339	<i>Pudu puda</i>	gi 470235520:14150-15289
<i>Petaurista alborufus</i>	gi 609252970:14173-15312	<i>Puma concolor</i>	gi 364284064:15085-16224
<i>Petaurista hainana</i>	gi 568192296:14170-15309	<i>Pusa caspica</i>	gi 115494845:14163-15302
<i>Petaurus breviceps</i>	gi 108793266:14175-15320	<i>Pusa hispida</i>	gi 115494607:14160-15299
<i>Phacochoerus africanus</i>	gi 124358976:15447-16586	<i>Pusa sibirica</i>	gi 115494621:14163-15302
<i>Phalanger vestitus</i>	gi 108793518:14156-15301	<i>Pygathrix cinerea</i>	gi 391224244:14169-15303
<i>Phascogale tapoatafa</i>	gi 56548775:14201-15346	<i>Pygathrix nemaeus</i>	gi 109689553:14193-15327
<i>Phascolarctos cinereus</i>	gi 108793308:14175-15314	<i>Pygathrix nigripes</i>	gi 391224216:14170-15304
<i>Philantomba maxwellii</i>	gi 475655938:14154-15293	<i>Rangifer tarandus</i>	gi 84488594:14156-15297
<i>Philantomba monticola</i>	gi 470235478:14154-15293	<i>Raphicerus campestris</i>	gi 470235534:14153-15292
<i>Phoca fasciata</i>	gi 115494719:14163-15302	<i>Rattus exulans</i>	gi 225622216:14131-15273
<i>Phoca groenlandica</i>	gi 115494733:14161-15300	<i>Rattus fuscipes</i>	gi 317097217:14131-15273
<i>Phoca largha</i>	gi 115494747:14161-15300	<i>Rattus leucopus</i>	gi 317134248:14137-15279
<i>Phoca vitulina</i>	gi 5834857:15094-16233	<i>Rattus lutreolus</i>	gi 317097093:14137-15279
<i>Phocarcos hookeri</i>	gi 115494691:14184-15323	<i>Rattus niobe</i>	gi 575670448:14136-15278
<i>Phocoena phocoena</i>	gi 38707464:14197-15336	<i>Rattus norvegicus</i>	gi 110189662:14124-15266
<i>Physeter catodon</i>	gi 34582601:14199-15338	<i>Rattus praetor</i>	gi 225697485:14134-15276
<i>Ptilicolobus badius</i>	gi 109689609:14190-15324	<i>Rattus rattus</i>	gi 225622213:14127-15269



<i>Rattus sordidus</i>	gi 317134190:14138-15280	<i>Stenella attenuata</i>	gi 223471633:14195-15334
<i>Rattus tanezumi</i>	gi 215982971:14125-15267	<i>Stenella coeruleoalba</i>	gi 222838742:14195-15334
<i>Rattus tunneyi</i>	gi 317097141:14132-15274	<i>Sturnira tildae</i>	gi 545601159:14161-15300
<i>Rattus villosissimus</i>	gi 317097172:14134-15276	<i>Suncus murinus</i>	gi 669032191:14187-15326
<i>Ratufa bicolor</i>	gi 594448721:14188-15327	<i>Sus barbatus</i>	gi 817530226:15208-16347
<i>Redunca arundinum</i>	gi 476409167:14151-15290	<i>Sus cebifrons</i>	gi 589144623:15202-16341
<i>Redunca fulvorufula</i>	gi 470235548:14144-15283	<i>Sus celebensis</i>	gi 685497081:15209-16348
<i>Rhinoceros sondaicus</i>	gi 229929310:14173-15313	<i>Sus scrofa</i>	gi 5835862:15342-16481
<i>Rhinoceros unicornis</i>	gi 5835331:14178-15317	<i>Sus scrofa taiwanensis</i>	gi 312233363:15209-16348
<i>Rhinolophus ferrumequinum quelpartis</i>	gi 452849248:14166-15305	<i>Sus scrofa domesticus</i>	gi 223976078:14164-15303
<i>Rhinolophus ferrumequinum korai</i>	gi 357018020:14166-15305	<i>Sus verrucosus</i>	gi 589144553:15207-16346
<i>Rhinolophus formosae</i>	gi 207269732:14171-15310	<i>Sylvicapra grimmia</i>	gi 470235618:14158-15297
<i>Rhinolophus luctus</i>	gi 403531373:14169-15308	<i>Symphalangus syndactylus</i>	gi 295065538:14175-15315
<i>Rhinolophus macrotis</i>	gi 755292053:14172-15311	<i>Syncerus caffer</i>	gi 470457202:14151-15290
<i>Rhinolophus monoceros</i>	gi 42717961:14171-15310	<i>Tachyglossus aculeatus</i>	gi 18077882:14178-15317
<i>Rhinolophus pumilus</i>	gi 42632271:14171-15310	<i>Talpa europaea</i>	gi 7212513:14185-15322
<i>Rhinophylla pumilio</i>	gi 545601144:14156-15295	<i>Tamandua tetradactyla</i>	gi 21449946:14148-15287
<i>Rhinopithecus avunculus</i>	gi 331746965:14189-15323	<i>Tamias sibiricus</i>	gi 699256386:14190-15328
<i>Rhinopithecus bieti</i>	gi 331746979:14191-15325	<i>Tamiops swinhoei</i>	gi 813423983:14185-15324
<i>Rhinopithecus brelichi</i>	gi 391224160:14192-15326	<i>Tapirus indicus</i>	gi 598324353:14175-15314
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	gi 109689567:14190-15324	<i>Tarsipes rostratus</i>	gi 56548719:14166-15308
<i>Rhinopithecus strykeri</i>	gi 391224188:14190-15324	<i>Tarsius bancanus</i>	gi 14602225:14169-15308
<i>Rhizomys pruinosus</i>	gi 511768932:14147-15286	<i>Tarsius dentatus</i>	gi 628972710:14164-15303
<i>Rhizomys sinensis</i>	gi 746000307:14146-15285	<i>Tarsius lariang</i>	gi 628972696:14164-15303
<i>Rhyncholestes raphanurus</i>	gi 45685677:14159-15304	<i>Tarsius syrichta</i>	gi 238866974:14190-15329
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	gi 74310519:14185-15324	<i>Tarsius wallacei</i>	gi 628972724:14164-15303
<i>Rucervus duvaucelii</i>	gi 470235562:14156-15295	<i>Taurotragus derbianus</i>	gi 470228423:14152-15291
<i>Rucervus eldi</i>	gi 312233437:14157-15296	<i>Taxidea taxus</i>	gi 470230313:14183-15322
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	gi 475662388:14158-15300	<i>Tetracerus quadricornis</i>	gi 475662374:14160-15299
<i>Rupicapra rupicapra</i>	gi 470229345:14155-15297	<i>Theropithecus gelada</i>	gi 429221990:14177-15311
<i>Rusa alfredi</i>	gi 470235576:14163-15302	<i>Thryonomys swinderianus</i>	gi 12667705:14403-15540
<i>Rusa timorensis</i>	gi 470235590:14158-15297	<i>Thylacinus cynocephalus</i>	gi 221145533:15106-16248
<i>Rusa unicolor</i>	gi 211948053:14147-15286	<i>Thylamys elegans</i>	gi 45685705:14233-15381
<i>Saguinus oedipus</i>	gi 529217432:14147-15286	<i>Tonatia saurophila</i>	gi 545601174:14181-15320
<i>Saiga tatarica</i>	gi 470235604:14155-15297	<i>Trachypithecus cristatus</i>	gi 608788152:14190-15330
<i>Saimiri boliviensis</i>	gi 529217516:14131-15270	<i>Trachypithecus francoisi</i>	gi 608788138:14186-15326
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	gi 393281668:14133-15272	<i>Trachypithecus germani</i>	gi 426405805:14187-15321
<i>Saimiri oerstedii</i>	gi 570700027:14133-15272	<i>Trachypithecus hatinhensis</i>	gi 426405791:14187-15321
<i>Saimiri sciureus</i>	gi 238866988:14134-15273	<i>Trachypithecus johnii</i>	gi 426405847:14182-15316
<i>Sarcophilus harrisi</i>	gi 408772446:14775-15920	<i>Trachypithecus obscurus</i>	gi 62161253:14192-15332
<i>Scapanulus oweni</i>	gi 726972538:14194-15333	<i>Trachypithecus pileatus</i>	gi 669017563:14188-15322
<i>Sciurus vulgaris</i>	gi 8573078:14167-15306	<i>Trachypithecus shortridgei</i>	gi 426405819:14191-15325
<i>Semnopithecus entellus</i>	gi 109689595:14181-15315	<i>Trachypithecus vetulus</i>	gi 426405833:14186-15320
<i>Sicista concolor</i>	gi 902686297:14153-15292	<i>Tragelaphus angasii</i>	gi 476409041:14148-15287
<i>Simias concolor</i>	gi 475656008:14193-15327	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	gi 476409055:14157-15296
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	gi 83309029:14227-15372	<i>Tragelaphus imberbis</i>	gi 470228464:14153-15292
<i>Sminthopsis douglasi</i>	gi 56548747:14220-15365	<i>Tragelaphus oryx</i>	gi 476409069:14153-15292
<i>Sorex cylindricauda</i>	gi 699256400:14193-15332	<i>Tragelaphus scriptus</i>	gi 476409083:14154-15293
<i>Sorex tundrensis</i>	gi 699256968:14388-15527	<i>Tragelaphus spekii</i>	gi 470228511:14156-15295
<i>Sorex unguiculatus</i>	gi 42632229:14189-15328	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	gi 476409097:14151-15290
<i>Sousa chinensis</i>	gi 222839817:14197-15336	<i>Tragululus kanchil</i>	gi 476409111:14173-15312
<i>Spalacopus cyanus</i>	gi 470231387:14195-15334	<i>Tremarctos ornatus</i>	gi 159524410:15030-16169
<i>Spalax carmeli</i>	gi 475656022:14150-15289	<i>Trichechus manatus</i>	gi 166851862:14164-15303
<i>Spermophilus dauricus</i>	gi 836643910:14170-15309	<i>Trichosurus vulpecula</i>	gi 15079189:14153-15298
<i>Spilogale putorius</i>	gi 170676081:14169-15308	<i>Trinomys dimidiatus</i>	gi 511347837:14191-15330
		<i>Tscherskia triton</i>	gi 255506340:8815-9957

Tupaia belangeri	gi 9997000:14131-15270	Ursus thibetanus formosanus	gi 138892884:15770-16909
Tursiops aduncus	gi 222839831:14195-15334	Ursus thibetanus mupinensis	gi 120944002:15139-16278
Tursiops australis	gi 557948168:14195-15334	Vampyrum spectrum	gi 545601188:14159-15298
Tursiops truncatus	gi 223471647:14195-15334	Varecia variegata	gi 745999804:14198-15337
Tympanoctomys barrerae	gi 475662416:14203-15342	Varecia variegata variegata	gi 238866960:14199-15338
Uncia uncia	gi 187250378:14921-16060	Vespertilio sinensis	gi 669026492:14163-15302
Urocyon cinereoargenteus	gi 769829698:14191-15330	Vicugna vicugna	gi 270267350:14161-15300
Uropsilus soricipes	gi 570700279:14188-15327	Viverricula indica	gi 699256607:14496-15635
Uropsilus sp.	gi 404333667:14162-15301	Vombatus ursinus	gi 18077896:14176-15321
Urotrichus talpoides	gi 32526828:14203-15342	Vulpes corsac	gi 608787984:14188-15327
Ursus americanus	gi 19343488:15113-16252	Vulpes lagopus	gi 761546164:14186-15325
Ursus arctos	gi 19343502:15306-16445	Vulpes vulpes	gi 115494551:14185-15324
Ursus maritimus	gi 19343516:15301-16440	Vulpes zerda	gi 584593671:14189-15328
Ursus spelaeus	gi 195661114:15049-16188	Wiedomys cerradensis	gi 726972133:14116-15259
Ursus thibetanus thibetanus	gi 195933649:15760-16899	Zaglossus bruijni	gi 54112085:14184-15323
Ursus thibetanus ussuricus	gi 195933635:8823-9957	Zalophus californianus	gi 115494565:14185-15324
Ursus thibetanus	gi 159793497:15065-16204	Ziphius cavirostris	gi 511348643:14195-15334

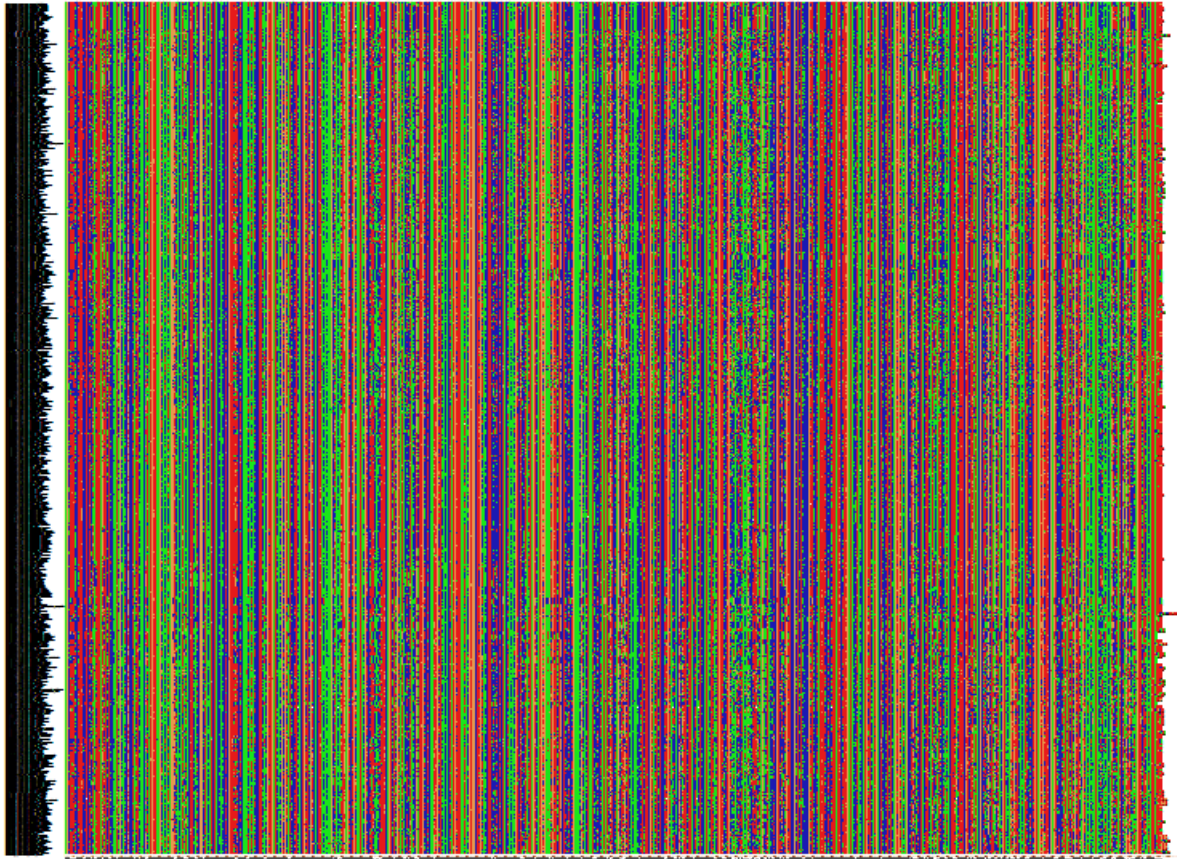
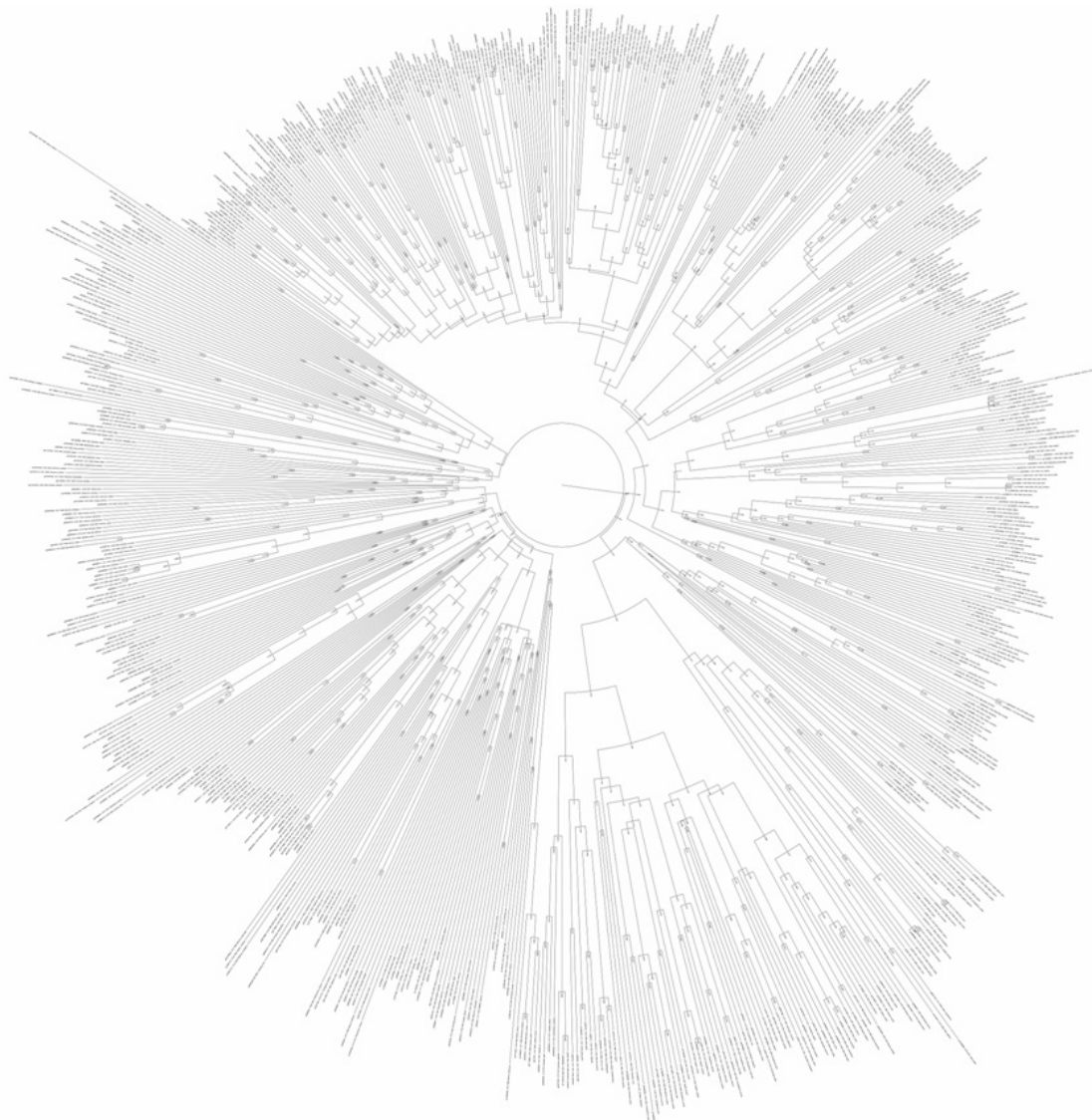


Figure S1. *Cyt b* gene sequences alignment of the 751 mammal species found in GenBank.

\*Enlace al archivo PDF disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497316300709>

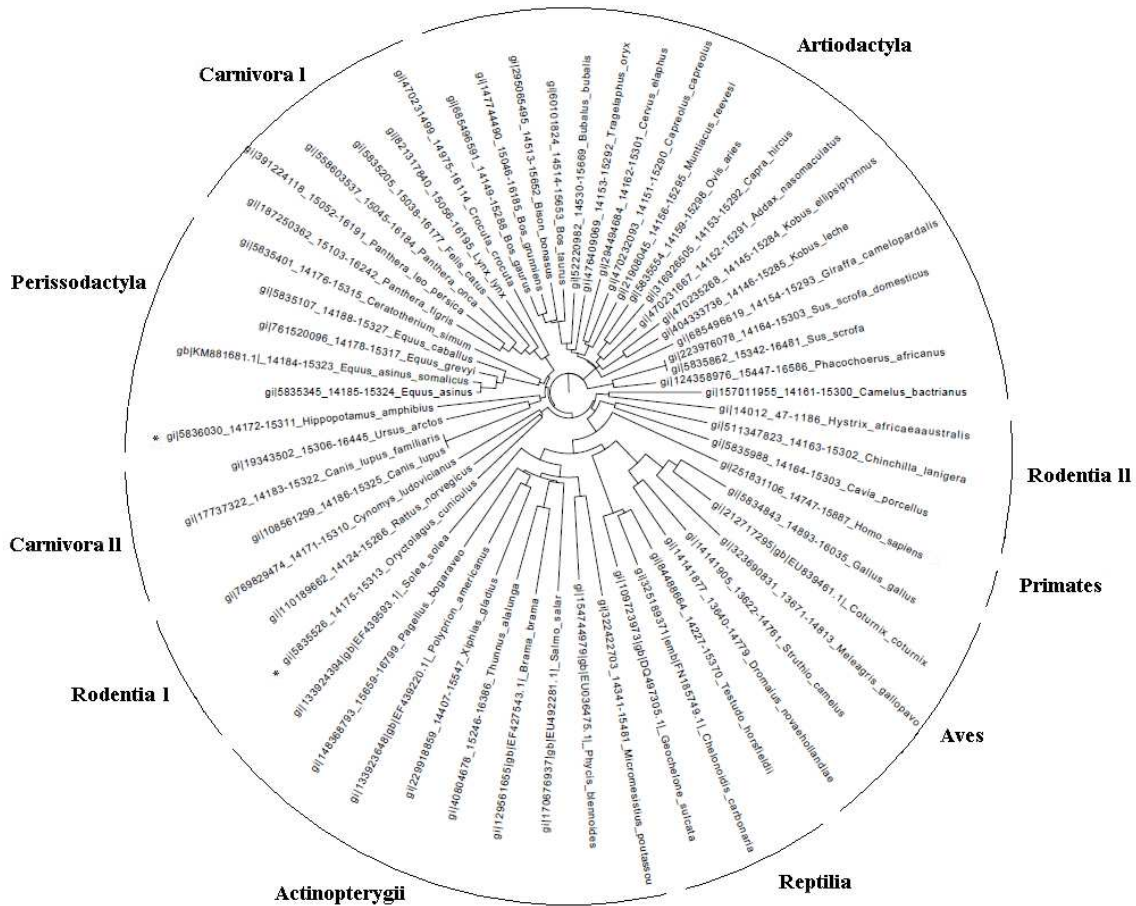


**Figure S2.** Entire *cyt b* gene NJ tree in the 751 species of mammals found in GenBank.

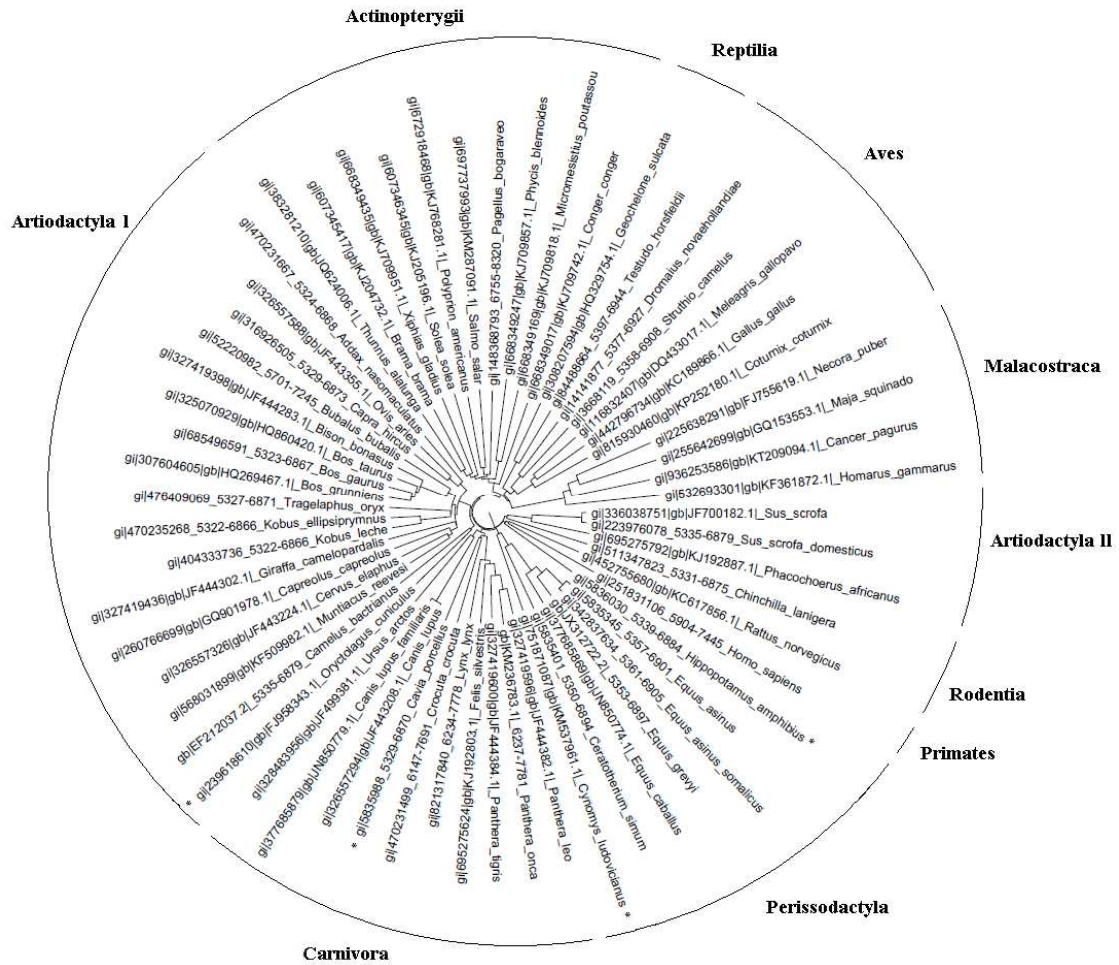
\*Enlace al archivo PDF disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497316300709>





**Figure S3.** NJ tree of the species analyzed according to the 358 bp *cyt b* fragment described by Parson et al. (2000). Species with one asterisk (\*) represent species located outside their corresponding Order. The NJ Tree was performed with 58 species, since no sequences were found in Genbank for this fragment in 5 species analyzed in this study.



**Figure S4.** NJ tree of the species analyzed according to the 658 bp *COI* fragment used in the Barcode of Life Data Systems described by Hebert et al. (2003). Species with one asterisk (\*) represent species located outside their corresponding Order. NJ Tree was performed with 61 species, since no sequences were found in Genbank for this fragment in 2 species analyzed in this study.

### 4.3.2 Estudio 5: “Identification of species in meat food products: a new screening method based on high resolution melting real time PCR of *cyt b* gene.”

Este estudio se centra en el segundo objetivo general de este trabajo mediante la consecución del objetivo específico 6.

La identificación de especies es de gran importancia para evitar fraudes en el campo de la alimentación. Estudios como el realizado por Ayaz et al., (2006), donde el 22.9% de los productos cárnicos cocinados y el 15.9% de las carnes sin procesar contenían especies no declaradas, ponen de manifiesto el gran número de fraudes alimentarios. En este sentido, son necesarias nuevas herramientas moleculares capaces de identificar de una forma rápida, sencilla y barata especies animales en alimentos, incluso cuando han sido procesados.

Técnicas como el análisis de alta resolución de la temperatura de disociación o High resolution melting (HRM) son de gran interés por su aplicabilidad como técnica de *screening*. La función diagnóstica de la rtPCR se ha ampliado mediante el análisis de las curvas de fusión de los productos de PCR usando HRM (Wilhelm et al., 2003). Esta metodología tiene una gran sensibilidad, un coste bajo, y es sencilla y rápida.

El objetivo del presente estudio es la identificación de ocho especies cárnicas, cinco especies de mamíferos (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa domestica*, *Equus caballus* and *Oryctolagus cuniculus*) y tres especies de aves (*Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* and *Coturnix coturnix*) mediante el análisis de HRM con la pareja de cebadores universales cuyo diseño ha sido mostrado en el **Estudio 4**. También se hicieron pruebas de mezclas con diferentes especies y a diferentes concentraciones para ver las diferencias entre especies puras y supuestos casos de contaminación o adulteración con una segunda especie.

En primer lugar se analizaron cada una de las ocho especies por separado para estudiar la capacidad de *screening* y se realizaron tres paneles. Posteriormente, se estudio la sensibilidad

mediante dos paneles con individuos de *Bos taurus* y *Sus scrofa*. Por último se prepararon mezclas de diferentes especies en diferentes proporciones para averiguar la capacidad de discriminación de ambas especies cuando se encuentran en conjunto y la sensibilidad a la hora de determinar cada uno de los componentes de la mezcla.

Todas las especies y mezclas analizadas en el presente estudio pudieron ser identificadas mediante la pareja de cebadores diseñados en el **Estudio 4**. El análisis por rtPCR-HRM representa un método de *screening* fiable, rápido y económico para la identificación de especies en productos cárnicos. Este método no sólo permite la identificación de las especies en las mezclas de carne, si no que también es capaz de proporcionar una aproximación del porcentaje de cada especie de la mezcla.

## Food Chemistry (en revisión)

**Identification of species in meat food products: a new screening method based on high resolution melting real time PCR of *cyt b* gene.****Lopez-Oceja A., Gamarra D., Nuñez C., Baeta M., de Pancorbo M.M. \***

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.

Corresponding author Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; email: marianpancorbo@gmail.com

**Abstract**

Meat adulteration with lower value products or mislabelling involves economic, health, quality and socio-religious issues. Thus, the identification and traceability of meat species have become an important subject to detect such fraudulent practices. This study presents a method for the identification of eight common meat species through the amplification of a 148 bp fragment from the cytochrome b (*cyt b*) gene with a universal primer pair and High Resolution Melting (HRM) analysis. Samples from *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa domestica*, *Equus caballus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* and *Coturnix coturnix* species were analyzed. Melting profiles from each species as well as from several DNA mixtures of these species were analyzed, establishing the melting profiles for each species and species mixtures. The results of this study revealed that the method here proposed is a fast, reliable, and low-cost alternative to conventional sequencing techniques, for species identification in meat products even in processed food and degraded samples.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, Cytochrome b, High resolution melting, Species identification.**Introduction**

Historically, meat products have been the subject of adulteration (Hart, 1952), which due to its high economic value, is still an ongoing problem that encompasses economic, health and socio-religious aspects. Avoiding meat adulteration and its replacement with lower value meat has become a matter of utmost importance for the authorities, who are enforcing the labeling requirements to provide detailed information on food products. In this regard, the European Community ratified the European Directive 2001/101/EC of 26<sup>th</sup> November 2001 (European Commission, 2001) related to the labeling, presentation and advertising of foodstuffs. However, cases such as those described by Ayaz et al., (2006), where 22.9% of cooked meat products and 15.9% of raw meats contained undeclared species, showed the continuous adulteration and the need for additional tools for species identification in meat products.

Species identification of biological samples is a critical aspect in food adulteration (Primrose et al., 2010, Ali et al., 2014). Nowadays, DNA constitutes a useful tool for an accurate and rapid determination of species. The most frequent loci used for species identification in forensic, phylogenetics, and biodiversity studies are mitochondrial cytochrome b (*cyt b*) (Parson et al., 2000, Paavo et al., 1988, Hsieh et al., 2001) and cytochrome c oxidase subunit 1 (*COI*) (Hebert et al., 2003). Moreover, the 12S ribosomal RNA (Melton and Holland, 2007) and 16S ribosomal RNA (Guha and Kashyap, 2005) genes have also been used for molecular analysis in species determination. In mammals the *cyt b* locus provides an accurate reconstruction of the phylogeny at the levels of Superorder, Order, and Family (Tobe et al., 2003).

DNA analysis by PCR has become one of the routinely used methods for identifying species (Bataille et al., 1999), since it enables to amplify regions of specific genes of interest. Conserved regions in genes such as *COI* and *cyt b* enable the use of universal primer sets for species identification purposes. Several universal primer sets that discriminates a high number of species, have been developed in the *cyt b* gene, being typically selected the first 400 bases (Linacre and tobe, 2011). The diagnostic function of real-time PCR (rtPCR) has been extended a few years ago by analyzing the melting curves of PCR products using High Resolution Melting (HRM) (Wilhelm et al., 2003). This methodology has a widely demonstrated

sensitivity (Red et al., 2004) and is a fast, simple, low-cost, and more reliable screening method (Wu et al., 2008) than conventional techniques.

DNA degradation can be a handicap when identifying species. In cooked meat products where standardized procedures, as sterilization applying higher temperatures than 100°C, degrade the DNA, amplicons with sizes less than 200 bp may be the best choice for optimal identification (Unsel et al., 1995). Therefore, Lopez-Oceja et al., (2016) developed a universal pair of primers for a 148 bp fragment of the *cyt b* gene, with an excellent ability to discriminate between species even in degraded samples.

The aim of this study was to develop a screening method for the identification of meat species through the analysis of HRM melting curves of PCR products amplified using an universal primer pair previously described by our group (Lopez-Oceja et al., 2016). Three general panels were established: a) for mammals; b) for birds; and c) for all species analyzed. We have also generated a number of secondary panels, five composed of mixtures of two species with different DNA proportions of each species and two including different DNA concentrations of two specific species.

## Materials and Methods

### Sample collection and DNA extraction

Samples of the eight most common meat species in the Iberian Peninsula were chosen. Blood samples and muscle tissue were collected from 10 individuals of five mammal species (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa domestica*, *Equus caballus* and *Oryctolagus cuniculus*) and eight individuals of three bird species (*Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* and *Coturnix coturnix*) (Table S1), all collected in different butcher's shops. Blood samples were collected into 10 mL EDTA BD Vacutainer tubes (BD Vacutainer, Plymouth, UK), and DNA was extracted by the salting-out method with the Gentra Puregene blood kit (Gentra, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. For muscle tissue samples, 5 mg of each sample was used for DNA extraction following the aforementioned procedure.

The 148bp *cyt b* region was already sequenced in one sample from each species in Lopez-Oceja et al., 2016. Those samples with GenBank accession numbers KT009008 (*Bos taurus*), KT008996 (*Ovis aries*), KT008961 (*Sus scrofa domestica*), KT008954 (*Equus caballus*), KT008969 (*Oryctolagus cuniculus*), KT008975 (*Gallus gallus domesticus*), KT008993 (*Meleagris gallipavo*), and KT008968 (*Coturnix coturnix*) were included in the analysis and used as reference samples for each species.

## RtPCR amplification and HRM analyses

The rtPCR and HRM were conducted using a CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, California, USA). The following reagents were used: 0.75  $\mu\text{M}$  of each *cyt b* universal primer (Lopez-Oceja et al., 2016), 2.5  $\mu\text{L}$  of SsoFast EvaGreen<sup>®</sup> supermix and 1  $\mu\text{L}$  of template DNA (1ng/ $\mu\text{L}$ ). The rtPCR was performed with the following conditions: initial denaturation at 98° C for 2 min; 32 cycles at 98° C for 5 s and 50° C for 30 s. The plate read was taken after an initial step of 95° C 30 s and 60° C 2 min. The melting curve was from 65° C to 95° C with an increment of 0.5° C each after 5 s.

First, the eight species were analyzed individually to verify the uniqueness of the HRM profile of each species and determine if it was possible the species differentiation. Subsequently, dilutions were performed in triplicate at concentrations of 30 ng/ $\mu\text{L}$ , 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 5 ng/ $\mu\text{L}$ , 1 ng/ $\mu\text{L}$ , 0.25 ng/ $\mu\text{L}$  and 0.1 ng/ $\mu\text{L}$  in *B. taurus* and *S. scrofa domestica* samples for possible variations in melting profiles depending on the DNA concentration and, simultaneously, estimate the minimum sensitivity with which the results are still reliable. Finally, several tests for identification of sample mixtures were performed to determine the possibility to discriminate each species in each meat mixture. These mixtures were performed in triplicate with the following species: *E. Caballus* and *B. taurus*, *E. Caballus* and *O. aries*, *E. Caballus* and *S. scrofa domestica*, *S. scrofa domestica* and *B. taurus*, and finally *S. scrofa domestica* and *O. aries*. Each of the mixtures was performed with 100%, 90%, 80%, 50%, 20%, and 10% of DNA proportions for each of the species.



Melting profiles were analyzed with the Bio-rad Precision Melt Analysis Software v1.0 (BioRad, USA). The normalization regions, leading and trailing ranges, were defined independently for both species and each species mixture.

Additionally, a blind test was performed where ten samples were analyzed by HRM using the conditions described above. Five single source samples and five samples of different mixtures with a proportion of 50% of each species were selected.

## Results

### HRM analyses and melting profiles

In the present work, different specific HRM panels for the identification of eight meat species through the amplification with a pair of universal primers for a *cyt b* fragment have been established.

The universal primers have shown appropriate results for all species under the specified amplification conditions. Melting profiles of each single source sample were analyzed together with the reference samples of the same species previously sequenced and analyzed in Lopez-Oceja et al. 2016. First, samples of all individuals were analyzed and three different panels were performed, one with the three species of birds (Figure 1A), a second panel with five species of mammals (Figure 1B) and, finally, a panel with the eight species (Figure 1C). In all three cases, the clear separation into different clusters of each species melting profiles provided a suitable species identification. The melting profiles of the reference samples allowed the assignation of each cluster to each species.

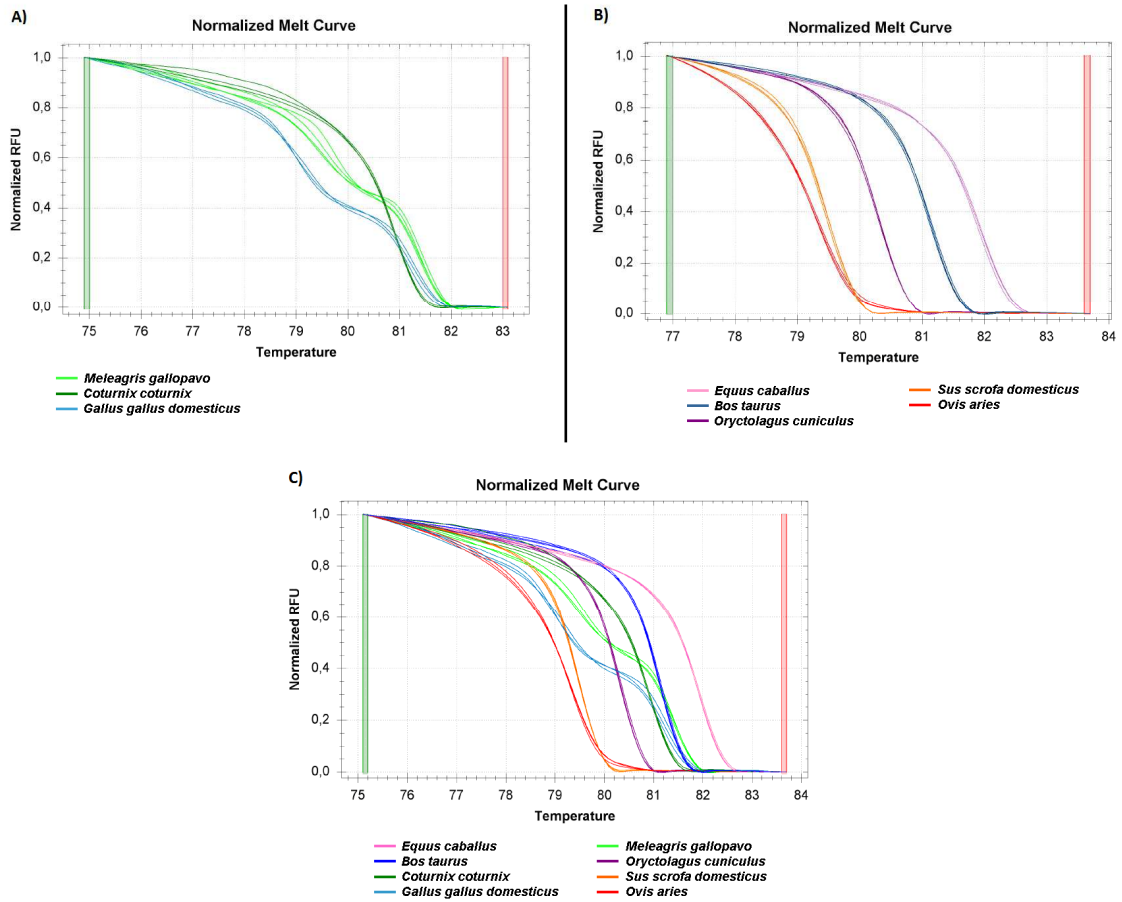
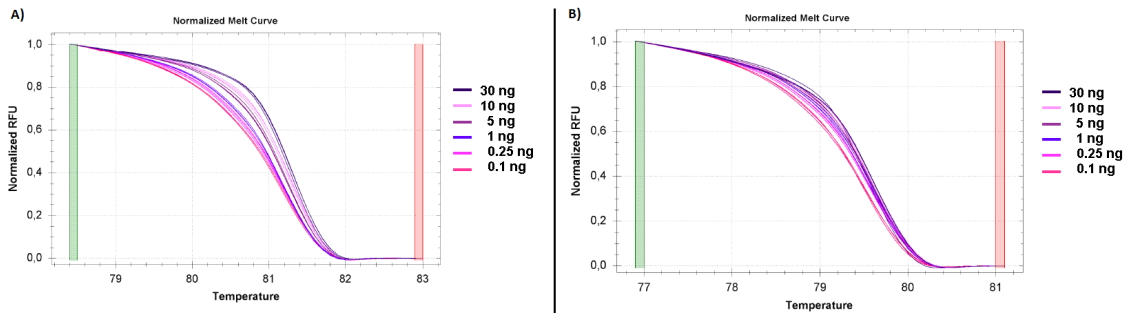


Figure 1. Melting profiles of the eight analyzed species. A) Birds. B) Mammals. C) Birds and mammals.

### Sensitivity analysis

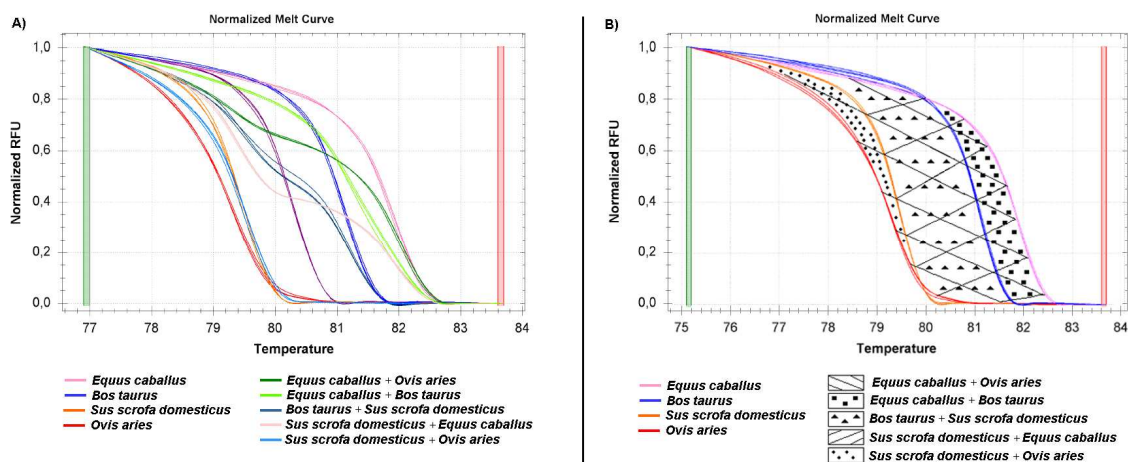
In order to evaluate the minimum sensitivity of the HRM methodology, two additional panels were established at different DNA concentrations for the *Bos taurus* and the *Sus scrofa domesticus* samples. Melting curves were obtained for all tested concentrations (Figure 2). The minimum amount of DNA analyzed (0.1ng) also provided an accurate HRM profile, thus indicating the high sensitivity of the method.



**Figure 2.** Melting profiles at different DNA concentrations: 30 ng/ $\mu\mu\mu\text{L}$ , 10 ng/ $\mu\mu\mu\text{L}$ , 5 ng/ $\mu\mu\mu\text{L}$ , 1 ng/ $\mu\mu\mu\text{L}$ , 0.25 ng/ $\mu\mu\mu\text{L}$  and 0.1 ng/ $\mu\mu\text{L}$ . A) In the species *Bos taurus*; B) In the species *Sus scrofa domestica*.

### Analysis of DNA mixtures

Different DNA mixtures from individuals belonging to the species *Equus caballus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus* and *Ovis aries* were performed. The melting profiles of the following mixtures were analyzed: *Equus caballus* and *Ovis aries*, *Equus caballus* and *Sus scrofa*, *Equus caballus* and *Bos taurus*, *Sus scrofa* and *Bos taurus* and *Sus scrofa* and *Ovis aries*. A clear differentiation of melting profiles of each mixture was observed. Moreover, a joint analysis of melting profiles of the four mammalian species used in mixtures (*Equus caballus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus* and *Ovis aries*) and profiles of the different mixtures (Figure 3A) was performed, showing a clear differentiation of each species and mixtures. The areas between two species profiles indicate the range in which the mixtures profiles are located (Figure 3B).

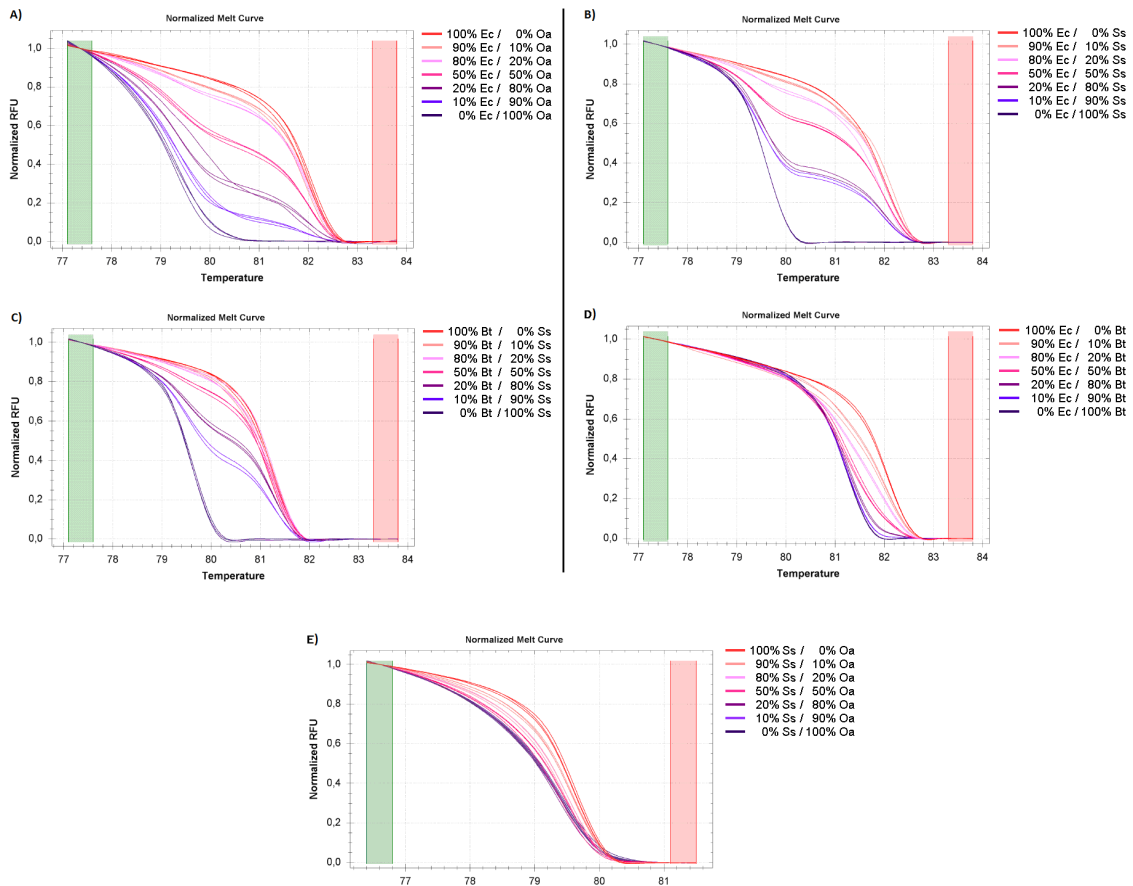


**Figure 3.** Melting profiles of: A) The four mammalian species used in the mixtures tests and the five mixtures analyzed. B) The four species analyzed in the analysis of mixtures. The frames between the melting curves of two species indicate where are placed the samples of a mixture between these two species.

Additionally, to determine the discriminative capacity in mixtures of samples with two species, five mixtures with varying proportions of DNA from each species were analyzed. The melting profiles of mixtures of *Ovis aries* and *Equus caballus*, *Equus caballus* and *Sus scrofa domestica*, *Bos taurus* and *Sus scrofa*, *Equus caballus* and *Bos taurus* and *Sus scrofa* and *Ovis aries* with different DNA proportions of each species are shown in figure 4. The results show a specific melting profile for each mixture, limited by the unique curves of each species. This pattern would allow the identification of the two species present in the mixture, as well as the determination of an approximate DNA percentage of each species, except for the mixture of *Sus scrofa* and *Ovis aries*, where separation of the profiles is not satisfactory enough in cases with low DNA percentages of *Sus scrofa* (Figure S1).

### Blind test

A blind test was performed with ten samples to evaluate the performance of the method in terms of species identification. The analysis was successful in 100% of the cases, obtaining a favorable identification both from single source species samples, and from samples with a DNA mixture of two species.



**Figure 4.** Melting curves of different mixtures that indicate the percentage of each species for each of the mixtures of A) *Equus caballus* and *Ovis aries*, B) *Equus caballus* and *Sus scrofa*, C) *Bos taurus* and *Sus scrofa*, D) *Equus caballus* and *Bos taurus* and E) *Sus scrofa* and *Ovis aries*.

## Discussion

RtPCR methods have been widely used for species identification and food analysis (Druml et al., 2014). Methods such as rtPCR analysis attached to HRM, is presented as a highly reliable and rapid technique (Wu et al., 2008) compared to conventional techniques such as Sanger sequencing.

On the other hand, DNA barcoding is a powerful tool for identifying and confirming species. These barcodes are characterized by showing sufficient variability between species, are short enough to be sequenced in a single reaction, and possess a conserved region for the location of universal primers (Savolainen et al., 2005). Nevertheless, its applicability may be

reduced when samples containing degraded DNA are analyzed (Hajibabaei et al., 2005). In the present study, we have chosen a 148 bp region of the *cyt b* gene, widely used in taxonomic and forensic studies (Parson et al., 2000, Hsieh et al., 2001). The small size of the amplicons (<200bp) is a great advantage in order to achieve optimal species identification when analyzing degraded DNA (Unselde et al., 1995), an aspect of great interest in cooked meat products where sterilization processes at temperatures above 100 C° are common. The pair of primers used has been previously tested with all the analyzed species in this study, and has been experimentally evaluated with samples containing degraded DNA (lopez-Oceja et al., 2016).

All samples of the different species could be identified due to their unequivocal HRM profile. This identification can be done both with the panel that includes only the species of mammals or birds, as well as with the panel representing the eight species analyzed simultaneously.

*Bos taurus* and *Sus scrofa* melting curves panels made with different starting DNA concentrations showed that the amount of DNA is not a limiting factor in the identification of the species. The variation in the profiles produced by different DNA concentrations does not affect the species identification, since all profiles of the same species were situated in a characteristic range for that particular species. The results also demonstrate the high sensitivity of the method, since satisfactory amplification results were obtained even with an amount of 0.1 ng of DNA.

The observed melting curves profiles of the five mixtures panels with different proportions of two species provided an approximation to the DNA percentage of each species in each mixture. Depending on the proportion of each species, the melting profile differs generating a distinctive gradient between the two original species profiles. Melting profiles will approach more to the characteristic profile of a concrete species when the mixture contains a higher proportion of DNA of this species. In the *Sus scrofa* and *Ovis aries* panel, in which the profiles of the two species are very close to each other, the poor separation between the curves may generate some overlap between profiles of different mixture proportions. On the other hand, in species with a greater distance between their profiles, such as *Equus caballus* and *Sus Scrofa*, *Equus caballus* and *Ovis aries*, and *Bos taurus* and *Sus scrofa*, the profiles

corresponding to the different mixing ratios lie more differentiated, enabling a better visualization of each of the mixing proportions.

Meat samples containing species absent in these HRM panels, both in raw meats and in meat mixtures, will show different melting profiles due to their differences in the *cyt b* fragment analyzed. This fact has been noticed in Lopez-Oceja et al., (2015), where differences in melting profiles created with the same pair of universal primers were observed in big game species. Hence, samples with different melting profiles to those determined in this study, would need to be further analyzed in order to reveal the species to which they belong.

Moreover, the proper species identification of all blind test samples, both single species samples and mixture samples, indicates the discriminative potential offered by the proposed methodology.

### **Conclusion**

The high performance of the universal primers for the *cyt b* 148 bp fragment and the analysis by rtPCR-HRM represents a reliable screening method for species identification in meat products, even for processed food. This method not only allows the identification of species in mixtures of meats, but also is able to determine to a certain degree the proportion of each species in the mixture. Hence, the method here proposed has proved to be an efficient, simple and low-cost alternative to conventional sequencing for species identification of meat products.

### **Acknowledgements**

A. Lopez-Oceja and D. Gamarra thank the Department of Economic Development and Competitiveness of the Government of the Basque Country for their predoctoral fellowships and the IT-833-13 Consolidated Group and UFI11/32 UPV/EHU. The authors are grateful to

PhD Maite Alvarez for her technical and human support provided by the DNA Bank Service (SGIker) of the University of the Basque Country (UPV/EHU).

## References

Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review. *Food Analytical Methods*, 7(10), 1933-1949.

Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics*, 23(2), 147-147.

Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods*, 17(2), 214-220.

Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M., & de Mazancourt, P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic science international*, 99(3), 165-170.

Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA—Its role and potential in food analysis. *Food chemistry*, 158, 245-254.

European Commission. 2001. Directive 2001/101/EC of 26 November 2001 amending Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Communities L, 310 (2001), 19–21

Guha, S., & Kashyap, V. K. (2005). Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16s rRNA gene for identification of seven pecora species. *BMC genetics*, 6(1), 1.

Hajibabaei, M., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Mackie, P. M., & Hebert, P. D. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1959-1967.

Hart, F. L. (1952). History of the Adulteration of Food before 1906, A. *Food Drug Cosm. LJ*, 7, 5.



Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., Lai, S. Y., Huang, N. E., Linacre, A., & Lee, J. C. I. (2001). Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International*, 122(1), 7-18.

Linacre, A., & Tobe, S. S. (2011). An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative genetics*, 2(1), 1.

Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Jiménez-Moreno, S., & de Pancorbo, M. M. (2015). Identification of big game species by a universal cytochrome b primer pair through High-Resolution Melting. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e116-e117.

Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Borragan, S., Jimenez-Moreno, S. & de Pancorbo, M.M. (2016). New cyt b gene universal primer set for forensic análisis. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 159-165.

Melton, T., & Holland, C. (2007). Routine forensic use of the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene for species identification. *Journal of forensic sciences*, 52(6), 1305-1307.

Pääbo, S., Gifford, J. A., & Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic acids research*, 16(20), 9775-9787.

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., & Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International journal of legal medicine*, 114(1-2), 23-28.

Primrose, S., Woolfe, M., & Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 582-590.

Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical chemistry*, 50(10), 1748-1754.

Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811.

Tobe, S. S., Kitchener, A. C., & Linacre, A. M. (2010). Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PloS one*, 5(11), e14156.

Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P., & Hiesel, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *Genome Research*, 4(4), 241-243.

Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, 4(11), 1120-1128.

Wu, S. B., Wirthensohn, M. G., Hunt, P., Gibson, J. P., & Sedgley, M. (2008). High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 1-14.

## Food Chemistry (en revisión)

## Identification of species in meat food products: a new screening method based on high resolution melting real time PCR of *cyt b* gene.

Lopez-Oceja A., Gamarra D., Nuñez C., Baeta M., de Pancorbo M.M. \*

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.

Corresponding author Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; email: marianpancorbo@gmail.com

### Supplementary material

**Table S1.** Analyzed species arranged according to their Family. Bl: blood; Ti: muscle tissue; Fe: feces; N: Number of samples.

Family	Scientific name	Common name	Matrix	N
Bovidae	<i>Bos taurus</i>	Cattle	Bl	10
	<i>Ovis aries</i>	Sheep	Bl	10
Suidae	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Domestic pig	Bl	10
Equidae	<i>Equus caballus</i>	Horse	Bl	10
Leporidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	European rabbit	Ti	10
Phasianidae	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Chicken	Ti	8
	<i>Meleagris gallopavo</i>	Wild turkey	Ti	8
	<i>Coturnix coturnix</i>	Common quail	Ti	8

**Table S2.** Melting temperature and level of confidence mean values and standard deviations (SD) of eight meat species. *Gallus gallus domesticus* and *Meleagris gallopavo* had two melting temperatures in each melting profile.

Species	Melting temperature		Level of confidence (%)	
	Mean	SD	Mean	SD
<i>Bos taurus</i>	81,14	0,10	98,95	0,49
<i>Equus caballus</i>	81,80	0,00	98,76	0,62
<i>Ovis aries</i>	79,22	0,07	98,47	0,69
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	80,24	0,08	98,85	0,73
<i>Sus scrofa domestica</i>	79,40	0,00	98,99	0,67
<i>Coturnix coturnix</i>	80,90	0,11	98,32	0,54
<i>Gallus gallus domesticus</i>	79,20	0,19	98,25	1,61
	81,15	0,09		
<i>Meleagris gallopavo</i>	79,37	0,18	98.74	0,93
	81,29	0,11		

### 4.3.3 Estudio 6: “Identification of big game species by a universal cytochrome b primer pair through High-Resolution Melting”

Este estudio se centra en el segundo objetivo general de este trabajo mediante la consecución del objetivo específico 6.

La identificación de especies es de gran importancia para evitar casos de caza furtiva y ataques a la biodiversidad. Es por ello que los niveles de seguimiento y control de la caza furtiva se han incrementado en los últimos años, lo que ha reducido notablemente el número de casos, pero todavía se requieren nuevas herramientas para la identificación genética de especies en casos de rutina forenses.

Técnicas como el análisis de alta resolución de la temperatura de disociación (HRM) son de gran interés por su aplicabilidad como técnica de *screening*, como se ha podido apreciar en el **Estudio 5**, debido a su bajo coste económico, su sencillez y su rapidez.

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de 5 especies de gran interés cinegético en la Península Ibérica como son el ciervo (*Cervus elaphus*), el corzo (*Capreolus capreolus*), el jabalí (*Sus scrofa*), el oso pardo (*Ursus arctos*) y el lobo (*Canis lupus*). Además, se han analizado dos especies domésticas cercanas filogenéticamente al lobo y el jabalí, como son el perro (*Canis lupus familiaris*) y el cerdo (*Sus scrofa domesticus*).

El presente estudio se basa en la utilización conjunta de la pareja de cebadores universales diseñados en el **Estudio 4** junto con la metodología de HRM, de forma similar a la utilizada en el **Estudio 5**. Se ha procedido a realizar un panel con las 7 especies cinegéticas analizadas. Se ha conseguido una clara diferenciación de las siete especies, incluso entre los individuos de especies salvajes y domésticas muy cercanas filogenéticamente, como el jabalí y el cerdo, y el lobo y el perro.

Por lo tanto, se confirma la eficacia de la pareja de cebadores universales diseñada en el estudio junto con la metodología de análisis HRM para la identificación de especies, en este caso de especies cinegéticas de caza mayor.



Forensic Science International: Genetics Supplement Series.

Doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.047

## Identification of big game species by a universal cytochrome b primer pair through High-Resolution Melting

Lopez-Oceja A.<sup>1</sup>, Gamarra D.<sup>1</sup>, Borragan S.<sup>2</sup>, Jiménez-Moreno S.<sup>3</sup>, de Pancorbo M.M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>BIOMICS Research Group, University of the Basque Country, UPV/EHU. 01006, Vitoria-Gasteiz, Spain.

<sup>2</sup>Parque de la Naturaleza de Cabárceno. 39693, Obregón (Cantabria), Spain.

<sup>3</sup>Area of Forensic and Legal Medicine, Pathology and Surgery Dept., Miguel Hernández University of Elche. 03550, Elche (Alicante), Spain.

Corresponding author: Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; Email: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Abstract

Species identification by DNA barcodes has become in recent years a very useful tool in molecular biology. But the degradation level shown in some samples, makes regular barcodes impractical for cases in which DNA is fragmented as it happens commonly in forensic casework. Therefore, the use of mini barcodes with sizes below 200 bp is recommended to achieve optimal amplifications. The present study is focused on the identification of five Iberian Peninsula big game species, Red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), wild boar (*Sus scrofa*), brown bear (*Ursus arctos*) and wolf (*Canis lupus*), using a pair of universal primers that amplify a 148 bp cytochrome b mini barcode. The analysis of amplicons was made using High-Resolution Melting and the results have shown a correct identification of the five big game species analyzed even in degraded samples.

**Keywords:** Cytochrome b, Big game species; High Resolution Melting

### Introduction



Levels of monitoring and control of poaching have been increased during last years, reducing the number of cases [1] but it still requires new tools for genetic identification of species in forensic casework.

DNA of forensic evidences from cinegetic samples is commonly highly degraded [2]. The small size of the fragments of the degraded DNA requires amplicons less than 200 bp for optimum sample amplification [3]. The analysis of reduced amplicons can be carried out by High-Resolution Melting (HRM). This technique has advantages such as low cost and short time, bringing the same level of discrimination of species that analytical methods based on Sanger sequencing.

The cytochrome b (*cyt b*) is a mitochondrial gene that has been widely used in taxonomic and forensic studies [4][5]. The *cyt b* provides an accurate reconstruction of the phylogeny of mammals, in the levels of super-order, order and family [6]. In addition, this locus maintains a high level of phylogenetic discrimination even when short amplicons are used.

The aim of this study was to design a pair of primers able to amplify a highly variable small region of 148 bp from the *cyt b* gene for making a panel able to identify five game species by HRM technique.

### **Materials and methods**

Individuals from a total of seven species belonging to four families of two different orders were analyzed (Table 1). Muscle tissues and stool samples were obtained from several hunting associations and Cabarceno Nature Park (Cantabria, Spain). For the extraction of muscle tissues, 5 mg were taken and DNA was extracted by the salting out method, following the protocol of the Gentra Puregene tissue kit (Qiagen). 200 mg of stool samples were taken for DNA extraction using the Stool QIAmp DNA Mini kit (Qiagen).

**Table 1.** Species analyzed in this study. N indicates the number of individuals analyzed for each species. Ti indicates muscle tissue; Fe indicates feces.

Order	Family	Common name	Scientific name	N	Matrix
<b>Artiodactyla</b>	Cervidae	Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	10	Ti
		Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	10	Ti
	Suidae	Wild boar	<i>Sus scrofa</i>	10	Ti
		Pig	<i>Sus scrofa domesticus</i>	10	Ti
<b>Carnivora</b>	Canidae	Wolf	<i>Canis lupus</i>	3	Fe
		Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	3	Fe
	Ursidae	Brown bear	<i>Ursus arctos</i>	3	Fe

To perform primers design, *cyt b* gene sequences of each of the seven analyzed animal species were obtained from GenBank. The sequences were aligned using the ClustalX software v.2.0.11 [7]. The variable regions flanked by highly preserved sequences were searched manually. After selecting the flanking regions we proceeded to design a pair of primers using the PerlPrimer v.1.1.21 software [8].

Purified DNA templates were amplified in a BioRad CFX-96 real time system (BioRad, USA). The following reagents were used: 0.15  $\mu\text{M}$  of each primer, 2.5  $\mu\text{L}$  of SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> supermix and 5  $\mu\text{L}$  of DNA. The PCR conditions were as follows: Initial denaturation at 98 °C for 2 min; 32 cycles at 98 °C for 5 s and 50 °C for 30 s. The plate read was taken after an initial step of 95 °C 30 s and 60 °C 2 min. The melt curve was from 65 °C to 95 °C with an increment of 0.5 °C each after 5 s. Melting profiles were analyzed with the Bio-rad Precision Melt Analysis Software v1.0 (BioRad, USA).

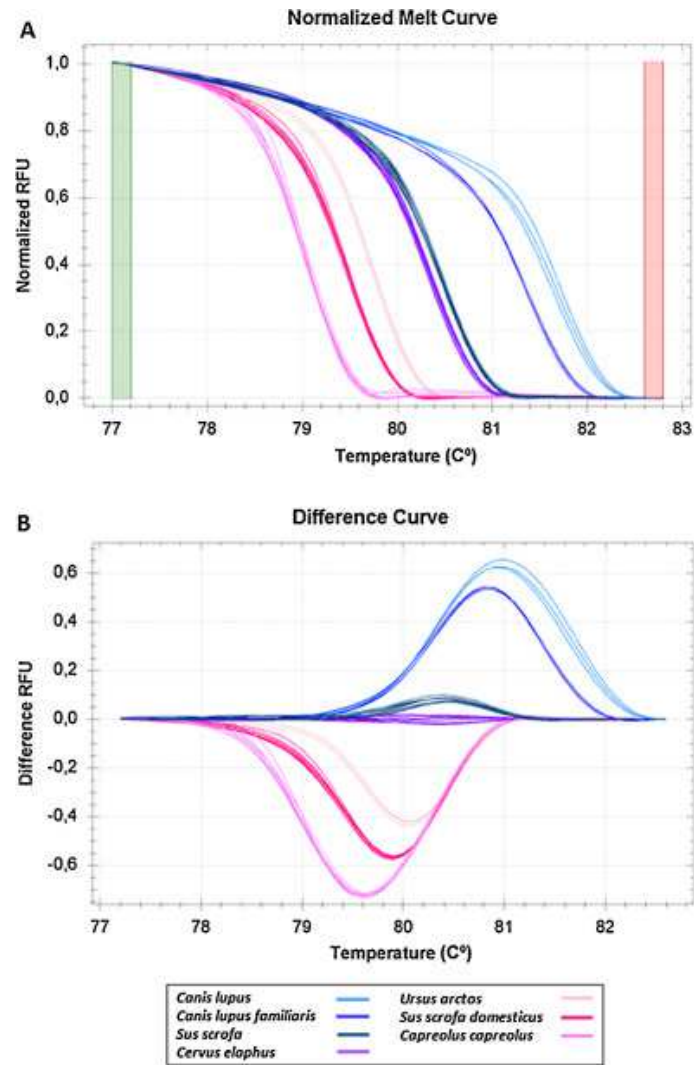
## Results and discussion

The selection of species was performed taking into account sensitive big game species. On the one hand the three species most hunted by number of individuals in the Iberian Peninsula were chosen, red deer, roe deer and wild boar [1]. On the other hand, protected

species because of their small number of individuals were included such as the brown bear and the wolf. Samples of two domestic species, dog and pig, were included to verify that different HRM profiles were obtained in wild and domestic species and verify that it is possible to discriminate correctly these nearby species.

*Cyt b* gene primers designed in this study were able to amplify the seven analyzed species. Both normalized melt curve as the difference curve, showed a clear differentiation of each species obtaining very different HRM profiles for each one (Figure 1). No overlapping HRM-clusters were shown among the different species. While the pig and roe deer clusters are very close to each other, all individuals are within their respective cluster, without any kind of mixture. Therefore has been achieved a clear identification of the seven species here analyzed.

This primer design, for amplify a small region of 148 bp, was specifically designed to be used in degraded samples. This study has proven the usefulness of the primers in stool samples containing degraded DNA to obtain HRM profiles.



**Figure 1.** Genotyping of *cyt b* gene by Precision Melt Analysis Software: (A) normalized HRM melt curves. (B) Difference HRM curves.

## Conclusion

A pair of primers of *cyt b* gene that discriminated by HRM five game species of high economic and ecological value has been obtained. These primers amplify a small region of 148 bp and have been shown equally useful when amplify degraded samples.

## Acknowledgements

A. Lopez-Oceja and D. Gamarra thank the Department of Economic Development and Competitiveness of the Government of the Basque Country for their predoctoral fellowships and the IT-833-13 Consolidated Group and UFI11/32 UPV/EHU for funding. Special thanks to Cabarceno Nature Park (Cantabria, Spain).

### References

- [1] M. Pita, S. Casas, J. Herrero, et al., Game reserves in Spain: the public management of hunting, *For. Syst.* 21 (3) (2012) 398–404.
- [2] J.B. Whitfield, Destructive sampling and information management in molecular systematic research: an entomological perspective.
- [3] P.M. Schneider, K. Bender, W.R. Mayr, et al., STR analysis of artificially degraded DNA—results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci. Int.* 139 (2) (2004) 123–134.
- [4] H.M. Hsieh, H.L. Chiang, L.C. Tsai, et al., Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals, *Forensic Sci. Int.* 122 (1) (2001) 7–18.
- [5] W. Parson, K. Pegoraro, H. Niederstätter, et al., Species identification by means of the cytochrome b gene, *Int. J. Legal Med.* 114 (1–2) (2000) 23–28.
- [6] S.S. Tobe, A.C. Kitchener, A.M. Linacre, Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes, *PLoS One* 5 (11) (2010) e14156.
- [7] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, et al., Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 21 (23) (2007) 2947–2948.
- [8] O.J. Marshall, PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR, *Bioinformatics* (2004).

## 5. Discusión



## 5. Discusión

El presente trabajo de tesis doctoral se ha centrado en el estudio de los linajes matrilineales de razas autóctonas bovinas y ovinas del País Vasco y derivado de ello, las aplicaciones del ADN mitocondrial a la identificación de especies animales. Para ello se han utilizado dos regiones del ADNmt; la región control y el gen *cyt b*. La importancia de la región control radica en que tiene la capacidad de diferenciar entre los diferentes linajes maternos de manera que permite inferir las relaciones filogenéticas entre individuos y razas, así como los hipotéticos ancestros comunes. Por otra parte, el análisis del gen *cyt b* proporciona la información necesaria para la identificación de las especies.

El estudio de los linajes maternos se ha realizado desde la prehistoria hasta la actualidad. Para ello se han estudiado por un lado, individuos prehistóricos bovinos y ovicaprinos hallados en yacimientos del País Vasco, en un periodo comprendido entre 2.000 y 7.000 años de antigüedad. Por otro lado, se analizaron los linajes maternos de una serie de razas ganaderas autóctonas actuales representativas de la región del País Vasco; las razas Terreña y Pirenaica, en el caso de los bóvidos, y las variedades Latxa de cara rubia y Latxa de cara negra, en el caso de los óvidos. Finalmente, se compararon los haplotipos mitocondriales hallados en los individuos prehistóricos con los haplotipos de los individuos actuales para estudiar si existen indicios de una posible continuidad en los acervos genéticos. El estudio de las razas autóctonas y sus antecesores es de gran interés ya que estas razas han demostrado tener una mejor resistencia a enfermedades, gran fertilidad, buenas cualidades maternas, alta longevidad y gran adaptación a situaciones difíciles y a alimentos de baja calidad, características todas ellas altamente deseables para una ganadería sostenible con bajos insumos (Gómez M., 1999).

La identificación de especies mediante el análisis del gen *cyt b* se ha llevado a cabo mediante el diseño de una pareja de cebadores universales para un fragmento del *cyt b*. Los cebadores universales tienen la capacidad de amplificar secuencias de un alto número de especies animales, y por ello, cualquiera que sea la especie que se desea identificar, existe una alta probabilidad de éxito de una correcta identificación. Además, estos cebadores han sido específicamente diseñados para su utilización en muestras degradadas, comunes en la rutina



de laboratorios forenses, ya que sólo requieren un corto fragmento de 148 pb de ADN molde. Por otro lado, el corto tamaño de los amplicones generados por estos cebadores, ha permitido su aplicación a la identificación de una serie de paneles de diferentes especies mediante la técnica de HRM, con la intención de establecer una metodología de *screening* para la identificación de especies en ámbitos concretos de gran interés, como son la seguridad alimentaria y la protección de la fauna salvaje (Ayaz et al., 2006, Ali et al., 2014, Tobe et al., 2010, Linacre et al., 2011).

### **5.1 Muestras seleccionadas y criterios de selección.**

Se han estudiado dos colecciones de muestras de características distintas. Las primeras proceden de razas ganaderas de la región de País Vasco, tanto prehistóricas como actuales. Las segundas se han agrupado bajo la denominación “multi-especies”, ya que en esta colección el objetivo ha sido recoger muestras del mayor número posible de especies.

Las muestras de especies ganaderas han seguido diferentes criterios de selección dependiendo de si se trataba de muestras ancestrales o actuales. Las muestras ancestrales fueron seleccionadas de colecciones museísticas. Estos restos pertenecen a individuos prehistóricos en los que se había realizado una identificación morfológica pero se desconocía la especie real de los animales. Tras la revisión del material disponible, se seleccionaron seis muestras de origen bovino y ocho muestras de origen ovicaprino. Se seleccionaron muestras bovinas y ovicaprinas de yacimientos del País Vasco, tanto de la vertiente Atlántica como de la Mediterránea, de tres periodos históricos diferentes para poder observar las características de los linajes matrilineales de las colecciones a lo largo de diferentes periodos: el periodo Romano, hace aproximadamente 2.000 años, el Calcolítico, hace aproximadamente 4.000 años y el Neolítico, hace aproximadamente 7.000 años. En todas las muestras prehistóricas analizadas, el ADN se extrajo de piezas dentales debido al mejor estado de conservación en el interior de las piezas dentales (Kurosaki et al., 1993, Oota et al., 1995). Se evitaron piezas dentales fracturadas o fisuradas, con la intención de seleccionar las piezas con mejores perspectivas de preservación del ADN.

Las muestras actuales de razas ganaderas fueron seleccionadas únicamente de razas autóctonas ganaderas vascas. Las muestras de bóvidos han sido tomadas de 76 animales de la raza Terreña y 79 de la raza Pirenaica. En el caso de los óvidos, 63 muestras han sido tomadas de la variedad de la Latxa de cara rubia y 86 de la variedad de la Latxa de cara negra. Debido a que el objetivo del análisis de estos individuos está relacionado con los linajes maternos, se ha evitado recoger muestras de animales emparentados por vía materna, ya que las relaciones de parentesco desconocidas entre varios individuos en estudios de linajes maternos podría sesgar las frecuencias haplotípicas (Skare et al., 2009).

La colección de muestras denominada “multi-especie”, engloba 63 especies pertenecientes a 38 Familias de 14 Ordenes y 5 Clases diferentes. Las muestras de especies alimentarias fueron obtenidas en locales comerciales, intentado abarcar la totalidad de las especies de consumo humano habituales en la región. Por otro lado, las muestras de especies salvajes fueron recogidas en el parque de la Naturaleza de Cabárceno (Cantabria) a partir de heces. Únicamente se seleccionaron heces en los recintos en los que se encontraban las especies de forma independiente para evitar contaminaciones inter-específicas. Finalmente, las muestras de especies de origen cinegético fueron recogidas en colaboración con la asociación de cotos de caza de Álava.

### ***5.2 Identificación de especies y linajes maternos de individuos de especies ganaderas prehistóricas del País Vasco.***

El presente trabajo muestra, por primera vez, datos genéticos de individuos bovinos y ovicaprinos prehistóricos del País Vasco. Este estudio ha sido posible gracias al avance de las técnicas de análisis en biología molecular, que han permitido abordar estudios con muestras antiguas y potencialmente degradadas, como las que se hallan en los yacimientos prehistóricos, lográndose rendimientos en la extracción de ADN significativamente elevados. Cabe destacar que se obtuvieron resultados en la casi totalidad de los restos estudiados, a excepción de dos muestras bovinas del periodo romano que no presentaron la suficiente

cantidad de ADN. Esta ausencia de ADN probablemente es debido a la alta degradación a la que han estado sometidas. Se ha observado que las muestras de las que no fue posible extraer ADN procedían de yacimientos al aire libre. A pesar de tratarse de muestras del periodo histórico más reciente entre los analizados, de hace aproximadamente 2.000 años, el hecho de estar situadas en yacimientos al aire libre podría haber contribuido a una mayor degradación del ADN, ya que factores ambientales externos tales como, la temperatura, la humedad, el pH de la tierra, etc. favorecen la degradación de los restos biológicos y modifican el ADN provocando la imposibilidad de su análisis (Geigl, 2002, Lamers et al., 2009).

Si bien el objetivo general del trabajo es el estudio de los linajes matrilineales de las razas de ganado autóctono del País Vasco, fue necesario, en primer lugar, verificar la especie de los restos prehistóricos ya que la similitud morfológica entre los restos de los animales salvajes primitivos y los domesticados modernos es muy grande y las técnicas de identificación morfológicas convencionales pueden dar pie a error entre especies tan similares. La identificación de las especies se realizó mediante el análisis de una región de 208 pb del gen *cyt b* para identificar la especie concreta de cada muestra, ya que, aunque las muestras museísticas habrían sido clasificadas morfológicamente, no se tenía la seguridad de que dicha clasificación fuera correcta. Se seleccionó una pareja de cebadores con un tamaño de amplificado de alrededor de 200 pb, ya que las muestras degradadas no suelen rendir amplificadas de tamaños superiores a 200 pb (Wandeler et al. 2007, Xie et al., 2015). Aunque la presencia de *Bos primigenius*, el agriotipo y ancestro de *Bos taurus* ha sido descrita hace 7.000 años en la región geográfica a la que pertenecen los restos analizados por Altuna 1974 y Mariezkurrena 1990, todos los bóvidos analizados en este estudio pertenecieron a la especie *Bos taurus*. De la misma forma se analizó el *cyt b* en individuos ovicaprinos y a excepción de una muestra, todos los individuos pertenecían a la especie *Ovis aries*. La única muestra que no se clasificó como *Ovis aries* fue C.P.L. 17310 que tampoco pudo ser clasificada mediante análisis del *cyt b* como ninguna especie conocida de la subfamilia Caprinae.

Por lo tanto, es posible afirmar que las especies *Bos taurus* y *Ovis aries* ya se encontraban en el área del País Vasco, tanto en la vertiente mediterránea como en la vertiente atlántica, como mínimo desde hace 7.000 años. Se ha postulado que el Neolítico llegó a la Cornisa Cantábrica en el periodo de hace 5.400-2.300 AC (Oms et al., 2014, Antolin et al., 2015a y 2015b), pero

estos resultados se centran mayoritariamente en pruebas arqueobotánicas y el hallazgo de útiles diarios humanos. Debido a que los estudios de animales de este periodo son poco frecuentes, el presente trabajo, basado tanto en la determinación de especies como en el análisis de los linajes maternos, aporta un mayor conocimiento de la ganadería practicada en el Neolítico temprano en el norte de la Península Ibérica.

El análisis de los linajes maternos de los bóvidos prehistóricos mostraron que casi la totalidad de los individuos analizados, con antigüedades entre 4.000 y 7.000 años, se incluyen dentro del haplogrupo T3, que es en la actualidad el haplogrupo más común en Europa (Achilli et al., 2009, Troy et al., 2001, Kantanen et al., 2009) (Tabla 4, **Estudio 3**). Entre los bóvidos prehistóricos analizados, se ha encontrado también un individuo perteneciente al haplogrupo T, un haplogrupo mucho más minoritario en la actualidad.

Los linajes maternos de los óvidos prehistóricos analizados muestran que la totalidad de individuos analizados pertenecen al haplogrupo B. Este linaje es actualmente el más frecuente en Europa (Pedrosa et al., 2007, Pereira et al., 2006, Tapio et al., 2006). La presencia del haplogrupo B es mayoritario en todas las épocas analizadas respecto a los demás haplogrupos, en ambas vertientes, mediterránea y atlántica. De hecho, los seis haplotipos obtenidos muestran una secuencia idéntica.

Debido a la antigüedad y la alta degradación de las muestras estudiadas, los linajes maternos analizados solo proporcionan información de un fragmento de la región control. Sería de gran interés analizar, tanto en el caso de *Bos taurus* como en el caso de *Ovis aries*, la secuencia completa de la región control del ADNmt con el objetivo de establecer relaciones filogenéticas más fiables entre los individuos, tanto actuales como prehistóricos. De esta forma se podrían estudiar casos como el de la muestra arqueológica CPL.B3.265 y la muestra actual BT 753, que en la actualidad tienen un haplotipo 100% coincidente en la región analizada, pero que análisis más amplios permitirían confirmar hasta qué punto están emparentadas filogenéticamente. En casos como el anteriormente mencionado es posible que aunque tengan el mismo haplotipo en la región analizada, puedan tener diferencias significativas al analizar la región control completa.

De esta forma, la región de 208 pb del gen del *cyt b* analizada se confirma como una herramienta de gran valor en la determinación de especies, así como de sus agriotipos, en muestras arqueológicas. Asimismo, la pareja de cebadores utilizada ha demostrado su validez para la amplificación de ADNmt altamente degradado procedente de muestras prehistóricas. Cabe destacar que la identificación especie-específica de restos bovinos y ovicaprinos correspondientes al periodo Neolítico, Calcolítico y Romano ha identificado únicamente a individuos de la especie *Bos taurus*, por parte de los bóvidos, y a *Ovis aries*, por parte de los óvidos, confirmando la llegada de estas especies domesticadas a la Cornisa Cantábrica hace como mínimo 7.000 años, justo en el límite más antiguo descrito para la Neolitización en la región del norte de la Península Ibérica (Oms et al., 2014, Antolin et al., 2015a y 2015b). Además, los haplotipos presentados por la mayoría de estos bóvidos y óvidos prehistóricos se sitúan dentro de los haplogrupos más comunes en la actualidad en Europa; T3 en vacas y B en ovejas.

### **5.3 Linajes maternos de especies ganaderas bovinas autóctonas actuales del País Vasco.**

En este trabajo se presentan, por primera vez, resultados de la región control de ADNmt de razas autóctonas de ganado bovino del País Vasco. Las razas aquí estudiadas muestran una preponderancia del haplogrupo T3, mayoritario en Europa, con una diversidad reducida de haplotipos y la presencia esporádica de otros haplogrupos minoritarios como T, T1 y Q1. El hecho de que el haplogrupo T3 sea tan frecuente en Europa indica el origen de estas razas en Oriente Medio, centro de la domesticación de esta especie, donde fueron establecidos los principales haplogrupos actualmente observados (Troy et al., 2001). La baja diversidad del macro-haplogrupo T en su conjunto parece ser el resultado del estrecho cuello de botella en la reciente historia evolutiva de *Bos taurus* (Achilli et al., 2009), en parte debido al reducido número de hembras reproductoras iniciales (Bollongino et al., 2012). Al dibujar la red promedio MJ de las razas autóctonas aquí estudiadas, incluyendo la posición 169, el haplogrupo T3 se divide en dos estructuras “star-like”, una correspondiente a los haplotipos que Achilli et al., (2009) nombra como T3b, y T3a determinada por un cambio en la posición 169G ( Figura 1, **Estudio 1**). Sin embargo, la posición 169, como indican varios autores, es una posición inestable

(Achilli et al., 2009), y actualmente no existe consenso sobre el posible valor filogenético de la misma. Al dibujar la red promedio MJ descartando la posición 169, el haplogrupo T3 se unifica en una sola estructura “star-like”, coincidiendo con los resultados de Troy et al., (2001) y Kantanen et al., (2009).

La frecuencia de los linajes del haplogrupo T1 en Oriente Medio es muy baja, mientras que por el contrario su frecuencia es muy elevada en el ganado bovino africano actual (Bradley et al., 1996, Troy et al., 2001, Carvajal-Carmona et al., 2003). No obstante, la hipótesis de un evento de domesticación aislado en África ha quedado recientemente descartado debido al reducido número de mutaciones entre los haplogrupos T1'2'3 (Achilli et al., 2008). En la actualidad, es evidente la influencia africana en razas de la Península Ibérica como Alentejana con un 42% de individuos (Cymbron et al., 1998) o Lidia con un 17% de individuos (Cortes et al., 2008) pertenecientes al haplogrupo T1. Entre las diferentes hipótesis planteadas para esta introgresión se encuentra un posible cruzamiento de razas Gertrudis y Nelore (razas cebuínas, procedentes de África) con razas Ibéricas en la década de 1960/1970 (Ralo y Guerreiro, 1981). También se ha postulado que el haplogrupo T1 se encuentra representado en la Península Ibérica debido al intenso comercio con las islas Baleares y el Norte de África (Martin-Burriel et al., 1999). En las razas Terreña y Pirenaica analizadas se hallaron un total de 16 individuos que presentaron el haplogrupo T1, representando el 9,4% de las muestras. Un valor tan reducido de este haplogrupo puede ser debido a la localización geográfica de estas razas, situadas en la zona más septentrional de la Península o a un reducido cruzamiento con otras especies peninsulares debido a su aislamiento geográfico.

Entre los animales de la raza Pirenaica aquí estudiados se ha hallado la presencia de los haplogrupos minoritarios T y Q. Es destacable la presencia del haplogrupo Q, que parece ser un linaje menor de *Bos taurus* adicional al macro-haplogrupo T que se extendió por Europa tras su domesticación en Oriente Próximo. Hasta el momento, este haplogrupo sólo ha sido descrito en individuos de razas taurinas de Italia y muy recientemente en Egipto (Olivieri et al., 2015). El hecho de que el haplogrupo Q sólo se encuentre en la raza Pirenaica, indica que a pesar de sufrir un reciente cuello de botella debido a la explotación ganadera intensiva, la raza Pirenaica mantiene una diversidad mayor que la raza Terreña, donde sólo se observó la presencia del

haplogrupo T.

Las muestras BT821, BT825 y BT831 de la raza Terreña asignadas como haplogrupo Q1 en este estudio tienen siete mutaciones en la región codificante: 3811C, 5716T, 7769A, 12492A, 12954T, 15156A, y 15655G. Este haplotipo se ha comparado con otros haplotipos del haplogrupo Q registrados en GenBank y sólo se han hallado siete muestras confirmadas como haplogrupo Q que presentan el mismo número de polimorfismos en la región codificante, seis de ellas en Italia y otra adicional en Egipto (Bonfiglio et al., 2010, Olivieri et al., 2015). No se han encontrado individuos con más de los siete polimorfismos mencionados, por lo tanto, el linaje de estos individuos de Pirenaica tienen al menos la misma antigüedad que los linajes más antiguos del haplogrupo Q descritos hasta la fecha. También es destacable que esta muestra, no sólo mostró el polimorfismo 1457A que la asigna como haplogrupo Q1, sino también presentaba el polimorfismo 15156A característico del haplogrupo Q2, aunque carecía de los demás polimorfismos, 6436A y 15921A, necesarios para la asignación a este segundo sub-haplogrupo. Por tanto, es probable que la posición 15156A pudiera deberse a una retromutación.

Los conocimientos sobre el haplogrupo Q eran muy limitados hasta hace pocos años, y hasta 2010 los únicos linajes Q conocidos fueron los 16 estudiados por Bonfiglio et al., (2010). En el estudio de Bonfiglio et al., (2010) se realizó una búsqueda de 4.770 secuencias de la región control del ADNmt en la base de datos GenBank y únicamente se encontraron otras siete muestras en países de Europa, Oriente Medio y Asia, que contuvieran el motivo mutacional 15953G-169G-16255C. El presente trabajo ha incrementado la búsqueda en 1.075 secuencias adicionales almacenadas en GenBank, todas ellas depositadas a partir del año 2010. Únicamente se encontraron tres nuevas secuencias con el motivo 169G-15953G-16255C y ninguna de ellas tenía la región codificante secuenciada. Los tres individuos se localizaron en África del Sur (KF163085) (Horsburgh et al., 2013), en Finlandia (KF233438) (no publicado) y en Israel (FN562615) (no publicado), respectivamente.

La muestra Sudafricana mostró particularidades dignas de mención. La secuencia de la región control, además de tener las tres posiciones características de Q, también tenía las mutaciones características del haplogrupo T1; 16113C y 16050T. Sin embargo, el análisis de la región

codificante mostró que carecía de los restantes cambios necesarios para pertenecer al haplogrupo Q. La presencia del motivo mutacional 169G-15953G-16255C y posterior asignación a otro haplogrupo T refuerza la teoría de Achilli et al., (2008), que establece que la asignación al haplogrupo Q no puede ser verificada sin analizar los polimorfismos de la región codificante.

La confirmación a través del análisis de la región codificante de las muestras asignadas como haplogrupo Q utilizando únicamente la secuencia de la región control, haría que la distribución geográfica de este haplogrupo fuera más amplia. En este caso si la distribución geográfica tuviera mas similitudes a la del haplogrupo T fortalecería la hipótesis de que es un linaje con un origen filogenético común al haplogrupo T durante la domesticación y que surgió en Oriente Medio (Bonfiglio et al., 2010). En cambio la aparición de una muestra africana con el motivo mutacional 169G-15953G-16255C y la subsiguiente asignación al haplogrupo T1a, podría indicar que varios de los individuos que fueron asignados como haplogrupo Q solamente mediante el análisis de la región de control, podrían no estar clasificados correctamente. Esto alteraría la distribución geográfica propuesta y descartaría la hipótesis de que el haplogrupo Q se ha diseminado junto con el haplogrupo T a lo largo de Europa.

El análisis filogeográfico mediante un árbol NJ muestra la agrupación de razas autóctonas de la región vasca en una sola rama y la ausencia de otras razas en la misma rama. Estos resultados indican la relación filogenética de estas dos razas, a pesar de que la Pirenaica ha sido objeto de mejora genética y, por lo tanto, ha experimentado una pérdida de la diversidad del ADNmt debido al sobrecruzamiento realizado por un modelo de ganadería intensiva (Druker et al., 2001). Esta agrupación en una misma rama no se dio en otras razas Ibéricas a pesar de que tienen distribuciones geográficas comunes, tal y como fue descrito por Kantanen et al., (2009), el cual llevó a cabo un análisis filogeográfico de razas bovinas europeas en el que mostró una débil relación entre la distancia geográfica y el grado de diferenciación genética de las razas. Cabe destacar el caso de las razas portuguesas, donde la mayoría se han agrupado en dos ramas diferenciadas aunque alejadas entre sí. Estas diferencias se deben mayoritariamente a la presencia del haplogrupo T1, indicando la mezcla de razas de origen Europeo y Africano que se ha dado históricamente en la Península Ibérica (Bradley et al., 1999, Cymbron et al., 1999).



La diferenciación de las razas autóctonas del País Vasco en una única rama del árbol NJ y la ausencia de más razas en la misma rama, indican la particularidad genética de estas dos razas en el contexto de las razas autóctonas de la Península Ibérica. Pero aunque la región control del ADNmt ha demostrado ser de gran interés para establecer las relaciones filogenéticas entre los haplogrupos, no ofrece la diferenciación geográfica o racial de los bóvidos, por lo que sería conveniente ampliar el estudio de esta región a la región codificante. De esta forma, se podría hacer una mejor diferenciación y así ayudar a instaurar un programa de cruzamiento en las razas autóctonas que mantenga la biodiversidad y, por tanto, la continuidad de estas razas de vital importancia para el sector ganadero.

### ***5.4 Linajes maternos de especies ganaderas ovinas autóctonas actuales del País Vasco.***

El presente trabajo presenta la primera caracterización de linajes maternos de las dos variedades mayoritarias de la raza Latxa, Latxa de cara rubia y Latxa de cara negra, ambas autóctonas de la región del País Vasco. Se ha analizado la región D-loop completa del ADNmt y se ha observado que prácticamente todos los individuos analizados pertenecen al haplogrupo B. Estos resultados concuerdan con las observaciones de que la mayoría de ganado ovino, tanto en la Península Ibérica como en Europa, pertenecen al haplogrupo B (Tapio et al., 2006, Pedrosa et al., 2007). Hasta la actualidad, solo se habían descrito individuos con el haplogrupo B en la raza Latxa en unas pocas muestras analizadas, pero el presente estudio, con un mayor número de muestras, ha mostrado la presencia del haplogrupo A o Asiático, aunque con una frecuencia muy reducida, ligeramente superior al 1% (1,15%). La presencia de este haplogrupo A en la raza Latxa, así como en otras razas europeas, podría estar influenciada por intercambios comerciales de ovejas entre los dos continentes como fue descrito por Meadows et al., (2005).

La dispersión de los árboles MJ de las variedades Latxa de cara rubia y Latxa de cara negra, muestran una gran variabilidad de haplotipos ovinos dentro de la raza Latxa (Figura 1, **Estudio 2**). A diferencia del estudio realizado en vacas autóctonas del País Vasco, donde se mostraron dos estructuras “star-like” con dos haplotipos mayoritarios y muchos haplotipos variantes de estos dos mayoritarios, en el caso de las ovejas, la mayoría de los individuos presentan

haplotipos únicos y únicamente se muestran haplotipos compartidos en casos excepcionales. En el árbol NJ de las dos variedades ovinas, los individuos están diseminados en haplotipos diferenciados pero muy próximos entre ellos, y solo destacan dos grupos de muestras que se alejan del núcleo central de haplotipos. Los dos grupos diferenciados son dos muestras pertenecientes al haplogrupo A, y otras dos muestras pertenecientes al haplogrupo B pero con una quinta repetición del motivo de 75/76 pb de la región control. Esto contrasta con el árbol MJ de bovinos, donde se aprecia un mayor número de haplogrupos y una mayor distancia entre las muestras del mismo haplotipo. En la comparación de los árboles MJ de ovinos y bovinos autóctonos del País Vasco se observa que, aunque el número de haplotipos es mayor en la población ovina, el grado de similitud entre estos haplotipos también es mayor, indicando una mayor variabilidad genética de los óvidos de la raza Latxa debido, ya que podrían haber sufrido un menor nivel de cruzamiento selectivo en comparación con las razas bovinas. Este menor cruzamiento se puede deber al enorme aislamiento que ha sufrido esta raza, ya que durante siglos, no se ha mezclado con otras razas debido a una prohibición de importación de ganado exógeno (MAGRAMA Latxa 2) y a la dificultad de adaptación de otras razas a un clima húmedo y frío, como el que presenta el País Vasco.

Se ha observado una variabilidad nucleotídica de la raza Latxa notablemente superior a la descrita hasta la actualidad, ya que los linajes maternos de la raza Latxa habían sido descritos como unos de los linajes con menor variabilidad entre las razas de la Península Ibérica, tanto en la región control del ADNmt (San Primitivo et al., 2007) como en loci microsatélites (Arranz et al., 2001). La diversidad nucleotídica de la raza Latxa en este estudio es superior a la obtenida en los estudios de San Primitivo et al., (2007) para el tronco Churro (0.0105 vs. 0.0071) y mayor, también, que las observadas en los troncos Entrefino y Merino (0.0087 y 0.0081, respectivamente). La diversidad nucleotídica de la raza Latxa solo fue ligeramente menor que la del tronco Ibérico (0.0116), aunque esta mayor diversidad se puede deber a la amplia distribución de las razas del tronco Ibérico en comparación con la raza Latxa. Este hecho muestra la gran diversidad de la raza Latxa, un hecho importante a la hora de instaurar un programa de cruzamiento en estas razas autóctonas para el mantenimiento de la biodiversidad.

#### 5.4.1 Particularidades mitocondriales ovinas. Motivo de repetición en tándem de 75/76pb y su influencia en la expresión génica.

El ADNmt de ovejas tiene una particularidad con respecto a otras especies de mamíferos, y es que además de las inserciones o deleciones puntuales que se pueden dar en el ADNmt de cualquier animal, las ovejas tienen un motivo de repetición que varía en su número de unidades de repetición. La longitud de la región control del ADNmt de la mayoría de los individuos ovinos analizados fue de 1180 pb, pero se observó que una serie de individuos con longitudes de 1256 y 1257 pb. Esta variabilidad en la longitud de las secuencias, se debe a una quinta repetición en tándem de un motivo de 75/76 pb. Cuando se describió por primera vez esta inserción, Hiendleder et al., (2002) teorizaron sobre la posibilidad de identificar las especies mediante el número concreto de estas repeticiones en tándem del individuo, asignando dos repeticiones a *Ovis canadensis canadensis*, cuatro a *Ovis aries*, *Ovis Musimon* y *Ovis vignei bochariensis*, cinco a *Ovis aries astrachan*, *Ovis vignei arkal*, *Ovis ammon collium* y *Ovis ammon ammon*, y un máximo de seis a *Ovis ammon nigrimontana*. Estudios posteriores mostraron que una misma especie de óvido puede presentar diferente número de estas repeticiones (Wang et al., 2007, Meadows et al., 2011) lo que demostró que el número de repeticiones no está asociado a la especie. Posteriormente, Demirci et al., (2013) propusieron que la longitud de la segunda y subsiguientes repeticiones del motivo de repetición de 75/76pb puede diferenciar entre los cinco haplogrupos de *Ovis aries* en dos clústers genéticos; el primero compuesto por los haplogrupos A, B, C y un segundo compuesto por los haplogrupos C y E.

Entre los individuos Latxa analizados se encontraron dos individuos con una quinta repetición en tándem del motivo de 75/76 pb, ambos pertenecientes al haplogrupo B. Con la intención de tener un conocimiento más amplio de este motivo de repetición y su incidencia en la población ovina mundial, se realizó una búsqueda en GenBank que únicamente aportó otros 33 individuos (entre 11.061 individuos) con las mismas características. El origen de estas muestras es asiático (principalmente de China), de Oriente próximo y de Europa, lo que confiere a la quinta repetición del motivo en tándem 75/76 pb una amplia distribución, principalmente Euroasiática, aun cuando su presencia entre la totalidad de los óvidos a nivel mundial

recogidos en la base de datos GenBank es únicamente del 0.30%. Los 35 individuos portadores de la quinta repetición en tándem mostraron variabilidad en sus haplogrupos, distribuyéndose en los haplogrupos A, B y C, siendo el haplogrupo B el grupo mayoritario (54.28%). La distribución en haplogrupos de los 35 individuos con un quinto motivo de repetición coincide con la teoría de Demirci et al., (2013) que sitúa a los diferentes números de repeticiones en haplogrupos diferentes. Solo se encontró una excepción. El individuo DQ460432.1 presentó todos los polimorfismos para poder ser asignado al haplogrupo C, a excepción del polimorfismo 16133C, por lo que finalmente quedó clasificado dentro del haplogrupo A. A la vez, este mismo individuo presentó otra excepción respecto a la norma de Demirci et al., (2013), ya que tenía la segunda y subsiguientes repeticiones de 76pb, a excepción de la tercera. Sin embargo, estos dos polimorfismos podrían no ser una excepción si se considera que se tratan de retromutaciones, por lo que la clasificación como haplogrupo A sería cuestionable. Esto se puede apreciar en el árbol NJ realizado (Figura 2, **Estudio 2**), donde el individuo DQ460432.1 queda situado agrupado junto a los individuos del haplogrupo C debido a su mayor cercanía filogenética y situado en una rama diferente a la de su clasificación en haplogrupo A.

Las variaciones en el número de unidades de repetición en tándem de 75/76 pb en la región control podrían tener efectos en la expresión del ADNmt. La región control contiene los principales lugares de unión de factores promotores de la replicación y la transcripción (Taanman, 1999). Además, las repeticiones de 75/76 pb se sitúan en la región ETAS1, relacionada con la función reguladora donde interactúan factores de replicación y transcripción. Por este motivo, las variaciones de las secuencias repetidas en la región reguladora TAS podrían alterar la expresión de los genes del ADNmt debido a posibles alteraciones en la conformación de la región reguladora (Sbisá et al., 1997).

En este trabajo hemos abordado el estudio de la expresión génica del ADNmt de los dos individuos con una unidad extra del motivo de repetición en tándem de 75/76 pb. La comparación entre la expresión en estos dos individuos y de los otros cuatro individuos sin la unidad de repetición extra, mostraron que la expresión génica variaba entre individuos con diferente número de repeticiones en tándem presentes en la región ETAS1. Se apreció una ligera reducción en la expresión génica en los dos individuos con un motivo de repetición

adicional, pero las diferencias observadas no fueron significativas respecto a las muestras control analizadas. Sería conveniente realizar más pruebas, con un mayor número de individuos que tengan este motivo de repetición en tándem de 75/76 pb, para comprobar si los datos obtenidos en estos estudios de expresión génica pueden ser confirmados.

### ***5.5 Continuidad del acervo genético. Comparación de los linajes maternos de especies ganaderas prehistóricas y actuales del País Vasco.***

Los linajes maternos de bóvidos y óvidos del País Vasco prehistóricos presentan grandes similitudes con los linajes actuales pese a estar separados por 7.000 años de evolución.

En el caso de los bóvidos, la mayoría de los individuos prehistóricos mostraron el haplogrupo T3, el más común en la actualidad en el continente Europeo. Cabe destacar que los haplotipos prehistóricos encontrados coinciden con los de varios individuos actuales del norte de la Península Ibérica incluidos en la base de datos de ADNmt del Banco de ADN de la UPV/EHU, lo que refleja la existencia de continuidad genética de los linajes maternos. Esto se puede deber a un elevado grado de adaptación al medio, que habría hecho que estos haplotipos se fijasen en la población y que se hayan mantenido durante miles de años en el norte de la Península Ibérica. Por lo que, la continuidad del acervo genético es apreciable entre los individuos bovinos que habitaron esta región del Neolítico peninsular hasta las actuales razas autóctonas.

Esta continuidad entre haplotipos Neolíticos bovinos y actuales ya había sido previamente descrita en Oriente Medio, más concretamente en Irán y en Europa en Alemania (Scheu et al., 2008, Bollongino et al., 2012). Las secuencias iraníes fueron estudiadas en ganado neolítico con una antigüedad en torno a 8.000 años, así como en un resto del periodo Calcolítico ( $\approx 4.000$  años) y otro del periodo Romano ( $\approx 2.000$  años). Las secuencias alemanas fueron del periodo Calcolítico. Mediante el hallazgo de haplotipos idénticos en yacimientos distantes resultó posible apreciar una continuidad genética procedente de oriente a occidente a lo largo de los tres periodos estudiados. Al comparar los restos estudiados por Scheu et al. (2008) y Bollongino et al. (2012) con los individuos actuales del presente estudio, se encontraron ocho individuos con el mismo haplotipo, dos de la raza Pirenaica y seis de la raza Terreña, demostrando que los

linajes presentes en el Oriente Medio Neolítico, hace aproximadamente 8.000, han tenido una continuidad genética hasta la actualidad y se ha extendido a lo largo de Europa hasta alcanzar el extremo más occidental de este continente.

En el caso de lo óvidos se ha observado la existencia de continuidad genética tanto en ganado de la vertiente mediterránea como de la vertiente atlántica, desde el Neolítico hasta la actualidad. Todas las ovejas prehistóricas mostraron el mismo haplotipo, este haplotipo es muy común en la actualidad ya que coincide con el de la secuencia de referencia ovina. Por lo que estos animales prehistóricos, que ya se encontraban en la zona 7.000 años atrás, muestran grandes similitudes con los animales autóctonos actuales, indicando que en estos últimos 7.000 años se han producido un reducido número de mutaciones y una gran conservación de los linajes maternos.

### **5.6 ¿Nueva especie del genero *Capra*?**

Se realizó un análisis de una región del gen *cyt b* para la identificación de las especies de los restos de individuos prehistóricos hallados en yacimientos arqueológicos del País Vasco. Ello permitió identificar la especie de todos los restos a excepción de uno de ellos; C.P.L. 17310, cuyo estudio morfológico lo clasificó como ovicaprino, ya que no resultaba posible establecer si pertenecía a un individuo ovino o caprino.

Al contrastar la secuencia obtenida de este individuo con las secuencias almacenadas en la base de datos de GenBank no se encontró ninguna coincidencia que ayudara a identificar la especie. Al no hallar coincidencias se realizó un árbol NJ (Figura 2, **Estudio 3**) para ver las relaciones filogenéticas entre las especies ovicaprinas. Se observó una clara separación de la muestra C.P.L. 17310, que se situaba con las especies del género *Capra*, pero en una rama independiente.

Estas diferencias en la secuencia de bases con respecto a las especies de *Ovis* y *Capra* existentes en la base de datos GenBank, hacen pensar que la muestra pueda pertenecer a un individuo de una especie extinta, ya que en esta base de datos están presentes las secuencias

de todas las especies ovicaprinas existentes y no coincide con ninguna de ellas. Sería interesante poder realizar análisis del gen *cyt b* completo del resto prehistórico, así como de un mayor número de muestras ovicaprinas arqueológicas, para poder situar y clasificar de una forma más precisa el origen de este individuo.

### **5.7 Identificación de especies mediante una pareja de cebadores universales del gen *cyt b*.**

La identificación de especies mediante la utilización de cebadores universales es una herramienta de gran utilidad en casos relacionados con las ciencias forenses, la biodiversidad y la seguridad alimentaria. Cebadores, como los descritos por Parson et al., (2000) o Hebert et al. (2003), han demostrado ser extremadamente útiles en la identificación de especies en casos con vestigios biológicos. Sin embargo, los cebadores universales convencionales tienen la limitación de generar un amplificado de tamaño relativamente grande para el análisis de muestras altamente degradadas (358 pb y 618 pb, respectivamente), por lo que su eficiencia puede verse reducida cuando el ADN está altamente degradado como ocurre frecuentemente en los vestigios forenses (Hajibabaei et al., 2006). El ADN degradado rara vez rinde amplificados mayores de 200 pb (Wandeler et al., 2007, Wei et al., 2014), por lo que el diseño de cebadores para obtener amplicones de pequeño tamaño, a ser posible menores de 200 pb, es la mejor opción para identificar la especie de los vestigios.

En este sentido, y con el objetivo de identificar especies en muestras altamente degradadas, Hajibabaei et al., (2006 y 2007) desarrollaron mini-barcodes, menores de 200 pb, de los genes *cyt b* y *COI*. Estos cebadores generan amplificados de corto tamaño por lo que resultan adecuados para el análisis de muestras con ADN altamente degradado, manteniendo una adecuada capacidad de resolución a nivel de especie; sin embargo, estos autores probaron sus cebadores únicamente con artrópodos procedentes de museos y bases de datos.

Ante la ausencia de un método validado para la identificación de especies de vestigios forenses degradados, el objetivo de este trabajo fue diseñar y validar una pareja de cebadores universales para amplificar un fragmento del gen *cyt b* con un tamaño menor de 200 pb. Se

eligió este gen por haber sido ampliamente utilizado en estudios taxonómicos y forenses (Parson et al., 2000, Hsieh et al., 2001), y haber demostrado un alto nivel de discriminación entre especies. La pareja de cebadores diseñada generan un amplificado de 148 pb que pese a su corta longitud ha mostrado mantener el poder de discriminación de especies. Debido al pequeño tamaño del amplificado, estos cebadores pueden ser utilizados con técnicas como la disociación de alta resolución (HRM) y la pirosecuenciación, dos técnicas de gran utilidad para la identificación de especies como han demostrado Naue et al., (2014), Shokralla et al., (2011) y Sakaridis et al. (2013).

A la hora de diseñar una buena pareja de cebadores universales, el factor más importante es alcanzar un elevado grado de discriminación inter-específica. Por este motivo Hebert et al., (2003) diseñaron una pareja de cebadores universales que genera un amplificado de 618 pb, capaz de discriminar más del 97% de las especies de mamíferos (Hajibabaei et al., 2007), aves (Hebert et al., 2004) o peces (Ward et al., 2005). El diseño de amplicones de menor longitud resulta de mayor dificultad ya que los cebadores deben amplificar una zona cuya secuencia, pese al corto tamaño de amplificado, sea altamente variable entre especies y proporcione por tanto un alto poder de discriminación inter-específica.

Para llevar a cabo este objetivo, se partió del alineamiento de las secuencias del gen *cyt b* completo de mamíferos disponibles en el GenBank y de esta forma buscar las regiones más cortas con mayor capacidad de discriminación entre estas especies. Se tuvieron en cuenta dos factores principales: por un lado una alta variabilidad interespecífica y por otro lado una reducida variabilidad intraespecífica. Se seleccionó la región comprendida entre las posiciones L15601 y H15748 del genoma mitocondrial humano y se diseñó una pareja de cebadores para permitir su amplificación. Estos cebadores fueron utilizados para comprobar de forma empírica su capacidad de discriminación interespecífica. Se realizó un ensayo con 41 especies de la Clase Mamífera y en todos los casos fue posible determinar la especie. Además, dichos cebadores demostraron que su eficacia se extiende a especies no mamíferas, ya que fueron aplicados a numerosas especies pertenecientes a otras Clases animales. Se comprobó su capacidad de identificación en 22 especies pertenecientes a 19 Familias de 8 Ordenes diferentes, no incluidos entre los mamíferos. Los resultados obtenidos en este amplio número



de especies ponen de manifiesto el carácter universal de estos cebadores para la identificación de especies.

La identidad intraespecífica del fragmento estudiado en nuestras especies se situó por encima del 97%, excepto para facóquero y puercoespín cuya variabilidad intraespecífica obtenida al analizarlas junto con las secuencias de GenBank resultaron más altas (4% y 6%, respectivamente). Esto puede ser debido al reducido número de individuos recogidos en la base de datos de GenBank y cuya asignación de especie tendría que ser confirmada mediante el análisis de un mayor número de individuos bien clasificados y pertenecientes a regiones geográficas bien delimitadas.

Al hacer un análisis BLAST del fragmento del *cyt b* analizado se encontró una limitación, ya se hallaron individuos de especies cercanas filogenéticamente que se encontraban dentro del rango de variabilidad intraespecífica de otra especie. En este sentido, se han observado algunas coincidencias entre especies domésticas o entre especies domésticas y salvajes del mismo género cercanas filogenéticamente, como es el caso de *Bos taurus* - *Bos indicus*, *Ovis aries* - *Ovis Orientalis* - *Ovis musimon*, *Gallus gallus domesticus* - *Gallus sonneratii*, *Capra hircus* - *Capra aegragus*, *Capra falconeri*, *Capra caucasica* - *Capra cylindricornis*, *Sus scrofa domestica* - *Sus scrofa* y *Canis lupus familiaris* - *Canis lupus*. En estos casos la localización geográfica de la muestra puede contribuir a la identificación de la especie cuando hay ausencia de especies similares en la misma zona. También se observó que *Equus caballus* y *Bos taurus* comparten secuencias con sus respectivas especies ancestrales extintas, *Equus ferus przewalskii* y *Bos primigenius*. Estos resultados concuerdan con la alta conservación de este fragmento del *cyt b* a lo largo de la historia de estas especies domésticas como han señalado Edwards et al., (2010) y Goto et al., (2011).

Si bien es cierto que se han observado limitaciones en los cebadores universales diseñados en este estudio, dichas limitaciones son reducidas como lo demuestra la comparación de los árboles filogenéticos obtenidos con la secuencia completa del *cyt b* (Figura S2, **Estudio 4**), el fragmento de 358 pb *cyt b* descrito por Parson et al., (2000) (Figura S3, **Estudio 4**), el fragmento de 658 pb del gen *COI* descrito por Hebert et al., (2003) (Figura S4, **Estudio 4**), y el obtenido con el fragmento de 148 pb utilizado en este trabajo (Figura 1, **Estudio 4**). El árbol NJ

basado en la secuencia completa del gen *cyt b*, realizado con 751 especies de mamíferos, aunque muestra las especies *Cymonys ludovicianus*, *Oyctolagus cuniculus* y *Camelus bactrianus* situadas en sus Ordenes correspondientes, muestra a *Ceratotherium simum* situado en el orden Artiodactyla en vez de estar presente en el orden que le corresponde, Perissodactyla, al igual que ocurre en el árbol filogenético realizado en este estudio. El árbol NJ del fragmento de 358 pb (Parson et al., 2001) muestra dos especies en un Orden diferente al que pertenecen y además, dos Ordenes están bifurcados en dos ramas diferentes. El árbol NJ del fragmento de 658 pb (Hebert et al., 2003) muestra tres especies en un Orden diferente y el Orden artiodáctilo dividido en dos ramas. El árbol filogenético NJ de 148 pb analizado en el presente estudio muestra que la mayoría de las especies se agrupan en sus Ordenes correspondientes y solo cuatro especies (*Cymonys ludovicianus*, *Ceratotherium simum*, *Oyctolagus cuniculus* y *Camelus bactrianus*) se sitúan fuera de la rama de su Orden. Cabe destacar que en los dos Ordenes con más especies representadas en nuestro estudio, Artiodactyla con 26 especies y Carnívora con 9, se observa que aunque las especies se agrupan correctamente dentro de los Ordenes, no ocurre igual con la clasificación dentro de las Familias.

### **5.7.1 Aplicabilidad de los cebadores universales del gen *cyt b* al análisis HRM.**

Una vez comprobada la universalidad de los cebadores diseñados en el presente estudio se procedió a explorar la utilidad de los mismos mediante una metodología aplicable a grandes números de muestras en los que resulta de interés la utilización de metodologías de *screening*. La utilización de esta pareja de cebadores y su análisis mediante la tecnología HRM supone una técnica de *screening* rápida, barata y sencilla para la identificación de especies en el ámbito de la seguridad alimentaria, para lo que hemos desarrollado varios paneles de especies cárnicas, y en el ámbito de la conservación de la biodiversidad, que puede ser abordada mediante un panel de identificación de especies cinegéticas.

#### **5.7.1.1 Paneles de HRM de especies cárnicas.**

Debido al elevado número de casos de adulteración, tanto en carnes sin procesar como en carnes procesadas (Ayaz et al., 2006), la identificación de especies en productos cárnicos se está convirtiendo en un análisis de gran interés en laboratorios relacionados con la alimentación y la seguridad alimentaria. En los últimos años, los métodos de identificación mediante técnicas de PCR a tiempo real han sido ampliamente utilizados para la identificación de especies y análisis alimentarios (Druml et al., 2014). Métodos como la PCR a tiempo real unido al análisis por HRM, se presenta como una técnica de *screening* fiable, barata y rápida (Wu et al., 2008) frente a las técnicas convencionales, como es el caso de la secuenciación Sanger o los métodos proteicos. Otros métodos que en principio pueden ser de interés para *screening*, como los análisis de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), presentan limitaciones tales como; la afinidad variable, la producción limitada y procedimientos de purificación extensos para eliminar la reactividad cruzada en la identificación de algunas especies (Harlow et al., 1999, Asensio et al., 2008).

Los cebadores universales del gen *cyt b* como los descritos por Parson et al., (2000) y Hshie et al., (2001) son de gran utilidad para la identificación de especies en muestras que proporcionen fragmentos de ADN de longitud suficiente, pero su aplicabilidad se reduce en el caso de muestras en las que es frecuente la degradación del ADN (Hajibabaei et al., 2005). Además estos cebadores no son apropiados para el *screening* de un gran número de muestras, ya que requieren el uso de técnicas como la secuenciación Sanger.

Los amplicones menores a 200 pb pueden ser más útiles para una óptima identificación de especie a partir de muestras con ADN degradado (Unsel et al., 1995). Este es un factor de gran interés en muestras alimentarias procesadas donde el ADN puede encontrarse altamente degradado debido a procesos de esterilización a temperaturas superiores a 100° C. Además, este corto tamaño de amplificado resulta óptimo para el análisis mediante HRM, tecnología que se adapta perfectamente a su uso para *screening* de elevados números de muestras.

En el presente estudio se ha analizado una región de 148 pb del gen *cyt b*, un gen ampliamente utilizado en estudios taxonómicos y forenses (Parson et al., 2000, Hsieh et al., 2001). Primero se hicieron tres paneles generales, uno con todas las muestras analizadas, otro con especies de mamíferos y otro con especies avícolas. Todas las muestras de las diferentes especies han

podido ser identificadas debido a su inequívoco perfil de HRM y todas las muestras han sido correctamente identificadas tanto en el panel general, como en los paneles específicos de mamíferos o aves.

Posteriormente se realizaron pruebas de sensibilidad en el HRM mediante diferentes diluciones del ADN de las especies *Bos taurus* y *Sus scrofa domestica*. El análisis de Las diluciones de ADN tanto en *Bos taurus* como en *Sus scrofa domestica* muestran que la cantidad de ADN molde no es un factor determinante a la hora de identificar las especies. En todos los casos se identificó correctamente la especie, si bien como era de esperar los perfiles obtenidos con menores cantidades de ADN muestran niveles de RFUs normalizadas inferiores, tal y como había sido previamente descrito por Naue et al., (2014). La variación en los perfiles debida a una mayor o menor concentración de ADN no afecta a la identificación de especie, agrupándose todos los perfiles de una misma especie en el rango característico de la especie concreta. Los resultados demuestran también una alta sensibilidad del método, ya que se obtuvo la identificación de las especies incluso con una cantidad de 0,1 ng de ADN.

Finalmente se realizaron 5 paneles de mezclas cárnicas (*Equus caballus* + *Sus scrofa*, *Equus caballus* + *Ovis aries*, *Equus caballus* + *Bos taurus*, *Bos taurus* + *Sus scrofa domesticus*, *Sus scrofa domesticus* + *Ovis aries*) con la intención de poder identificar las especies presentes en las combinaciones más comunes de mezclas cárnicas, y así evitar posibles adulteraciones. Los cinco paneles de las diferentes mezclas, además de identificar las dos especies presentes en cada panel, proporcionan una aproximación porcentual de cada especie en la mezcla. Se observa que la forma de los perfiles de disociación de las mezcla cárnicas ocupan el área que hay entre los dos perfiles de las dos especies (Figura 5, **Estudio 5**), acercándose más al perfil de una especie concreta cuando mayor es su porcentaje en la muestra. Por este motivo, en paneles de mezclas como el de *Sus scrofa* + *Ovis aries*, donde los perfiles de las dos especies están muy próximos entre sí, no se consigue una separación tan clara, pudiendo generar algún solapamiento entre perfiles de porcentajes de ADN diferentes. En estos casos esta metodología aunque no es lo suficientemente discriminativa como para proporcionar datos cuantitativos, es capaz de asignar la especie concreta, tal y como ha sido previamente descrito en mezclas de carne utilizando el gen *cyt b* por Sakaridis et al. (2013) en bóvidos o por Naue et al., (2014) en équidos e individuos lepóridos. Mientras que perfiles de mezclas con rangos más

amplios, debido a una mayor separación de los perfiles de cada especie como es el caso de *Equus caballus + Sus scrofa*, *Equus caballus + Ovis aries* o *Bos taurus + Sus scrofa*, proporcionan una mejor visualización de cada uno de los porcentajes. En los casos con mayor solapamiento entre los perfiles de las muestras se recomienda crear un nuevo panel con un par de cebadores diferente para obtener una información más precisa.

Las muestras que contengan especies no introducidas en estos paneles de HRM, tanto en carnes sin tratar como en mezclas cárnicas, mostrarán perfiles de disociación diferentes debido a las diferencias en la temperatura de disociación de la nueva especie introducida. Este hecho se ha apreciado en López-Oceja et al., (2015), donde con el mismo par de cebadores universales se observaron diferentes perfiles de disociación en las especies analizadas. En caso de hallarse perfiles de disociación diferentes a los conocidos, la presencia de nuevas especies podrá ser confirmada mediante secuenciación Sanger para posteriormente pasar a ser incluidas en la colección de perfiles de curvas de disociación.

A modo de resumen, se puede afirmar que el presente trabajo presenta una técnica de *screening* utilizando una pareja de cebadores universales del gen *cyt b*, capaz de discriminar mediante una serie de paneles de HRM, 7 especies cárnicas y 5 mezclas cárnicas de gran interés económico, sanitario y social.

### **5.7.1.2 Paneles de HRM de especies cinegéticas.**

La identificación de especies cinegéticas es de gran importancia para la lucha de ataques contra la biodiversidad y la investigación de la caza furtiva. Hasta la actualidad, se han reportado múltiples metodologías para la identificación de especies en fauna salvaje (Johnson et al., 2014). Si bien es cierto que se han realizado múltiples estudios previos de identificación de especies de fauna salvaje mediante la metodología HRM (Dubey et al., 2011, Ramon-Laca, 2014, Buddhakosai et al., 2014), el presente estudio presenta un panel de HRM con las especies cinegéticas de caza mayor más comunes de la Península Ibérica, que no habían sido incluidas en los estudios previamente realizados. La selección de las especies a analizar se realizó teniendo en cuenta por una parte, las tres especies más cazadas por número de

individuos en la Península Ibérica; el ciervo (*Cervus elaphus*), el corzo (*Capreolus capreolus*) y el jabalí (*Sus scrofa*) (Pita et al., 2012) y por otra parte, dos especies protegidas por su reducido número de individuos como son el oso pardo (*Urdus arctos*) y el lobo (*Canis lupus*). En el panel se incluyeron además muestras de las dos especies domésticas, perro (*Canis lupus familiaris*) y cerdo (*Sus scrofa domestica*), para observar la obtención de perfiles de HRM diferentes entre las especies salvajes y domésticas cercanas filogenéticamente y verificar que es posible discriminar correctamente cada especie analizada.

Las muestras forenses con un origen en la vida animal salvaje pueden ser de muchas matrices como pieles o esqueletos de especies de vertebrados, exoesqueletos y conchas de especies de invertebrados y partes del cuerpo de los animales, tales como los órganos internos, dientes, músculo, sangre, etc. (Johnson et al., 2014). Frecuentemente, los vestigios de fauna salvaje presentan una gran degradación del ADN. Por este motivo, un cebador inferior a 200 pb, para una óptima amplificación del ADN degradado es de vital importancia (Wandeler et al., 2007, Wei et al., 2014). Los cebadores presentados en este estudio, que amplifican una pequeña región de 148 pb, se diseñaron específicamente para poder ser utilizados en muestras degradadas, y permiten obtener perfiles de HRM de la misma calidad que los obtenidos de ADN no degradado, por ello resultan de gran utilidad para la identificación de restos de fauna salvaje.

Los cebadores universales del gen *cyt b* diseñados en este estudio lograron amplificar las siete especies analizadas obteniendo curvas de disociación únicas para cada una de las especies (Figura 1, **Estudio 6**). Los resultados no han mostrado solapamiento entre perfiles diferentes. Como se ha visto en estudios previamente publicados, una excesiva cercanía de los perfiles podría inducir a confusión a la hora de identificar cada una de las especies (Malewski et al., 2010, Sakaridis et al., 2013). Si bien es cierto que los perfiles de HRM de cerdo y ciervo han resultado ser próximos uno del otro, todos los individuos están dentro de su grupo correspondiente, sin que haya ningún tipo de mezcla, por lo que incluso en este caso es posible la discriminación.

En síntesis, el uso de una pareja de cebadores universales del gen *cyt b*, ha permitido el diseño de un panel de cinco especies cinegéticas de caza mayor de gran interés económico y

ecológico que pueden ser discriminadas mediante HRM, tanto en muestras bien conservadas como en muestras degradadas.

## **6. Conclusiones**

**Konklusioak**

**Conclusions**





### Conclusiones

1. La caracterización de los linajes maternos de las razas bovinas autóctonas Terreña y Pirenaica del País Vasco ha revelado una reducida diversidad haplotípica, enmarcada mayoritariamente en los haplogrupos mitocondriales bovinos más comunes de Europa, T3 y sus subhaplogrupos T3a y T3b. Cabe destacar la similitud filogenética de las razas autóctonas de País Vasco y su clara diferenciación frente a otras razas de la Península Ibérica.
2. El análisis del ADNmt completo ha mostrado por primera vez la presencia del haplogrupo Q en bóvidos de la Península Ibérica. Los tres individuos portadores de este haplogrupo pertenecen al subhaplogrupo Q1 y presentan siete polimorfismos en la región no codificante. Estos linajes Q1 tienen la misma antigüedad que otros seis linajes diferentes hallados en Italia y uno hallado en Egipto, y son hasta la fecha, los más antiguos del haplogrupo Q.
3. La caracterización de los linajes maternos de las dos variedades de oveja Latxa autóctonas del País Vasco presenta una alta diversidad haplotípica, pero una diversidad de haplogrupos muy reducida, siendo en su mayoría portadoras del haplogrupo ovino B, el más común en Europa.
4. Se han detectado dos individuos de la raza Latxa, uno de cada variedad, con una unidad extra del motivo de repetición de 75/76 pb, únicamente presente en el 0,3% de la población ovina mundial. Este motivo de repetición de 75/76 pb se encuentra en una posición relacionada con una posible función reguladora de los procesos de replicación y transcripción del ADNmt. La expresión de los genes *COI*, *cyt b*, *ND1* y *ND2*, situados a lo largo del ADNmt, mostraron que la variación en el número de repeticiones no tiene influencia sobre la expresión del genoma mitocondrial.
5. El estudio de la secuencia de la región control y del *cyt b* de restos arqueológicos bovinos y ovicaprinos, representa el primer estudio genético de ADN antiguo de esta

- clase de restos que se realiza en el País Vasco. Pese a la dificultad del análisis de estos restos antiguos, se alcanzó un 78,5% de éxito tanto en el análisis del gen *cyt b* como de la región control del ADN mitocondrial.
6. La identificación de especies mediante el gen *cyt b* en restos de hace 2.000, 4.000 y 7.000 años, ha mostrado la presencia de las especies domésticas *Bos taurus* y *Ovis aries* y por lo tanto, la presencia del Neolítico en el País Vasco. Además, la comparación entre los datos obtenidos en las razas autóctonas actuales y los obtenidos en los animales prehistóricos parece indicar la presencia de una continuidad genética entre estos individuos actuales y prehistóricos.
  7. El hallazgo de un individuo ovicaprino con una secuencia del gen *cyt b* diferente a la de cualquier ovino o caprino conocido en la actualidad, parece señalar que se trata de un individuo de una especie extinta.
  8. Los cebadores del *cyt b*; L15601 y H15748, diseñados en el presente trabajo, generan un amplificado de pequeño tamaño, de 148 pb específicamente ideado para amplificar ADN degradado. Estos cebadores han demostrado que son capaces de amplificar el ADN de un amplio espectro de individuos pertenecientes a 63 especies de 38 Familias, 14 Ordenes y 5 Clases diferentes (Mamíferos, Aves, Reptiles, Actinopterygios y Malacostráceos). Esta amplia capacidad para la identificación de especies permite considerar que esta pareja de cebadores tiene características de universalidad.
  9. Los cebadores universales *cyt b* L15601 y H15748 son de interés para el *screening* basado en el análisis de las curvas de disociación mediante tecnología HRM. Esta metodología ha sido aplicada a un panel de ocho especies cárnicas de consumo habitual en alimentación, cinco especies de mamíferos y tres de aves y se ha comprobado su alta eficiencia para discriminar las especies mencionadas. Esta metodología también ha demostrado su utilidad para llevar a cabo procedimiento de *screening* para la detección de mezclas cárnicas alimentarias. En todos los casos fue posible la identificación de las especies presentes en las mezclas así como una aproximación porcentual a la contribución de ADN de cada una de las especies.

10. Los cebadores universales *cyt b* L15601 y H15748 han sido utilizados para el *screening* mediante tecnología HRM de un panel de cinco especies cinegéticas y dos especies domésticas cercanas filogenéticamente; lobo-perro (*Canis lupus* - *Canis lupus familiaris*) y jabalí-cerdo (*Sus scrofa* – *Sus scrofa domestica*). Se ha comprobado que esta metodología es capaz de diferenciar entre las siete especies cinegéticas y domésticas analizadas y por tanto, resultará en una herramienta de gran utilidad y bajo coste para el control de la correcta gestión y uso de las especies cinegéticas.

## Konklusioak

1. Terreña eta Pirenaika Euskal arraza bobidoen ama-leinuen karakterizazioa, haplotipo aniztasun murriztua daukatela ezagutarazi du, banako gehienak T3 haplotaldean eta T3a eta T3b subhaplotaldeetan antolatzen baitira, Europako haplotalderik arruntenak. Azpimarratzekoa da Euskal arraza autoktonoen artean dagoen antzekotasun filogenetikoa, batez ere Iberiar Penintsulako beste arraza batzuekin alderatuta.
2. DNAm-t osoaren analisia lehen aldiz erakutsi du Q haplotaldearen agerpena Iberiar Penintsulako bobido batean. Haplotalde honetan dauden 3 banakoak Q1 subhaplotaldearen parte dira eta zazpi polimorfismo daukate erregio ez kodifikantean. Aztertutako Q1 leinua, Italian aurkitutako sei leinu eta Egipton aurkitutako beste leinu bat antzintasun berbera dute, eta orain arte Q haplotaldearen leinurik zaharrenak dira.
3. Latxa Euskal ardi autoktonoaren bi moten azterketaren ondoren, ama-leinuen karakterizazioa haplotipo aniztasun handia erakutsi du, baina haplotalde aniztasun oso murriztua agertu da, gehien bat B haplotaldearen parte dira, Europan zehar haplotalderik arruntena.
4. Bi Latxa ardi aurkitu dira, mota bakoitzeko banako bat, aparteko 75/76 pb tandem errepikapen batekin. 75/76 pb tandem errepikapen hori mundu mailan soilik ardien %0,3-an agertzen da, eta erreplikazio eta transkripzio funtzio erregulatuarekin erlazionatuta dagoen gene baten barruan kokatuta dago. ADNmt-ean zehar dauden *COI*, *cyt b*, *ND1* eta *ND2* geneen espresio genetikoan ikus daiteke nola errepikapen kopurua ez dauka zerikusirik genoma mitokondrialaren espresio genetikorekin.
5. Historiaurreko bobido eta obidoen erregio kontrola eta *cyt b* geneen inguruan egiten den lehen ikerketa da DNA-a lagin mota honekin Euskadin. Nahiz eta zaila izan historiaurreko laginekin lan egitea, %78,5-ko arrakasta lortu da bai erregio kontrolean, bai *cyt b* genea analizatzerakoan.

6. Espezie identifikazioa *cyt b* genearen bitartez, 2.000, 4.000 eta 7.000 urte duten laginetan. *Bos taurus* eta *Ovis aries*-en presentzia azaldu da, Neolitiko garaia heldueraren adierazle Euskadin. Era berean, gaur egungo Euskal arraza autoktono eta historiaurreko animaliak alderatuta, badirudi populazio bien arteko jarraitasun genetikoa ikus daitekeela.
7. Banako baten *cyt b*-aren sekuentzia, gaur egun ezagutzen diren ardi eta ahuntz espezie guztien ezberdina da. Hau iraungita dagoen espezie baten banako bat izan litekeela adierazi dezake.
8. Lan honetan diseinatutako *cyt b*-rako primerrak, L15601 y H15748, 148 pb-ko amplifikatu bat sortzen dute, bereiziki diseinatuta degradatutako DNA amplifikatzeko. Primer bikote hau 38 Falimietako, 14 Ordeneko eta 5 Klase desberdineko (Ugaztunak, Hegaztiak, Narrastiak, Actinopterioak eta Malacostrazeoak) 63 abere espezie ezberdinekin frogatu da. Espezieak identifikatzeko duen ahalmen handia dela eta, primer bikote hau unibertsaltasun ezaugarriak aurkezten dituela dirudi.
9. *Cyt b*-ko L15601 eta H15748 primer unibertsalak erabilgarriak dira HRM teknologiaren bitartez eta ondorioz, interesgarriak dira disoziazio-kurben inguruan egin daitekeen screening teknikarentzako. Metodologia hau elikaduran erabiltzen diren zortzi haragi espeziekin frogatu da. Hain zuzen ere, bost espezie ugaztun eta hiru hegazti. Kasu guztietan ikusi da espezieak desberdintzeko duen gaitasun handia. Metodologia hau ere screening modura erabili da bi haragi espezieen laginen arteko nahastura detektatzeko. Kasu guztietan, laginean aurkitzen diren espezie biak identifikatu ahal izan dira eta era berean, espezie bakoitzeko DNA-ren ehunekoaren hurreratze bat ere ikusi daiteke.

10. Cyt b generako L15601 eta H15748 erabilitako primer unibertsalak HRM teknologiaren bitartez erabiliak izan dira bost ehiza espezie eta filogenetikoki hurbilak diren bi etxe espeziekin, otso- txakur (*Canis lupus* - *Canis lupus familiaris*) eta txerri – basurde (*Sus scrofa* – *Sus scrofa domestica*). Metodo hau erabilgarria dela egiaztatu da zazpi etxe eta ehiza espezieen artean ezberdintzeko taula baten bitartez eta beraz, erabilgarritasun handiko eta koste baxuko erreminta bat da ehiza espezieak kontrolatzeko eta hauen gestio egoki bat egiteko.

## Conclusions

1. The characterization of maternal lineages in Terreña and Pirenaica Basque native breeds has shown a low haplotype diversity, harboring mainly the most common mitochondrial haplogroups in European bovines, T3 and the subhaplogroups T3a and T3b. It is noteworthy the phylogenetic similarity between Basque native breeds and their clear differentiation to other breeds from the Iberian Peninsula.
2. The analysis of the complete mtDNA has shown, for the first time, the presence of the Q haplogroup in an Iberian Peninsula cattle breed. The three individuals inside this haplogroup belong to the Q1 subhaplogroup and have seven polymorphisms in the non-coding region. These Q1 lineages have at least the same age as other six lineages found in Italy and another one found in Egypt, and they are to date the oldest lineages of the Q haplogroup.
3. The characterization of maternal lineages of the two varieties of Latxa sheep breed, autochthonous from the Basque Country, has demonstrated a high haplotype diversity but a low haplogroup diversity, belonging most of the lineages to B haplogroup, the most common European haplogroup.
4. Two individuals from Latxa breed, one of each variety, present an extra 75/76 bp tandem repeat motif, present only in the 0.3% of the worldwide ovine population. This 75/76 bp repeat motif is located inside a region probably related with the replication and transcription of mtDNA. The expression of *COI*, *cyt b*, *ND1* and *ND2* mitochondrial genes have indicated that variation in the number of repeats do not influence the mitochondrial gene expression.
5. The study of the mtDNA control region and *cyt b* gene in the archaeological bovine and ovine samples represents the first genetic study of ancient DNA in this kind of ancient remains from the Basque Country. Despite the difficulty of analyzing these ancient remains, a 78.5% of success was reached in the analysis of both the mtDNA control region and *cyt b* gene.



6. Species identification by *cyt b* gene from 2,000, 4,000 and 7,000 years old ancient samples has shown the presence of the domestic species *Bos taurus* and *Ovis aries*, which reveals the presence of the Neolithic in the Basque Country. Moreover, data comparison between ancient and modern Basque autochthonous breeds suggests a genetic continuity between these ancient and modern individuals.
7. The finding of a Caprinae individual with a *cyt b* sequence different from the sequence of any sheep or goat species known nowadays seems to point out that this individual may belong to an extinct species.
8. *Cyt b* primers, L15601 and H15748, designed in the present work, generate a 148 bp amplicon especially conceived to amplify degraded DNA. These primers have shown the capability to amplify DNA in 63 animal species from 38 Families, 14 Orders and 5 Classes (Mammals, Birds, Reptiles, Actinopterygii and Malacostraca). This wide species amplification capacity demonstrates the characteristics of universality of this primer pair.
9. *Cyt b* universal primers L15601 and H15748 are useful for its application in the HRM technology and therefore are of interest for the screening based on melting curves. This methodology has been applied to establish a panel of eight common meat species, five mammals and three birds, and its high efficiency of species discrimination has been verified. This methodology has also shown his usefulness for the screening of meat sample mixtures, since it allowed the discrimination of the species in all the mixture cases, as well as the approximated percentage of each species DNA in the mixture.

10. Universal *cyt b* primers L15601 and H15748 have also been used with the HRM technology as a screening methodology of big game species and two phylogenetically close domestic species; dog-wolf (*Canis lupus - Canis lupus familiaris*) and pig-wild boar (*Sus scrofa – Sus scrofa domestica*). It has been proven that this method is capable of differentiating between the seven big game and domestic species included in the panel, being a useful and low cost methodology for the proper use and management of big game species.

## 7. Bibliografía







## Bibliografía

- Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E. & Carelli V. (2004) The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *The American Journal of Human Genetics* **75**, 910-8.
- Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., Al-Zahery N., Accetturo M., Pala M., Kashani B.H. & Perego U.A. (2008) Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology* **18**, R157-R8.
- Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusa A., Pala M., Kashani B.H., Perego U.A., Ajmone-Marsan P., Liotta L. & Semino O. (2009) The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One* **4**, e5753.
- Ajmone-Marsan P., Garcia J.F. & Lenstra J.A. (2010) On the origin of cattle: how aurochs became cattle and colonized the world. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* **19**, 148-57.
- Alfonso-Sánchez M.A., Cardoso S., Martínez-Bouzas C., Pena J.A., Herrera R.J., Castro A., Fernández-Fernández I. & De Pancorbo M.M. (2008) Mitochondrial DNA haplogroup diversity in Basques: a reassessment based on HVI and HVII polymorphisms. *American Journal of Human Biology* **20**, 154-64.
- Ali M.E., Kashif M., Uddin K., Hashim U., Mustafa S. & Man Y.B.C. (2012) Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Analytical Methods* **5**, 935-55.
- Ali M.E., Razzak M.A. & Hamid S.B.A. (2014) Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review. *Food Analytical Methods* **7**, 1933-49.
- Altmann R. (1890) Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zuden Zellen, 145 S. *Leipzig, Veit and Company*.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-10.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-402.
- Altuna, J. (1974). Hallazgo de un uro (*Bos prigmenius* Boj.) en la sierra de Gibujo (Alava), estudio de su esqueleto y de la fauna asociada al mismo. *Munibe (Antropología-Arkeología)*, **26**, 27-51.
- Amendt J., Krettek R. & Zehner R. (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften* **91**, 51-65.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R. & Young I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-65.
- Anderson S., De Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F. & Young I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of molecular biology* **156**, 683-717.
- Anderung C., Bouwman A., Persson P., Carretero J.M., Ortega A.I., Elburg R., Smith C., Arsuaga J.L., Ellegren H. & Götherström A. (2005) Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated by genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8431-5.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M. & Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics* **23**, 147-147.
- Anthony D.W. (2010) *The horse, the wheel, and language: how Bronze-Age riders from the Eurasian steppes shaped the modern world*. Princeton University Press.

- Antolín F. & Jacomet S. (2015a) Wild fruit use among early farmers in the Neolithic (5400–2300 cal bc) in the north-east of the Iberian Peninsula: an intensive practice? *Vegetation History and Archaeobotany* **24**, 19-33.
- Antolín F., Jacomet S. & Buxó R. (2015b) The hard knock life. Archaeobotanical data on farming practices during the Neolithic (5400–2300 cal BC) in the NE of the Iberian Peninsula. *Journal of Archaeological Science* **61**, 90-104.
- Arbuckle B.S., Öztan A. & Gülçür S. (2009) The evolution of sheep and goat husbandry in central Anatolia. *Anthropozoologica* **44**, 129-57.
- Arbuckle B.S. (2013) The late adoption of cattle and pig husbandry in Neolithic Central Turkey. *Journal of Archaeological Science* **40**, 1805-15.
- Arif I.A., Khan H.A., Al Sadoon M. & Shobrak M. (2011) Limited efficiency of universal mini-barcode primers for DNA amplification from desert reptiles, birds and mammals. *Genet Mol Res* **10**, 3559-64.
- Armstrong K.F. & Ball S.L. (2005) DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **360**, 1813-23.
- Arranz J.J., Bayon Y. & San Primitivo F. (2001) Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Research* **39**, 3-10.
- Arslan A., Ilhak I., Calicioglu M. & Karahan M. (2005) Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *Journal of Muscle Foods* **16**, 37-45.
- Asensio L., González I., García T. & Martín R. (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* **19**, 1-8.
- Aubert H. (1853) Ueber die eigenthümliche Structur der Thorazmuskeln der Insekten. *Z. wiss. Zool* **4**, 388-99.
- Awadalla P., Eyre-Walker A. & Smith J.M. (1999) Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* **286**, 2524-5.
- Axelsson E., Ratnakumar A., Arendt M.-L., Maqbool K., Webster M.T., Perloski M., Liberg O., Arnemo J.M., Hedhammar Å. & Lindblad-Toh K. (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* **495**, 360-4.
- Ayaz Y., Ayaz N.D. & Erol I. (2006) Detection of species in meat and meat products using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods* **17**, 214-20.
- Balázs G., Weise C., Rozycki C., Opialla T., Sawada S., Zagon J. & Lampen A. (2011) Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. *Analytica chimica acta* **693**, 89-99.
- Bandelt H.-J., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* **16**, 37-48.
- Bandelt H.-J., Kong Q.-P., Parson W. & Salas A. (2005) More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA? *Journal of medical genetics* **42**, 957-60.
- Barr C.M., Neiman M. & Taylor D.R. (2005) Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist* **168**, 39-50.
- Bataille M., Crainic K., Leterreux M., Durigon M. & de Mazancourt P. (1999) Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic science international* **99**, 165-70.
- Beja-Pereira A., Alexandrino P., Bessa I., Carretero Y., Dunner S., Ferrand N., Jordana J., Laloe D., Moazami-Goudarzi K. & Sanchez A. (2003) Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and



- biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity* **94**, 243-50.
- Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S. & Lari M. (2006) The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8113-8.
- Benda C. (1898) Ueber die spermatogenese der vertebraten und höherer evertebraten, II. Theil: Die histiogenese der spermien. *Arch Anat Physiol* **73**, 393-8.
- Benecke N. & von den Driesch A. (2003) Horse exploitation in the Kazakh steppes during the Eneolithic and Bronze Age. *Prehistoric steppe adaptation and the horse*, 69-82.
- Berger B. & Eichmann C. (2007) Forensic canine STR analysis. *Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications*, 45.
- Bogenhagen D.F. (1999) Repair of mtDNA in vertebrates. *The American Journal of Human Genetics* **64**, 1276-81.
- Boletín oficial del estado (BOE), España. BOE núm.65. (1988). Pág.8318-8321. BOE-A-1988-6862.
- Boletín oficial del estado (BOE), España. BOE núm.23. (2009). Pág.9211-9242. BOE-A-2009-1312.
- Boletín oficial del estado (BOE), España. BOE núm.39. (2012). Pág.13452-13455. BOE-A-2012-2254.
- Boletín oficial del País Vasco (BOPV). BOPV núm. 14. (2001). Pág.1080-1087. BOPV- 2002/00429
- Boletín oficial del País Vasco (BOPV). BOPV núm. 110. (2015). Pág.1-16. BOPV- 2015/02621
- Bollongino R., Edwards C.J., Alt K.W., Burger J. & Bradley D.G. (2006) Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA. *Biology letters* **2**, 155-9.
- Bollongino R., Burger J., Powell A., Mashkour M., Vigne J.-D. & Thomas M.G. (2012) Modern taurine cattle descended from small number of Near-Eastern founders. *Molecular biology and evolution*, mss092.
- Bonfiglio S., Achilli A., Olivieri A., Negrini R., Colli L., Liotta L., Ajmone-Marsan P., Torroni A. & Ferretti L. (2010) The enigmatic origin of bovine mtDNA haplogroup R: sporadic interbreeding or an independent event of *Bos primigenius* domestication in Italy? *PLoS One* **5**, e15760.
- Bowmaker M., Yang M.Y., Yasukawa T., Reyes A., Jacobs H.T., Huberman J.A. & Holt I.J. (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50961-9.
- Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P. & Loftus R.T. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 5131-5.
- Brown W.M., George M. & Wilson A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 1967-71.
- Brown W.M. (1980) Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 3605-9.
- Brown T.A., Cecconi C., Tkachuk A.N., Bustamante C. & Clayton D.A. (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes & development* **19**, 2466-76.
- Brown T.A. & Clayton D.A. (2006) Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA. *Cell Cycle* **5**, 917-21.
- Bruford M.W., Bradley D.G. & Luikart G. (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication.

- Nature Reviews Genetics* **4**, 900-10.
- Buddhakosai W., Sukmak M., Klinsawat W., Duangchantrasiri S., Simcharoen A., Siriaroonrat B. & Wajjwalku W. (2014) Discrimination of tiger using a novel high resolution melting (HRM) and multiplex SNP-specific HRM (MSS-HRM) technique. *Forensic Science International: Genetics* **13**, 30-3.
- Budiansky S. (1992) *The Covenant of the Wild: Why Animals Chose Domestication: with a New Preface*. Yale University Press.
- Butler J.M. (2011) *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Academic Press.
- Cai D.W., Han L., Zhang X.-L., Zhou H. & Zhu H. (2007) DNA analysis of archaeological sheep remains from China. *Journal of Archaeological Science* **34**, 1347-55.
- Cann R.L., Stoneking M. & Wilson A.C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* **325**, 31-6.
- Carvajal-Carmona L.G., Bermudez N., Olivera-Angel M., Estrada L., Ossa J., Bedoya G. & Ruiz-Linares A. (2003) Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics* **165**, 1457-63.
- Chen X.J. & Butow R.A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Reviews Genetics* **6**, 815-25.
- Chinnery P.F. & Schon E.A. (2003) Mitochondria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **74**, 1188-99.
- Chinnery P.F. (2014) Mitochondrial disorders overview.
- Clayton D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693-705.
- Clayton D.A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology* **7**, 453-78.
- Clutton-Brock J. (1995) Origins of the dog: domestication and early history. *The domestic dog: Its evolution, behaviour and interactions with people*, 7-20.
- Clutton-Brock J. (1999) *A natural history of domesticated mammals*. Cambridge University Press.
- Cohen B.H. (2010) Pharmacologic effects on mitochondrial function. *Developmental disabilities research reviews* **16**, 189-99.
- Conolly J., Colledge S., Dobney K., Vigne J.-D., Peters J., Stopp B., Manning K. & Shennan S. (2011) Meta-analysis of zooarchaeological data from SW Asia and SE Europe provides insight into the origins and spread of animal husbandry. *Journal of Archaeological Science* **38**, 538-45.
- Crews S., Ojala D., Posakony J., Nishiguchi J., Attardi G., Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L. & Montoya J. (1979) Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA. *Nature* **277**, 192-8.
- Cucchi T., Hulme-Beaman A., Yuan J. & Dobney K. (2011) Early Neolithic pig domestication at Jiahu, Henan Province, China: clues from molar shape analyses using geometric morphometric approaches. *Journal of Archaeological Science* **38**, 11-22.
- Currat M., Ruedi M., Petit R.J. & Excoffier L. (2008) The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* **62**, 1908-20.
- Cymbron T., Loftus R.T., Malheiro M.I. & Bradley D.G. (1999) Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **266**, 597-603.
- Davila J.I., Arrieta-Montiel M.P., Wamboldt Y., Cao J., Hagmann J., Shedje V., Xu Y.-Z., Weigel D. & Mackenzie S.A.

- (2011) Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in Arabidopsis. *BMC biology* **9**, 1.
- Dawnay N., Ogden R., Wetton J.H., Thorpe R.S. & McEwing R. (2009) Genetic data from 28 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in 6 bird of prey species. *Forensic Science International: Genetics* **3**, e63-e9.
- De Vos C.J. & Heres L. (2009) The BSE risk of processing meat and bone meal in nonruminant feed: a quantitative assessment for the Netherlands. *Risk Analysis* **29**, 541-57.
- Deagle B.E., Eveson J.P. & Jarman S.N. (2006) Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology* **3**, 1.
- Demirci S., Baştanlar E.K., Dağtaş N.D., Pişkin E., Engin A., Özer F., Yüncü E., Doğan Ş.A. & Togan İ. (2013) Mitochondrial DNA diversity of modern, ancient and wild sheep (*Ovis gmelinii anatolica*) from Turkey: New insights on the evolutionary history of sheep. *PLoS one* **8**, e81952.
- Denaro M., Blanc H., Johnson M.J., Chen K.H., Wilmsen E., Cavalli-Sforza L.L. & Wallace D.C. (1981) Ethnic variation in Hpa 1 endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 5768-72.
- Deng H., Yuan J., Song G., Wang C. & Eda M. (2014) Reexamination of the domestic chicken in ancient China. *Chinese archaeology* **14**, 189-93.
- Diamond J. (1999) *Guns, germs, and steel: The fates of human societies*. WW Norton & Company.
- Diamond J. (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* **418**, 700-7.
- Drucker A.G., Gomez V. & Anderson S. (2001) The economic valuation of farm animal genetic resources: a survey of available methods. *Ecological Economics* **36**, 1-18.
- Druml B. & Cichna-Markl M. (2014) High resolution melting (HRM) analysis of DNA—its role and potential in food analysis. *Food chemistry* **158**, 245-54.
- Dubey B., Meganathan P.R. & Haque I. (2011) DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species. *Forensic Science International: Genetics* **5**, 181-4.
- Edwards C.J., Bollongino R., Scheu A., Chamberlain A., Tresset A., Vigne J.-D., Baird J.F., Larson G., Ho S.Y.W. & Heupink T.H. (2007) Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **274**, 1377-85.
- Edwards C.J., Magee D.A., Park S.D.E., McGettigan P.A., Lohan A.J., Murphy A., Finlay E.K., Shapiro B., Chamberlain A.T. & Richards M.B. (2010) A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS One* **5**, e9255.
- Endicott P., Ho S.Y.W., Metspalu M. & Stringer C. (2009) Evaluating the mitochondrial timescale of human evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 515-21.
- Eo S.H. & DeWoody J.A. (2010) Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **277**, 3587-92.
- European Commission. Directive 2001/101/EC of 26 November 2001 amending Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Communities L, 310 (2001), 19–21

- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* **1**, 47.
- Eyre-Walker A., Smith N.H. & Smith J.M. (1999) How clonal are human mitochondria? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **266**, 477-83.
- Falkenberg M., Larsson N.-G. & Gustafsson C.M. (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 679-99.
- Fernández M.G. (2002) Las razas de ganado autóctonas vascas en el pastoreo vaso. *Annals del Centre d'Estudis Comarcals del Ripollès*, 279-90.
- Filosto M., Mancuso M., Vives-Bauza C., Vilà M.R., Shanske S., Hirano M., Andreu A.L. & DiMauro S. (2003) Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Annals of neurology* **54**, 524-6.
- Finnilä S., Lehtonen M.S. & Majamaa K. (2001) Phylogenetic network for European mtDNA. *The American Journal of Human Genetics* **68**, 1475-84.
- Flad R.K., 袁靖YuanJing & 李水城LiShuicheng (2007) Zooarcheological evidence for animal domestication in northwest China. *Developments in Quaternary Sciences* **9**, 167-203.
- Flemming W. (1882) *Zellsubstanz, kern und zelltheilung*. Vogel.
- Fuller D.Q. (2006) Agricultural origins and frontiers in South Asia: a working synthesis. *Journal of World Prehistory* **20**, 1-86.
- Fuller D.Q. & Qin L. (2013) Declining oaks, increasing artistry, and cultivating rice: The environmental and social context of the emergence of farming in the Lower Yangtze Region. *Environmental Archaeology*.
- Gallardo E., Narváez-Rivas M., Pablos F., Jurado J.M. & León-Camacho M. (2012) Subcutaneous fat triacylglycerols profile from Iberian pigs as a tool to differentiate between intensive and extensive fattening systems. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 1645-51.
- Galton F. (1865) The first steps towards the domestication of animals. *Transactions of the Ethnological Society of London* **3**, 122-38.
- Gautier A. (2002) The evidence for the earliest livestock in North Africa: or adventures with large bovids, ovicaprids, dogs and pigs. In: *Droughts, Food and Culture* (pp. 195-207. Springer.
- Geigl E.M. (2002) On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* **44**, 337-42.
- Gerbault P. (2013) The onset of lactase persistence in Europe. *Hum Hered* **76**, 154-61.
- GilArriortua M., Bordas M.I.S., Cainé L.M., Pinheiro F. & Pancorbo M.M. (2013) Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic science international* **228**, 132-6.
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M. & Wallace D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences* **77**, 6715-9.
- Ginja C., Penedo M.C.T., Melucci L., Quiroz J., Martinez Lopez O.R., Revidatti M.A., Martínez-Martínez A., Delgado J.V. & Gama L.T. (2010) Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal Genetics* **41**, 128-41.
- Gómez, M. (1997). Conservación de recursos genéticos domésticos en Euskadi.

- Gomez M. & Amezcaga I. (2003) Conservation of livestock genetic resources in Euskadi (Basque Country). *Animal genetic resources information* **33**, 41-56.
- Good I. (2011) Strands of connectivity: assessing the evidence for long distance exchange of silk in later Prehistoric Eurasia. *Interweaving Worlds: Systematic Interactions in Eurasia, 7th to 1st Millennia BC*, 218-30.
- Goto H., Ryder O.A., Fisher A.R., Schultz B., Pond S.L.K., Nekrutenko A. & Makova K.D. (2011) A massively parallel sequencing approach uncovers ancient origins and high genetic variability of endangered Przewalski's horses. *Genome biology and evolution* **3**, 1096-106.
- Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**, 221-4.
- Goñalons G.L.M. (2008) Camelids in ancient Andean societies: A review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International* **185**, 59-68.
- Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C., Bradley D.G. & Ellegren H. (2005) Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**, 2345-51.
- Guha S. & Kashyap V.K. (2005) Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16s rRNA gene for identification of seven pecora species. *BMC genetics* **6**, 1.
- Guo J., Du L.X., Ma Y.H., Guan W.J., Li H.B., Zhao Q.J., Li X. & Rao S.Q. (2005) A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* **36**, 331-6.
- Gupta S.K., Kumar A., Hussain S.A. & Singh L. (2013) Cytochrome b based genetic differentiation of Indian wild pig (*Sus scrofa cristatus*) and domestic pig (*Sus scrofa domestica*) and its use in wildlife forensics. *Science & Justice* **53**, 220-2.
- Hagelberg E., Goldman N., Lio P., Whelan S., Schiefenhöel W., Clegg J.B. & Bowden D.K. (1999) Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **266**, 485-92.
- Hajibabaei M., Ivanova N.V., Ratnasingham S., Dooh R.T., Kirk S.L., Mackie P.M. & Hebert P.D.N. (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1959-67.
- Hajibabaei M., Smith M., Janzen D.H., Rodriguez J.J., Whitfield J.B. & Hebert P.D.N. (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* **6**, 959-64.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Clare E.L. & Hebert P.D.N. (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC biology* **5**, 1.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001) Paleontological Statistics Software: Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*.
- Hart F.L. (1952) History of the Adulteration of Food before 1906, A. *Food Drug Cosm. LJ* **7**, 5.
- Hart B.L. (1985) *The behavior of domestic animals*. WH Freeman & Co.
- Hauswirth W.W. & Laipis P.J. (1985) Transmission genetics of mammalian mitochondria: a molecular model and experimental evidence. *Achievements and perspectives of mitochondrial research* **2**, 49-59.
- Hawkins M.T.R., Helgen K.M., Maldonado J.E., Rockwood L.L., Tsuchiya M.T.N. & Leonard J.A. (2016) Phylogeny, biogeography and systematic revision of plain long-nosed squirrels (genus *Dremomys*, Nannosciurinae). *Molecular phylogenetics and evolution* **94**, 752-64.

- Hebert P.D.N., Cywinska A. & Ball S.L. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, 313-21.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S. & Francis C.M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* **2**, e312.
- Helentjaris, T. (2013). Use of RFLPs Analysis to Improve Food Quality. *Biotechnology and Food Quality: Proceedings of the First International Symposium* 239.
- Helmer D., Gourichon L., Monchot H., Peters J. & Segui M.S. (2005) *Identifying early domestic cattle from Pre-Pottery Neolithic sites on the Middle Euphrates using sexual dimorphism*. na.
- Helmer D. & Gourichon L. (2008) Premières données sur les modalités de subsistance à Tell Aswad (Syrie, PPNB moyen et récent, Néolithique céramique ancien)–Fouilles 2001-2005. *Travaux de la Maison de l'Orient et de la Méditerranée* **49**, 119-51.
- Henle J. (1841) Allgemeine anatomie. *Leipzig: Voss*.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R. & Janke A. (1998a) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution* **47**, 441-8.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. & Lewalski H. (1998b) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity* **89**, 113-20.
- Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R. & Janke A. (2002) Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**, 893-904.
- Holt I.J., Lorimer H.E. & Jacobs H.T. (2000) Coupled leading-and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515-24.
- Hongo H., Meadow R.H., Öksüz B., Ilgezdi G., Buitenhuis H., Choyke A., Martin L., Bartosiewicz L. & Mashkour M. Sheep and goat remains from Çayönü Tepesi, Southeastern Anatolia. pp. 112-23.
- Hongo H., Pearson J., Öksüz B. & Ilgezdi G. (2009) The process of ungulate domestication at Cayönü, Southeastern Turkey: a multidisciplinary approach focusing on *Bos* sp. and *Cervus elaphus*. *Anthropozoologica* **44**, 63-78.
- Horsburgh K.A., Prost S., Gosling A., Stanton J.-A., Rand C. & Matisoo-Smith E.A. (2013) The genetic diversity of the Nguni breed of African Cattle (*Bos* spp.): complete mitochondrial genomes of haplogroup T1. *PLoS one* **8**, e71956.
- Hsieh H.-M., Chiang H.-L., Tsai L.-C., Lai S.-Y., Huang N.-E., Linacre A. & Lee J.C.-I. (2001) Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International* **122**, 7-18.
- Ingman M., Kaessmann H., PaëÈbo S. & Gyllensten U. (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**, 708-13.
- Jansen R.P.S. & de Boer K. (1998) The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and cellular endocrinology* **145**, 81-8.
- Johnson R.N., Wilson-Wilde L. & Linacre A. (2014) Current and future directions of DNA in wildlife forensic science. *Forensic Science International: Genetics* **10**, 1-11.
- Jonker K.M., Tilburg J., Hägele G.H. & De Boer E. (2008) Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and contaminants* **25**, 527-33.

- Kantanen J., Edwards C.J., Bradley D.G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Kiselyova T., Činkulov M., Popov R. & Stojanović S. (2009) Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity* **103**, 404-15.
- Karlsson A.O. & Holmlund G. (2007) Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic science international* **173**, 16-20.
- Kim J.-H., Byun M.J., Kim M.-J., Suh S.W., Kim Y.-S., Ko Y.-G., Kim S.W., Jung K.-S., Kim D.-H. & Choi S.-B. (2013) Phylogenetic analysis of Korean black cattle Based on the Mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Life Science* **23**, 24-30.
- Kivisild T. & Villems R. (2000) Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* **288**, 1931-1931.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X. & Wilson A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 6196-200.
- Kong Q.-P., Yao Y.-G., Sun C., Bandelt H.-J., Zhu C.-L. & Zhang Y.-P. (2003) Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *The American Journal of Human Genetics* **73**, 671-6.
- Kraytsberg Y., Schwartz M., Brown T.A., Ebralidse K., Kunz W.S., Clayton D.A., Vissing J. & Khrapko K. (2004) Recombination of human mitochondrial DNA. *Science* **304**, 981-981.
- Kumar D., Singh S.P., Karabasanavar N.S., Singh R. & Umapathi V. (2014) Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cytb gene. *J Food Sci Technol* **51**, 3458-63.
- Kurosaki K., Matsushita T. & Ueda S. (1993) Individual DNA identification from ancient human remains. *American journal of human genetics* **53**, 638.
- Lamers R., Hayter S. & Matheson C.D. (2009) Postmortem miscoding lesions in sequence analysis of human ancient mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution* **68**, 40-55.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A. & Lopez R. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* **23**, 2947-8.
- Larson G., Piperno D.R., Allaby R.G., Purugganan M.D., Andersson L., Arroyo-Kalin M., Barton L., Vigueira C.C., Denham T. & Dobney K. (2014) Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 6139-46.
- Lauzurica J., Gomez M. (1999).The Terreña bovine race. *Naturzale*. **14**, 101-104
- Legge T. (1996) The beginning of caprine domestication in Southwest Asia. *The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia*, 238-62.
- Lenstra J.A., Ajmone-Marsan P., Beja-Pereira A., Bollongino R., Bradley D.G., Colli L., De Gaetano A., Edwards C.J., Feliu M. & Ferretti L. (2014) Meta-analysis of mitochondrial DNA reveals several population bottlenecks during worldwide migrations of cattle. *Diversity* **6**, 178-87.
- Li X., Cai J.F., Guo Y.D., Wu K.L., Wang J.F., Liu Q.L., Wang X.H., Chang Y.F., Yang L. & Lan L.M. (2010) The availability of 16S rRNA for the identification of forensically important flies (Diptera: Muscidae) in China. *Tropical Biomedicine* **27**, 155-66.
- Linacre A. & Tobe S.S. (2011) An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative genetics* **2**, 1.



- Loftus, R. and Scherf, B.D. (1993). Word watch list for domestic animal diversity. Food and Animal Organization of the United Nations. Rome. First edition.
- Lopez-Oceja A., Gamarra D., Borrigan S., Jiménez-Moreno S. & de Pancorbo M.M. (2016) New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics* **23**, 159-65.
- Lopez-Oceja A., Gamarra D., Jiménez-Moreno S. & de Pancorbo M.M. (2015) Identification of big game species by a universal cytochrome B primer pair through High-Resolution Melting. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* **5**, e116-e7.
- Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Castañón P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L. & Malaspinas A.-S. (2009) Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* **324**, 485-485.
- Luff R. (2000) Ducks. *Cambridge World History of Food*, 517-24.
- MacDonald K.C. (2000) The origins of African livestock: Indigenous or imported? *The origins and development of African livestock: Archaeology, genetics, linguistics and ethnography*, 2-17.
- Magee D.A., MacHugh D.E. & Edwards C.J. (2014) Interrogation of modern and ancient genomes reveals the complex domestic history of cattle. *Animal Frontiers* **4**, 7-22.
- Magliano A. Elementos de tipología animal. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* **2**, 178-86.
- Mahajan, M.V., Gadekar, Y.P., Dighe, V.D., Kokane, R.D., Bannaliker, A.S. (2011) Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene. *Meat science* **88**, 23-7.
- Malewski T., Draber-Mońko A., Pomorski J., Łoś M. & Bogdanowicz W. (2010) Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. *International journal of legal medicine* **124**, 277-85.
- Manchekar M., Scissum-Gunn K., Song D., Khazi F., McLean S.L. & Nielsen B.L. (2006) DNA recombination activity in soybean mitochondria. *Journal of molecular biology* **356**, 288-99.
- Margulis L. (1976) Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Experimental parasitology* **39**, 277-349.
- Margulis L. (1985) Evolución de la célula: la célula eucariótica como comunidad microbiana. *Arbor* **120**, 13.
- Mariezkurrena, K. (1990). Caza y domesticación durante el Neolítico y Edad de los Metales en el País Vasco. *Munibe*, **42**, 241-252.
- Marshall O.J. (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **20**, 2471-2.
- Massanet M.F., Castro J.A., Picornell A. & Ramon M.M. (1997) Study of the populations of the Balearic Islands (Spain) using mtDNA RFLPs. *Human biology*, 483-98.
- Meadow R.H. (1993) Animal domestication in the Middle East: a revised view from the eastern margin. *Harappan civilization*, 295-320.
- Meadow R.H. & Patel A.K. (2002) From Mehrgarh to Harappa and Dholavira: Prehistoric Pastoralism in North-Western South Asia through the Harappan Period. *Protohistory: Archaeology of the Harappan Civilization* **2**, 391-408.
- Meadows J.R.S., Li K., Kantanen J., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Gupta V., Calvo J.H., Whan V. & Norris B. (2005) Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *Journal of Heredity* **96**, 494-501.
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E. & Kijas J.W. (2007) Five ovine mitochondrial lineages identified



- from sheep breeds of the near East. *Genetics* **175**, 1371-9.
- Meadows J.R.S., Hiendleder S. & Kijas J.W. (2011) Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity* **106**, 700-6.
- Melton T. & Holland C. (2007) Routine forensic use of the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene for species identification. *Journal of forensic sciences* **52**, 1305-7.
- Mengoni Goñalons G.L.M. & Yacobaccio H.D. (2006) The domestication of South American camelids. *Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms*, 228.
- Messia M.C., Di Falco T., Panfili G. & Marconi E. (2008) Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC–PAD analysis of 4-hydroxyproline. *Meat science* **80**, 401-9.
- Meyer M.C., Hofmann C.-C., Gemmell A.M.D., Haslinger E., Häusler H. & Wangda D. (2009) Holocene glacier fluctuations and migration of Neolithic yak pastoralists into the high valleys of northwest Bhutan. *Quaternary Science Reviews* **28**, 1217-37.
- Mirol P.M., Giovambattista G., Lirón J.P. & Dulout F.N. (2003) African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. *Heredity* **91**, 248-54.
- Mona S., Catalano G., Lari M., Larson G., Boscato P., Casoli A., Sineo L., Di Patti C., Pecchioli E. & Caramelli D. (2010) Population dynamic of the extinct European aurochs: genetic evidence of a north-south differentiation pattern and no evidence of post-glacial expansion. *BMC evolutionary biology* **10**, 1.
- Montowska M. & Pospiech E. (2011) Differences in two-dimensional gel electrophoresis patterns of skeletal muscle myosin light chain isoforms between *Bos taurus*, *Sus scrofa* and selected poultry species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 2449-56.
- Moore J.C., Spink J. & Lipp M. (2012) Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* **77**, R118-R26.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. pp. 263-73. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Muñoz-Colmenero M., Blanco O., Arias V., Martínez J.L. & García-Vázquez E. (2016) DNA Authentication of Fish Products Reveals Mislabeling Associated with Seafood Processing. *Fisheries* **41**, 128-38.
- Museum ZC (1979) The excavation of the Mound Tomb at Guoyuan of Fushan, Jurong county, Jiangsu province. *Kaogu* **2**, 113.
- Musil R. (1984) The first known domestication of wolves in central Europe. *Animals and archaeology* **4**.
- Nadler C.F., Lay D.M. & Hassinger J.D. (1971) Cytogenetic analyses of wild sheep populations in northern Iran. *Cytogenetic and Genome Research* **10**, 137-52.
- Nadler C.F. (1973a) *Cytogenetic Differentiation, Geographic Distribution, and Domestication in Palearctic Sheep (ovis)*. P. Parey.
- Nadler C.F., Hoffmann R.S. & Woolf A. (1973b) G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia* **29**, 117-9.
- Naue J., Hansmann T. & Schmidt U. (2014) High-resolution melting of 12S rRNA and cytochrome b DNA sequences for discrimination of species within distinct European animal families. *PLoS one* **9**, e115575.
- Nei M. & Tajima F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**, 145-63.
- Nobis G. (1979) Der älteste Haushund lebte vor 14,000 Jahren. *Umschau* **19**, 610.

- Noni I.d., Tirelli A., Resmini P. & Pellegrino L. (1991) [Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. 1: Application to water buffalo mozzarella cheese]. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia (Italy)*.
- Ojala D., Montoya J. & Attardi G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria.
- Oliveira R., Castro D., Godinho R., Luikart G. & Alves P.C. (2010) Species identification using a small nuclear gene fragment: application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. *Conservation Genetics* **11**, 1023-32.
- Olivieri C., Ermini L., Rizzi E., Corti G., Luciani S., Marota I., De Bellis G. & Rollo F. (2012) Phylogenetic position of a copper age sheep (*Ovis aries*) mitochondrial DNA. *PLoS one* **7**, e33792.
- Olivieri A., Gandini F., Achilli A., Fichera A., Rizzi E., Bonfiglio S., Battaglia V., Brandini S., De Gaetano A. & El-Beltagi A. (2015) Mitogenomes from Egyptian Cattle Breeds: New Clues on the Origin of Haplogroup Q and the Early Spread of *Bos taurus* from the Near East. *PLoS one* **10**, e0141170.
- Olsen S.J. (1988) The camel in ancient China and an osteology of the camel. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **140**, 18-58.
- Oms F.X., Esteve X., Mestres J., Martín P. & Martins H. (2014) La neolitización del nordeste de la Península Ibérica: datos radiocarbónicos y culturales de los asentamientos al aire libre del Penedès. *Trabajos de Prehistoria* **71**, 42-55.
- Oota H., Saitou N., Matsushita T. & Ueda S. (1995) A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *American Journal of Physical Anthropology* **98**, 133-45.
- Ortea I., Cañas B., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. & Gallardo J.M. (2009) Arginine kinase peptide mass fingerprinting as a proteomic approach for species identification and taxonomic analysis of commercially relevant shrimp species. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 5665-72.
- Osborne M.J., Christidis L. & Norman J.A. (2002) Molecular phylogenetics of the Diprotodontia (kangaroos, wombats, koala, possums, and allies). *Molecular phylogenetics and evolution* **25**, 219-28.
- Pääbo S., Gifford J.A. & Wilson A.C. (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic acids research* **16**, 9775-87.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L. & Hofreiter M. (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 645-79.
- Pappalardo A.M. & Ferrito V. (2015) DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. *Fisheries Research* **164**, 153-8.
- Park J.-K., Shin K.-H., Shin S.-C., Chung K.-Y. & Chung E.-R. (2007) Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **27**, 209-15.
- Parson W., Pegoraro K., Niederstätter H., Föger M. & Steinlechner M. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International journal of legal medicine* **114**, 23-8.
- Pascal M., Lorvelec O. & Vigne J.-D. (2006) *Invasions biologiques et extinctions: 11000 ans d'histoire des vertébrés en France*. Quae éditions.
- Passmore M., Nataatmadja M. & Fraser J.F. (2009) Selection of reference genes for normalisation of real-time RT-PCR in brain-stem death injury in *Ovis aries*. *BMC molecular biology* **10**, 1.
- Patel A.K. & Meadow R. (1998) The exploitation of wild and domestic water buffalo in prehistoric northwestern South Asia. *Archaeozoology of the Near East III*, 180-99.

- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J.-J., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F. & Bayón Y. (2005) Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**, 2211-7.
- Pedrosa S., Arranz J.-J., Brito N., Molina A., San Primitivo F. & Bayón Y. (2007) Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genetics Selection Evolution* **39**, 1.
- Pellecchia M., Negrini R., Colli L., Patrini M., Milanese E., Achilli A., Bertorelle G., Cavalli-Sforza L.L., Piazza A. & Torroni A. (2007) The mystery of Etruscan origins: novel clues from *Bos taurus* mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **274**, 1175-9.
- Pereira F., Davis S.J.M., Pereira L., McEvoy B., Bradley D.G. & Amorim A. (2006) Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 1420-6.
- Perini M., Camin F., del Pulgar J.S. & Piasentier E. (2013) Effect of origin, breeding and processing conditions on the isotope ratios of bioelements in dry-cured ham. *Food chemistry* **136**, 1543-50.
- Pesole G., Gissi C., De Chirico A. & Saccone C. (1999) Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of molecular evolution* **48**, 427-34.
- Peters J. (1997) [The dromedary: ancestry, history of domestication and medical treatment in early historic times]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere* **25**, 559-65.
- Pfeiffer I., Burger J. & Brenig B. (2004) Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC genetics* **5**, 30.
- Pita M., Casas S., Herrero J., Prada C. & García R. (2012) Game Reserves in Spain: the public management of hunting. *Forest Systems* **21**, 398-404.
- Piñero D., Barahona A., Eguiarte L., Rocha A. & Salas R. (2008) La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Conabio* **1**, 415-35.
- Prayson B.E., McMahon J.T. & Prayson R.A. (2008) Applying morphologic techniques to evaluate hotdogs: what is in the hotdogs we eat? *Annals of diagnostic pathology* **12**, 98-102.
- Preston G.W., Parker A.G., Walkington H., Leng M.J. & Hodson M.J. (2012) From nomadic herder-hunters to sedentary farmers: the relationship between climate change and ancient subsistence strategies in south-eastern Arabia. *Journal of Arid Environments* **86**, 122-30.
- Price E.O. (1984) Behavioral aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology*, 1-32.
- Primrose S., Woolfe M. & Rollinson S. (2010) Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* **21**, 582-90.
- Pun K.M., Albrecht C., Castella V. & Fumagalli L. (2009) Species identification in mammals from mixed biological samples based on mitochondrial DNA control region length polymorphism. *Electrophoresis* **30**, 1008-14.
- Quinto C.A., Tinoco R. & Hellberg R.S. (2016) DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the US commercial market. *Food Control* **59**, 386-92.
- Ramón-Laca A., Gleeson D., Yockney I., Perry M., Nugent G. & Forsyth D.M. (2014) Reliable discrimination of 10 ungulate species using high resolution melting analysis of faecal DNA. *PLoS one* **9**, e92043.
- Reed G.H. & Wittwer C.T. (2004) Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical chemistry* **50**, 1748-54.
- Richter C., Park J.-W. & Ames B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.

- Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 6465-7.
- Ripoli M.V., Corva P. & Giovambattista G. (2006) Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Research in veterinary science* **80**, 287-90.
- Rodríguez M.A., García T., González I., Asensio L., Hernández P.E. & Martín R. (2004) PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*® **67**, 172-7.
- Rojas M., González I., Pavón M.Á., Pegels N., Hernández P.E., García T. & Martín R. (2011) Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (*Tetrao urogallus*). *Forensic science international* **210**, 133-8.
- Rossel S., Marshall F., Peters J., Pilgram T., Adams M.D. & O'Connor D. (2008) Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3715-20.
- Sagan L. (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* **14**, 225-IN6.
- Sakaridis I., Ganopoulos I., Argiriou A. & Tsaftaris A. (2013) A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat science* **94**, 84-8.
- San Primitivo F., Molina Alcalá A., Pedrosa S., Arranz J.J., Brito N.V. & Bayón Y. (2007) Variabilidad del DNA mitocondrial en razas ovinas ibéricas.
- Sanchez Belda A. (1984) *Razas bovinas españolas*. Servicio de Extensión Agraria. Publicaciones.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-7.
- Sato M. & Sato K. (2013) Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1833**, 1979-84.
- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K. & Lane R. (2005) Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **360**, 1805-11.
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G. & Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**, 125-40.
- Scherf B.D. & Food and Agriculture O. (1995) *World watch list for domestic animal diversity*. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) publication. Cambridge Univ Press.
- Scherf B. D. (2000). *World watch list for domestic animal diversity* (3rd ed., pp. 44-122). FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Publication. FAO, Rome, Italy
- Scheu A., Hartz S., Schmölcke U., Tresset A., Burger J. & Bollongino R. (2008) Ancient DNA provides no evidence for independent domestication of cattle in Mesolithic Rosenhof, Northern Germany. *Journal of Archaeological Science* **35**, 1257-64.
- Schneider P.M., Bender K., Mayr W.R., Parson W., Hoste B., Decorte R., Cordonnier J., Vanek D., Morling N. & Karjalainen M. (2004) STR analysis of artificially degraded DNA—results of a collaborative European exercise. *Forensic science international* **139**, 123-34.
- Schwartz M. & Vissing J. (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine* **347**, 576-80.

- Sentandreu M.A. & Sentandreu E. (2011) Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat science* **89**, 280-5.
- Sentandreu M.Á. & Sentandreu E. (2014) Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International* **60**, 19-29.
- Shadel G.S. & Clayton D.A. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual review of biochemistry* **66**, 409-35.
- Shokralla S., Zhou X., Janzen D.H., Hallwachs W., Landry J.-F., Jacobus L.M. & Hajibabaei M. (2011) Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One* **6**, e21252.
- Shuster R.C., Rubenstein A.J. & Wallace D.C. (1988) Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochemical and biophysical research communications* **155**, 1360-5.
- Skare Ø., Sheehan N. & Egeland T. (2009) Identification of distant family relationships. *Bioinformatics* **25**, 2376-82.
- Sogin M.L. & Silberman J.D. (1998) Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International journal for parasitology* **28**, 11-20.
- Stahl P.W., Muse M.C. & Delgado-Espinoza F. (2006) New evidence for pre-Columbian Muscovy Duck *Cairina moschata* from Ecuador. *Ibis* **148**, 657-63.
- Stahl P.W. (2008) Animal domestication in South America. In: *The handbook of South American archaeology* (pp. 121-30). Springer.
- Stock F., Edwards C.J., Bollongino R., Finlay E.K., Burger J. & Bradley D.G. (2009) Cytochrome b sequences of ancient cattle and wild ox support phylogenetic complexity in the ancient and modern bovine populations. *Animal genetics* **40**, 694-700.
- Sukri A., Amin M., Winaya A. & Gofur A. (2015) Substitution and Haplotype Diversity Analysis on The Partial Sequence of The Mitochondrial DNA Cyt b of Indonesian Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry* **3**.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C. & Schatten G. (1999) Development: ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**, 371-2.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C. & Schatten G. (2000) Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction* **63**, 582-90.
- Taanman J.-W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1410**, 103-23.
- Tajima F. (1993) Measurement of DNA polymorphism. *Mechanisms of molecular evolution*, 37-59.
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Činkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H. & Kantanen J. (2006) Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 1776-83.
- Teletchea F., Maudet C. & Hänni C. (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in biotechnology* **23**, 359-66.
- Terradas X., Gratuze B., Bosch J., Enrich R., Esteve X., Oms F.X. & Ribé G. (2014a) Neolithic diffusion of obsidian in the western Mediterranean: new data from Iberia. *Journal of archaeological Science* **41**, 69-78.
- Thornton E.K., Emery K.F., Steadman D.W., Speller C., Matheny R. & Yang D. (2012) Earliest Mexican Turkeys (*Meleagris gallopavo*) in the Maya region: implications for pre-hispanic animal trade and the timing of Turkey

- domestication. *PLoS One* **7**, e42630.
- Tian X., Wang J. & Cui S. (2013) Analysis of pork adulteration in minced mutton using electronic nose of metal oxide sensors. *Journal of Food Engineering* **119**, 744-9.
- Tiranti V., Savoia A., Forti F., D'Apolito M.-F., Centra M., Rocchi M. & Zeviani M. (1997) Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Human molecular genetics* **6**, 615-25.
- Tobe S.S. & Linacre A.M.T. (2008) A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* **29**, 340-7.
- Tobe S.S., Kitchener A.C. & Linacre A.M.T. (2010) Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS one* **5**, e14156.
- Torrioni A., Schurr T.G., Yang C.-C., Szathmary E.J., Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N. & Weiss K.M. (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* **130**, 153-62.
- Torrioni A., Schurr T.G., Cabell M.F., Brown M.D., Neel J.V., Larsen M., Smith D.G., Vullo C.M. & Wallace D.C. (1993) Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American journal of human genetics* **53**, 563.
- Torrioni A., Achilli A., Macaulay V., Richards M. & Bandelt H.-J. (2006) Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *TRENDS in Genetics* **22**, 339-45.
- Tres A., Van Der Veer G., Perez-Marin M.D., Van Ruth S.M. & Garrido-Varo A. (2012) Authentication of organic feed by near-infrared spectroscopy combined with chemometrics: a feasibility study. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 8129-33.
- Tresset A. & Vigne J. Substitution of species, techniques and symbols at the Mesolithic-Neolithic transition in Western Europe. p. 189. OXFORD UNIVERSITY PRESS INC.
- Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C. & Bradley D.G. (2001) Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* **410**, 1088-91.
- Uerpmann H.-P. & Uerpmann M. (2002) The appearance of the domestic camel in south-east Arabia. *Journal of Oman Studies* **12**, 235-60.
- Unsel'd M., Beyermann B., Brandt P. & Hiesel R. (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *Genome Research* **4**, 241-3.
- Valdez R., Nadler C.F. & Bunch T.D. (1978) Evolution of wild sheep in Iran. *Evolution*, 56-72.
- Van Vuure T. (2002) HISTORY, MORPHOLOGY AND ECOLOGY OF THE AUROCHS (BOS PRIMIGENIUS).
- Vawter L. & Brown W.M. (1986) Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* **234**, 194-6.
- Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawkes K. & Wilson A.C. (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* **253**, 1503-7.
- Vigne J.-D., Carrere I., Briois F. & Guilaine J. (2011) The early process of mammal domestication in the Near East. *Current Anthropology* **52**, S255-S71.
- Vorontsov N.N., Korobitsyna K.V., Nadler C.F., Hofman R., Sapozhnikov G.N. & Gorelow J.K. (1972) Chromossomi dikich baranow i proiskhzhdenie domashnikh ovets. *Priroda, Moscow* **3**, 74-82.

- Wandeler P., Hoeck P.E.A. & Keller L.F. (2007) Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 634-42.
- Wang H.-C., Lee S.-H., Chang T.-J. & Wong M.-L. (2004) Examination of Meat Components in Commercial Dog and Cat Food by Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLPs) Technique. *Journal of veterinary medical science* **66**, 855-9.
- Wang X., Ma Y.H., Chen H. & Guan W.J. (2007) Genetic and phylogenetic studies of Chinese native sheep breeds (*Ovis aries*) based on mtDNA D-loop sequences. *Small Ruminant Research* **72**, 232-6.
- Wang L. (2010) Deoxynucleoside salvage enzymes and tissue specific mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **29**, 370-81.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R. & Hebert P.D.N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **360**, 1847-57.
- Wayne R.K. (2012) Evolutionary genomics of dog domestication. *Mammalian Genome* **23**, 3-18.
- Wei Y.-L., Qin C.-J., Dong H., Jia J. & Li C.-X. (2014) A validation study of a multiplex INDEL assay for forensic use in four Chinese populations. *Forensic Science International: Genetics* **9**, e22-e5.
- Whitfield J.B. (1999) Destructive sampling and information management in molecular systematic research: an entomological perspective. *Managing the modern herbarium: An interdisciplinary approach*, 301-14.
- Wilhelm J. & Pingoud A. (2003) Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* **4**, 1120-8.
- Wood N.J. & Phua S.H. (1996) Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* **27**, 25-33.
- Wu S.-B., Wirthensohn M.G., Hunt P., Gibson J.P. & Sedgley M. (2008) High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1-14.
- Xie J., Zhu W., Zhou Y., Liu Z., Chen Y. & Zhao Z. (2015) Identification of mammalian species using the short and highly variable regions of mitochondrial DNA. *Mitochondrial DNA* **26**, 550-4.
- Yao Y.-G., Bandelt H.-J. & Young N.S. (2007) External contamination in single cell mtDNA analysis. *PLoS One* **2**, e681.
- Youle R.J. & Van Der Blik A.M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062-5.
- Zang R., Bai J., Xu H., Zhang L., Yang J., Yang L., Lu J. & Wu J. (2011) Selection of suitable reference genes for real-time quantitative PCR studies in Lanzhou fat-tailed sheep (*Ovis aries*). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* **6**, 789-804.
- Zeder M.A. (2008) Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the national Academy of Sciences* **105**, 11597-604.
- Zehner R., Zimmermann S. & Mebs D. (1998) RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International journal of legal medicine* **111**, 323-7.
- Zeuner F.E. (1963) A history of domesticated animals. *A history of domesticated animals*.
- Zhou J., Liu L. & Chen J. (2010) Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Candida glabrata* after mitochondrial transformation. *Eukaryotic cell* **9**, 806-14.
- Zouros E. (2013) Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology* **40**, 1-31.
- Zsurka G., Kraytsberg Y., Kudina T., Kornblum C., Elger C.E., Khrapko K. & Kunz W.S. (2005) Recombination of



mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy. *Nature genetics* **37**, 873-7.

### Paginas Web

ASAPI: <http://razapirenaica.com/inicio>

Barcode of Life Database (BOLD): <http://www.boldsystems.org/index.php/databases>

CITES: <https://cites.org/esp/disc/what.php>

Chromas Pro software:: <http://www.technelysium.com.au/Chromas Pro.html>

CONFELAC: <http://www.confelac.com/es/razas/latxa>

Euskal Abereak: <http://www.euskalabereak.net/es/terrena>

FAO: <http://www.fao.org/docrep/004/y1100m/y1100m09.htm>

FAO: <http://www.fao.org/docrep/017/i3138e/i3138e09.pdf>

FigTree software: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Epidemiologiamolecular: [http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2012/11/clip\\_image01041.png](http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2012/11/clip_image01041.png)

DNA rainbow: <http://www.dna-rainbow.org/species-comparison/>

MAGRAMA Convenio de Berna: <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/convenios-internacionales/ce-conv-int-berna.aspx>

MAGRAMA Pirenaica: <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/pirenaica/iframe-ejemplo-arca.aspx>

MAGRAMA Terrena: <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/bovino/terrena/iframe-ejemplo-arca.aspx>

MAGRAMA Latxa: <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/ovino/latxa/iframe-ejemplo-arca.aspx>

MAGRAMA Latxa 2: [http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/caminos-naturales/se-ndapastoreo3de3\\_tcm7-307841.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/caminos-naturales/se-ndapastoreo3de3_tcm7-307841.pdf) Pag. 111

Nekanet: [http://www.nekanet.net/razas/latxa\\_c.htm](http://www.nekanet.net/razas/latxa_c.htm)





## **Anexo I - Difusión de resultados**



## Difusión de resultados

### **Grupo 1: Linajes maternos de bóvidos y óvidos prehistóricos y actuales del País Vasco..**

Estudio 1: Lopez-Oceja, A., Muro-Verde, A., Gamarra, D., Cardoso, S., & de Pancorbo, M. M. (2016). New Q lineage found in bovine (*Bos taurus*) of Iberian Peninsula. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(5), 3597-3601.

Estudio 2: Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Cardoso, S., Palencia-Madrid, L., Juste, R.A., De Pancorbo, M.M. “Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps (*Ovis aries*) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence”. *Electrophoresis Journal* (en revisión)

Estudio 3: Lopez-Oceja A.1, Cardoso S.1, Palencia L.1, Castaños P.2, Mugika J.3, Fernández Eraso J.3, de Pancorbo M.M. “Determinación de especie y linajes maternos de restos prehistóricos bovinos y oviscaprinos del País Vasco.”

### **Grupo 2: Identificación y *screening* de especies mediante el desarrollo de una nueva pareja de cebadores universales situados en el gen *cyt b*.**

Estudio 4: Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Borragan, S., Jiménez-Moreno, S., & de Pancorbo, M. M. (2016). New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 159-165.

Estudio 5: Lopez-Oceja A., Gamarra D., Nuñez C., Baeta M., de Pancorbo M.M. “Identification of species in meat food products: a new *screening* method based on high resolution melting real time PCR of *cyt b* gene”. *Food Chemistry* (en revisión)

Estudio 6: Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Jiménez-Moreno, S., & de Pancorbo, M. M. (2015). Identification of big game species by a universal cytochrome B primer pair through High-Resolution Melting. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e116-e117.

## RESEARCH ARTICLE

## New Q lineage found in bovine (*Bos taurus*) of Iberian Peninsula

Andres Lopez-Oceja, Amara Muro-Verde, David Gamarra, Sergio Cardoso, and Marian M. de Pancorbo,

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain

### Abstract

The northern Iberian Peninsula is home to a variety of autochthonous cattle breeds, such as the Terrena and Pirenaica. With the objective of characterizing the matrilineal lineages of these breeds, a study of mitochondrial DNA was performed. The D-loop of 155 individuals was analyzed and most of the individuals were carriers of the T3 haplogroup, while haplogroups T and T1 were much less frequent. A Pirenaica individual belonging to the Q haplogroup was found. To verify the presence of the Q haplogroup individual, the entire mitochondrial DNA was sequenced and compared with two descendants. The individuals were assigned to the Q1 sub-haplogroup. These findings extend the geographic distribution of the Q haplogroup to the south west of the European continent. This new Q1 lineage has seven polymorphisms in the coding region, so this lineage is probably as old as the Q lineages described to date.

### Keywords

*Bos taurus*, D-loop, Iberian Peninsula, mtDNA, Q haplogroup

### History

Received 11 May 2015

Revised 21 July 2015

Accepted 29 July 2015

Published online 09 November 2015

### Introduction

The northern Iberian Peninsula presents a great variety of cattle breeds (*Bos taurus*), some of which have been declared to be native breeds. Specifically, the Basque Country, located on the Cantabrian coast, has several native breeds, with the Terrena and Pirenaica being the most highly represented.

The Terrena breed is only used in extensive farming and constitutes a small population that is composed of approximately 2000 individuals. Similar to other Iberian native breeds (Beja-Pereira et al., 2003), the Terrena has had a dramatic loss in economic importance and has, therefore, suffered a major loss of population size. Accordingly, Terrena is listed as an endangered native breed by both the Spanish government (BOE, 2012) and FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) and was included in the World Watch List – For domestic animal diversity (Scherf, 2000). Pirenaica is an ancient native breed characterized by its adaptation to the alpine climate in the northern region of the Iberian Peninsula Pyrenees. It has become the subject of intensive livestock farming due to its high economic value. Most of the beef production from Pirenaica breed is commercialized under the quality labels of “Euskal Okela” and “Temera de Navarra”.

Most individual cattle belong to the mitochondrial DNA (mtDNA) macro-haplogroup T, whose origin is estimated to be approximately 10 000 years ago in the Middle East (Troy et al., 2001). The macro-haplogroup T has a basal division into two subclades, T5 and T1’2’3, the latter being predominant and comprising four haplogroups, T1, T2, and T3, as well as T4 (Achilli et al., 2008). Additionally, the possibility of a process of independent domestication in Africa (Bradley et al., 1996) may explain the phylogeographic particularities of T1, which is present in Africa, the Middle East, Southern Europe, and South America.

This phenomenon may have influenced the formation of several Iberian breeds (Cymbron et al., 1999). In addition to the well-described major macro-haplogroup T, three additional haplogroups were described: the P haplogroup, a marker of extinct aurochs from northern and central Europe (Edwards et al., 2007), but also identified in a single animal in Korea; the R haplogroup, reported only in animals from Italy (Achilli et al., 2008, 2009), which is the most divergent haplotype in phylogeny of this specie; and the Q haplogroup. These three haplogroups are minorities and possibly arose through local and secondary domestication processes (Bonfiglio et al., 2010).

Of the three previously mentioned haplogroups, Q is the haplogroup most closely related to T, with a divergence time of approximately 52 thousand years (ky) ago (Achilli et al., 2008). Several sequences, both ancient and modern, were found in France, Germany, Portugal, Turkey, and China with the mutation motif 169G-15953G-16255C (Bonfiglio et al., 2010), characteristic of Q in the control region; however, the assignment of this haplogroup cannot be verified without checking the positions of the coding region (Achilli et al., 2008). Therefore, to date, only 16 individuals of the Q haplogroup have been confirmed in Italian taurine breeds.

With the objective of characterizing the matrilineal lineages of these breeds, a study of mtDNA was performed. In this study, we analyze the genetic diversity of the entire region of the mtDNA D-loop in 155 individuals from the Terrena and Pirenaica breeds, native to the Basque region where control region analysis showed that most individuals belonged to T3. T1 and T individuals were observed at much lower frequencies as well as a probable Q1 lineage. As a consequence, a secondary objective of this work was the characterization of this lineage by sequencing the entire mtDNA.

### Material and methods

#### Sample collection and DNA extraction

The genetic characterization was performed by analysis of the entire D-loop region of mtDNA in 155 Terrena and Pirenaica

Correspondence: Marian M. de Pancorbo, BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz 01006, Spain. Tel: +34 945 01 45 28. Fax: +34 945 01 44 58. E-mail: marian.mdepancorbo@ehu.es

Electrophoresis Journal (en revisión)

## Mitochondrial lineages of Basque Latxa sheeps (*Ovis aries*) show new clues about 75/76 bp tandem repeat sequence.

Lopez-Oceja, A. <sup>1</sup>, Gamarra, D. <sup>1</sup>, Cardoso, S. <sup>1</sup>, Palencia-Madrid, L. <sup>1</sup>, Juste, R.A. <sup>2</sup>, De Pancorbo, M.M.\* <sup>1</sup>

<sup>1</sup>BIOMICs Research Group, University of the Basque Country (UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz, Spain. (ALO, DG, SC, LPM, MMDP)

<sup>2</sup>Animal Health Department, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Derio, Bizkaia, Spain. (RAJ)

\*Correspondent: marian.mdepancorbo@ehu.eus

### Abstract

The Basque Country is home to the Latxa sheep breed, divided in several varieties such as the Latxa Black Face and Latxa Blonde Face. A study of the mitochondrial DNA control region was performed with the objective of characterizing the matrilineal lineages of these two varieties, that are the basis for the production of the famed Idiazabal type of cheese. Mitochondrial lineages of 174 male sheep were analyzed and most of the individuals were classified into B haplogroup (98.85%), while A haplogroup was much less frequent. Two Latxa individuals, both belonging to B haplogroup, presented an additional 75/76 bp tandem repeat motif. Only 33 other sequences with this repeat motif were found among 11,061 sheep sequences included in the GenBank database. Gene expression was analyzed because of the presence of a fifth 75/76 bp repeat motif inside ETAS1, a domain with a possible function in regulation of replication and transcription. The mRNA from four mitochondrial genes *ND1*, *ND2*, *COI* and *cyt b* was analyzed in the two individuals of this study with a fifth repeat motif and four without it. Although lower transcription was noticed when the additional 75/76 bp repeat motif was present no statistically significant differences were observed. Therefore, the variation in the number of the 75/76 repeat motif does not seem to modify the gene expression rate in analyzed mitochondrial genes.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, Control region, Gene expression, *Ovis aries*.

## **Determinación de especie y linajes maternos de restos prehistóricos bovinos y ovicaprinos del País Vasco.**

Lopez-Oceja A.<sup>1</sup>, Cardoso S.<sup>1</sup>, Palencia L.<sup>1</sup>, Castaños P.<sup>2</sup>, Mugika J.<sup>3</sup>, Fernández Eraso J.<sup>3</sup>, de Pancorbo M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo BIOMICs / BIOMICs Research Group, Universidad del País Vasco UPV/EHU.

<sup>2</sup>Sociedad de Ciencias Aranzadi.

<sup>3</sup>Departamento de Prehistoria. Facultad de Letras UPV/EHU.

### **Resumen**

En la actualidad existe una gran variedad de razas de bóvidos y óvidos en el País Vasco, donde desde el punto de vista arqueológico existe constancia de una importante presencia de estas especies desde tiempos prehistóricos. La Biología Molecular puede representar una herramienta de gran utilidad para estudiar la historia de estas especies, en especial mediante el análisis de ADN a partir de restos arqueológicos. Así, los objetivos principales de este estudio son aplicar la identificación genética a la determinación de la especie en restos arqueológicos mediante el análisis del gen Citocromo b (*cyt b*); determinar la posible existencia de continuidad genética entre los individuos analizados y las cabañas bovina y ovina actuales; y establecer el tiempo de asentamiento de las diferentes razas en la región. Para ello se analizaron 6 muestras de bóvidos y 8 muestras de origen ovicaprino, con una antigüedad máxima en torno a 7.000 años. El análisis del gen *cyt b* permitió clasificar la muestras de bóvidos como *Bos taurus*. Las muestras ovicaprinas resultaron ser *Ovis aries*, a excepción de la muestra CPL. 17310 que no tuvo similitudes con ninguna de las especies de la subfamilia caprinae por lo que no pudo ser clasificada dentro de ninguna especie conocida en la actualidad. Este hecho podría indicar que se trata de un individuo de una especie de la que no haya datos genéticos o el hallazgo de una especie extinta sin clasificar. El haplogrupo mayoritario en los bóvidos fue T3, mientras que en óvidos fue el haplogrupo B, siendo ambos los más habituales en Europa. De esta manera se confirma la presencia de ganado de las especies *Bos taurus* y *Ovis aries* desde hace aproximadamente 7.000 años en el País Vasco. Asimismo, la presencia de muestras prehistóricas y actuales con un mismo haplotipo refleja la existencia de continuidad genética desde hace 7.000 años hasta la actualidad, lo que podría indicar que algunas razas llevan asentadas en esta región desde hace varios miles de años.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsig](http://www.elsevier.com/locate/fsig)

Research paper

New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysisA. Lopez-Oceja<sup>a</sup>, D. Gamarra<sup>a</sup>, S. Borrigan<sup>b</sup>, S. Jiménez-Moreno<sup>c</sup>, M.M. de Pancorbo<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> BIOMKCS Research Group, University of the Basque Country, UPV/EHU, 01006, Vitoria-Gasteiz, Spain<sup>b</sup> Parque de la Naturaleza de Cabárceno, 39693, Obregón, Cantabria, Spain<sup>c</sup> Area of Forensic and Legal Medicine, Pathology and Surgery Dept., Miguel Hernández University of Elche, 03550, Elche, Alicante, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form 3 May 2016

Accepted 4 May 2016

Available online 6 May 2016

## Keywords:

Mitochondrial DNA

Cytochrome *b*

Forensic

## ABSTRACT

Analysis of mitochondrial DNA, and in particular the cytochrome *b* gene (*cyt b*), has become an essential tool for species identification in routine forensic practice. In cases of degraded samples, where the DNA is fractionated, universal primers that are highly efficient for the amplification of the target region are necessary. Therefore, in the present study a new universal *cyt b* primer set with high species identification capabilities, even in samples with highly degraded DNA, has been developed. In order to achieve this objective, the primers were designed following the alignment of complete sequences of the *cyt b* from 751 species from the Class of Mammalia listed in GenBank. A highly variable region of 148 bp flanked by highly conserved sequences was chosen for placing the primers. The effectiveness of the new pair of primers was examined in 63 animal species belonging to 38 Families from 14 Orders and 5 Classes (Mammalia, Aves, Reptilia, Actinopterygii, and Malacostraca). Species determination was possible in all cases, which shows that the fragment analyzed provided a high capability for species identification. Furthermore, to ensure the efficiency of the 148 bp fragment, the intraspecific variability was analyzed by calculating the concordance between individuals with the BLAST tool from the NCBI (National Center for Biotechnological Information). The intraspecific concordance levels were superior to 97% in all species. Likewise, the phylogenetic information from the selected fragment was confirmed by obtaining the phylogenetic tree from the sequences of the species analyzed. Evidence of the high power of phylogenetic discrimination of the analyzed fragment of the *cyt b* was obtained, as 93.75% of the species were grouped within their corresponding Orders. Finally, the analysis of 40 degraded samples with small-size DNA fragments showed that the new pair of primers permits identifying the species, even when the DNA is highly degraded as it is very common in forensic samples.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Species identification of biological samples of unknown origin is a critical aspect in routine forensic practice. It is commonly used in criminal cases when non-human samples are involved [1]. In addition to the identification of domestic animal species in routine forensic casework, the determination of other species is also of importance, for instance, in entomological species [2,3], in alleged wildlife crimes [4,5] involving poaching, illegal trading of endangered species or traffic accidents, and in food industry to avoid adulteration of foodstuffs [6,7].

The most frequent loci used for species identification in forensic, phylogenetics, and biodiversity studies are mitochondrial cytochrome *b* (*cyt b*) [1,8,9] and cytochrome *c* oxidase subunit 1

(COI) [10]. Moreover, the 12S ribosomal RNA [11] and 16S ribosomal RNA [12] genes have also been used for molecular analysis in species determination. In mammals the *cyt b* locus provides an accurate reconstruction of the phylogeny at the levels of Superorder, Order, and Family [13]. Nowadays, DNA analysis by PCR has become routinely used method for identifying species [14], as it allows amplifying regions of specific genes of interest. The conserved regions suitable for primer design allow the use of universal primer sets in species identification. The criteria for an ideal species marker, is to be a sequence which shows sufficient variability between species and no or little intraspecific variation, such that two closely related members of the same genus could be separated [15], are short enough to be sequenced in a reaction, and possess a conserved region for the location of universal primers [16]. The first primer set that amplified a section of the *cyt b* was designed by Pääbo et al. [8] and later modified by Kotzler et al. [17] and Hsieh et al. [9]. Several universal primer sets that discriminates a high number of species, have been developed for forensic

\* Corresponding author.

E-mail address: [maria.rm.de.pancorbo@ehu.es](mailto:maria.rm.de.pancorbo@ehu.es) (M.M. de Pancorbo).<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.001>

1872-4973/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



Food Chemistry (en revisión)

## Identification of species in meat food products: a new screening method based on high resolution melting real time PCR of *cyt b* gene.

Lopez-Oceja A., Gamarra D., Nuñez C., Baeta M., de Pancorbo M.M. \*

BIOMICS Research Group, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.

Corresponding author Marian M. de Pancorbo. Tel.: +34 945 01 45 28; fax: +34 945 01 44 58; email: marianpancorbo@gmail.com

### Abstract

Meat adulteration with lower value products or mislabelling involves economic, health, quality and socio-religious issues. Thus, the identification and traceability of meat species have become an important subject to detect such fraudulent practices. This study presents a method for the identification of eight common meat species through the amplification of a 148 bp fragment from the cytochrome b (*cyt b*) gene with a universal primer pair and High Resolution Melting (HRM) analysis. Samples from *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa domestica*, *Equus caballus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* and *Coturnix coturnix* species were analyzed. Melting profiles from each species as well as from several DNA mixtures of these species were analyzed, establishing the melting profiles for each species and species mixtures. The results of this study revealed that the method here proposed is a fast, reliable, and low-cost alternative to conventional sequencing techniques, for species identification in meat products even in processed food and degraded samples.

**Keywords:** Mitochondrial DNA, Cytochrome b, High resolution melting, Species identification.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/FSIGSS](http://www.elsevier.com/locate/FSIGSS)

## Identification of big game species by a universal cytochrome B primer pair through High-Resolution Melting



Andrés Lopez-Oceja<sup>a</sup>, David Gamarra<sup>a</sup>, Susana Jiménez-Moreno<sup>b,\*</sup>, Marian M. de Pancorbo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> BDOMG Research Group, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria, Spain

<sup>b</sup> Área Medicina Legal y Forense, Dpto. Patología y Cirugía, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 September 2015

Accepted 14 September 2015

Available online 1 October 2015

#### Keywords:

Cytochrome B

Big game species

High Resolution Melting

### ABSTRACT

Species identification by DNA barcodes has become in recent years a very useful tool in molecular biology. But the degradation level shown in some samples, makes regular barcodes impractical for cases in which DNA is fragmented as it happens commonly in forensic casework. Therefore, the use of mini barcodes with sizes below 200 bp is recommended to achieve optimal amplifications. The present study is focused on the identification of five Iberian Peninsula big game species, Red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), wild boar (*Sus scrofa*), brown bear (*Ursus arctos*) and wolf (*Canis lupus*), using a pair of universal primers that amplify a 148bp Cytochrome B mini barcode. The analysis of amplicons was made using High-Resolution Melting and the results have shown a correct identification of the five big game species analyzed even in degraded samples.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Levels of monitoring and control of poaching have been increased during last years, reducing the number of cases [1] but it still requires new tools for genetic identification of species in forensic casework.

DNA of forensic evidences from cinegetic samples is commonly highly degraded [2]. The small size of the fragments of the degraded DNA requires amplicons less than 200bp for optimum sample amplification [3]. The analysis of reduced amplicons can be carried out by High-Resolution Melting (HRM). This technique has advantages such as low cost and short time, bringing the same level of discrimination of species that analytical methods based on Sanger sequencing.

The Cytochrome B (CytB) is a mitochondrial gene that has been widely used in taxonomic and forensic studies [4,5]. The CytB provides an accurate reconstruction of the phylogeny of mammals, in the levels of super-order, order and family [6]. In addition, this locus maintains a high level of phylogenetic discrimination even when short amplicons are used.

The aim of this study was to design a pair of primers able to amplify a highly variable small region of 148 bp from the CytB gene

for making a panel able to identify five game species by HRM technique.

### 2. Material and methods

Individuals from a total of seven species belonging to four families of two different orders were analyzed (Table 1). Muscle tissues and stool samples were obtained from several hunting associations and Cabarceno Nature Park (Cantabria, Spain). For the extraction of muscle tissues, 5mg were taken and DNA was extracted by the salting out method, following the protocol of the Genra Puregene tissue kit (Qiagen). 200 mg of stool samples were taken for DNA extraction using the Stool QIAmp DNA Mini kit (Qiagen).

To perform primers design, CytB gene sequences of each of the seven analyzed animal species were obtained from GenBank. The sequences were aligned using the ClustalX software v.2.0.11 [7]. The variable regions flanked by highly preserved sequences were searched manually. After selecting the flanking regions we proceeded to design a pair of primers using the PerlPrimer v.1.1.21 software [8].

Purified DNA templates were amplified in a BioRad CFX-96 real time system (BioRad, USA). The following reagents were used: 0.15 μM of each primer; 2.5 μL of SsoFast™ EvaGreen® supermix and 5 μL of DNA. The PCR conditions were as follows: Initial denaturation at 98 °C for 2 min; 32 cycles at 98 °C for 5 s and 50 °C for 30 s. The plate read was taken after an initial step of 95 °C 30 s

\* Corresponding author at: Ctra. Alicante–Valencia KM. 8, 7. 03550 Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain.

E-mail address: [susana.jimenez@umh.es](mailto:susana.jimenez@umh.es) (S. Jiménez-Moreno).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.047>

1875-1768/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.









