



universidad  
de león



# **UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LOS CABALLOS**

**USE OF BIOINFORMATIC TOOLS FOR  
THE EVOLUTIONARY ANALYSIS OF  
HORSES**

Autora: Nerea Loyarte Madoz

Tutor: Luis E. Sáenz de Miera

**GRADO EN BIOLOGÍA**

Julio, 2022



## RESUMEN

Los caballos han sido esenciales en la historia del ser humano y su evolución sigue siendo discutida. En este trabajo se realizan tres filogenias moleculares, dos de ellas para obtener un filograma de los perisodáctilos utilizando los genes *Cytb* y *Cox3*, además de utilizar el *D-Loop* para obtener un filograma de los caballos modernos. El filograma de los perisodáctilos se realiza para ver la posición evolutiva de los caballos, así como para discutir las relaciones filogenéticas con los fósiles y clados hermanos. El filograma obtenido utilizando las secuencias del *D-Loop* se realiza para discutir las relaciones filogenéticas de las tres subespecies de caballos modernos actuales (*E. f. caballus*, *E. f. przewalskii* y *E. f. ferus*). Debido a los valores de *Bootstrap* bajos encontrados en la filogenia de los caballos, se llevó a cabo un análisis de pares de secuencias para la obtención de distintos diagramas de cajas o *boxplots*. Mediante estos diagramas se ha podido especificar más acerca de los grupos que forman las tres subespecies de caballos modernos.

**Palabras clave:** *Equus ferus*, evolución, marcadores moleculares mitocondriales, Perissodactyla.

## ABSTRACT

Horses have been essential in human beings' history and their evolution is still under discussion. In this project three molecular phylogenies are performed, two of them to obtain a phylogram of perisodactyles using the *Cytb* and *Cox3* genes, in addition to using the *D-Loop* to obtain a phylogram of modern horses. The phylogram of perisodactyls is performed to see the evolutionary position of horses, as well as to discuss phylogenetic relationships with fossils and sister clades. The phylogram obtained using *D-Loop* sequences is performed to discuss the phylogenetic relationships of the three subespecies of modern horses (*E. f. caballus*, *E. f. przewalskii* and *E. f. ferus*). Due to the low *Bootstrap* values found in the phylogeny of horses, a sequence pair analysis was carried out to obtain different *boxplots*. Through these diagrams it has been possible to specify more about the groups that form the three subespecies of modern horses.

**Key words:** *Equus ferus*, evolution, mitochondrial molecular markers, Perissodactyla.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Clasificación de los caballos .....	1
1.2 La domesticación del caballo .....	1
1.3 El caballo de Przewalski ( <i>Equus ferus przewalskii</i> ) .....	3
1.4. El caballo tarpán o caballo salvaje euroasiático ( <i>Equus ferus ferus</i> ) .....	4
1.5. Variabilidad y consanguinidad de los caballos domésticos modernos.....	5
1.6. Filogenias moleculares y análisis de secuencias.....	6
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	7
2.1. Obtención de secuencias mitocondriales de la base de datos del NCBI .....	7
2.2. Edición, alineamiento de secuencias y análisis filogenético .....	7
3. RESULTADOS.....	10
3.1. Perissodactyla .....	10
3.2. Equus .....	14
4. DISCUSIÓN.....	19
4.1. Los caballos de Przewalski, ¿la última subespecie salvaje o un híbrido de caballo doméstico? .....	19
4.2. El caballo Tarpán, ¿subespecie o mito? .....	21
4.3. Dificultades a la hora de realizar el trabajo .....	22
5. CONCLUSIÓN .....	24
6. REFERENCIAS.....	25

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Clasificación de los caballos

Los caballos pertenecen al orden Perissodactyla, compartiendo suborden con los asnos y las cebras. Tanto los asnos, como las cebras y los caballos actuales se engloban en un único género denominado *Equus*. Dentro de los asnos se encuentran los asnos africanos y los asiáticos, mientras que en las cebras se diferencian la cebra común, la cebra de montaña y la cebrilla de Grévy. En el caso de los caballos, las tres subespecies actuales son: *Equus ferus caballus* (caballo doméstico moderno), *Equus ferus przewalskii* (caballo de Przewalski) y *Equus ferus ferus* (tarpán).

En 1758 Linneo denominó al caballo doméstico como *Equus caballus*. Cuando se nombraron los tarpanes, de acuerdo con las normas del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, fueron denominados como *Equus caballus ferus*. Sin embargo, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica emitió en 2003 la norma conocida como Opinión 2027. En esta norma se establece la prioridad de los nombres científicos de los animales silvestres frente a los domesticados (ICZN, 2003). De este modo, el tarpán pasó a llamarse *Equus ferus ferus*. Por lo tanto, las tres subespecies de caballos actuales se engloban en una única especie llamada *Equus ferus*.

### 1.2. La domesticación del caballo

Los caballos que conocemos hoy en día destacan por las clases de equitación, participar en carreras, concursos, equinoterapia, etc. Pero estos animales antiguamente se usaban para tirar de carruajes, para el consumo de su carne, e incluso participaban en las guerras. También, favorecieron la estabilidad de imperios, como por ejemplo la dinastía china Tang o el Gran Imperio Mongol, donde gracias a estos los “Mensajeros de Flechas” eran capaces de transmitir la información hasta 300 km/día (Minetti, 2003). Pero, ¿cuándo empezaron los caballos a tener interacciones con los humanos?

Hay evidencias de que en el Eneolítico, en el actual centro norte de Kazajistán, la cultura Botai tenía interacciones con los caballos hace alrededor de 5.500 años (Gaunitz *et al.*, 2018). Esta cultura es, a día de hoy, la más antigua en la que se han encontrado evidencias de ordeño, arneses y acorralamiento de los caballos (Outram *et al.*, 2009).

En Hungría se encontró el rastro genómico más antiguo ( $\approx 4.100$  años) perteneciente al linaje denominado “DOM2”, que según Orlando (2020), condujo a los caballos domesticados modernos. Entre  $\approx 4.100$  y  $5.000$  años el primer linaje doméstico desapareció y surgió el moderno, coincidiendo con varias oleadas de expansiones humanas por las estepas y por Europa (Damgaard *et al.*, 2018a; Haak *et al.*, 2015; Damgaard *et al.*, 2018b).

A lo largo de los últimos  $45.000$  años se han encontrado nichos paleoclimáticos de condiciones ambientales adecuadas en la Península Ibérica (Leonardi *et al.*, 2018), así como pinturas rupestres del Paleolítico Superior que indican la interacción de estos animales con los humanos (Bicho *et al.*, 2007). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que estos caballos ibéricos fuesen localmente domesticados y que pudieran haber transmitido genes a los caballos modernos. No obstante, mediante secuencias genómicas de caballos ibéricos ( $\approx 4.000$ - $4.800$  años) (Fages *et al.*, 2019) se concluyó que hace  $\approx 285.000$  años un linaje divergente apodado como “IBE” se separó del linaje ancestral (Orlando *et al.*, 2020). Además, se encontró muy poca representación de “IBE” en los genomas de los caballos “DOM2”. Aunque no es posible rechazar la idea de un núcleo de domesticación aislado en la Península Ibérica, se podría afirmar que éstos no contribuyeron de forma significativa a la composición genética de los caballos domésticos modernos. (Orlando *et al.*, 2020).

Al igual que se encontró el linaje “IBE”, en la península siberiana de Taymir se identificó otro linaje denominado *Equus lenensis* (“ELEN”) (Boeskorov *et al.*, 2018) ( $\approx 16.000$ - $43.000$  años) (Schubert *et al.*, 2014). No se ha visto que “ELEN” tenga gran representación en los genomas del linaje “DOM2”, por lo que tampoco parece haber contribuido demasiado a la composición genética de los caballos modernos (Orlando *et al.*, 2020).

En un análisis llevado a cabo por Gaunitz *et al.* (2018) se sugiere que los caballos Botai fueron los ancestros de los caballos de Przewalski y no de los caballos domésticos modernos. Taylor y Barrón-Ortiz (2021) apoyan a los autores anteriores indicando que los daños observados en los caballos Botai, que incluyen desgaste de dientes, no está relacionado con la domesticación y el contacto con bridas, sino que pueden atribuirse a causas naturales. En consecuencia, no hay datos que apoyen que los Botai fueran el origen de los caballos domésticos modernos.

Un estudio de Librado *et al.* (2021) confirmó la ausencia de ascendencia genética del grupo neolítico de Anatolia (“NEO-ANA”) en “DOM2”, y también, que los caballos de la región entre los ríos Volga y Don, al oeste del mar Caspio (“C-PONT”) pertenecían a un linaje hermano de “DOM2”. Con estos datos propusieron que durante finales del cuarto milenio y principios del tercero a.e.c. los ancestros de “DOM2” vivieron en las estepas eurasiáticas occidentales, principalmente entre el Volga y el Don, atribuyendo a esta zona la domesticación original de los caballos.

Para Librado *et al.* (2021) aproximadamente entre 2.200-2.000 años a.e.c. los caballos “DOM2” se dispersaron a Anatolia, el bajo Danubio, Bohemia y Asia Central, llegando más tarde a Europa Occidental y Mongolia, reemplazando a todas las poblaciones locales entre 1.500-1.000 años a.e.c.. De acuerdo con este modelo, la domesticación del caballo moderno habría sido única.

### **1.3. El caballo de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*)**

La clasificación filogenética de los caballos de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*) ha sido un tema controvertido desde el descubrimiento de esta subespecie en las estepas mongoles a finales de la década de 1880, registrado en 1991 por Volf *et al.* Los caballos de Przewalski se han considerado como la última población de caballos salvajes existentes, o también como una población de caballos salvajes derivada de un linaje doméstico primitivo (Lippold *et al.*, 2011b). Por otro lado, también se ha discutido si es una subespecie salvaje o asilvestrada, y mediante el análisis realizado por Gaunitz *et al.* (2018) se podría concluir que es una subespecie asilvestrada a partir de los caballos de Botai.

Los caballos de Przewalski se extinguieron en estado salvaje en la década de los 60 del siglo XX, pero han conseguido sobrevivir en cautividad gracias a programas de conservación. La población en cautiverio descende de un grupo fundador formado por 13 caballos de Przewalski capturados en la naturaleza. En los registros genealógicos recogidos en 1991 por Volf *et al.*, se indica que entre los 13 caballos que participaron en la población fundadora se encontraban una yegua pony doméstica y una yegua capturada en 1947 (231 Orlitza III), mientras que todos los machos eran de Przewalski. No obstante, únicamente 4 linajes maternos de caballos realmente Przewalski han sobrevivido, puesto que entre los fundadores se incluían caballos domésticos o híbridos de las dos subespecies

en el registro de Volf *et al.* Hoy en día, la población de caballos de Przewalski ha conseguido superar los 2000 individuos, encontrándose alrededor de 500 en reservas de reintroducción de Mongolia y China (King *et al.*, 2015).



**Figura 1. Caballos de Przewalski.** Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Equus\\_ferus\\_przewalskii](https://es.wikipedia.org/wiki/Equus_ferus_przewalskii)

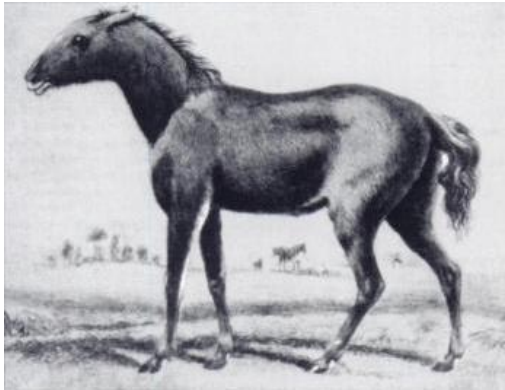
#### **1.4. El caballo tarpán o caballo salvaje euroasiático (*Equus ferus ferus*)**

Existe una gran polémica sobre lo que fue exactamente el caballo tarpán o caballo salvaje euroasiático (*Equus ferus ferus*). Pruski en 1959 indicó que los tarpanes podrían ser caballos domésticos que vivían en estado salvaje, híbridos entre caballos domésticos y salvajes, incluso diferentes asnos salvajes, como el kulan, kiang, khur u onagro. Algunos científicos aseguran que el tarpán es una subespecie actual (Bernáldez-Sánchez y García-Viñas, 2019), mientras que otros se cuestionan acerca de si realmente fue una subespecie salvaje (Ewart, 1906; Librado *et al.*, 2021). King *et al.* (2021) discute si los tarpanes fueron caballos salvajes en sentido biológico o si fueron individuos que se escaparon de poblaciones domésticas y vivieron en estado salvaje. Además, al coronel Przewalski le entregaron el cráneo y la piel de un caballo capturado entre 1876 y 1878, quien primeramente aseguró estar ante los restos de un caballo tarpán antes de concluir que se trataba de un caballo de Przewalski. Esto indica que no siempre ha habido una clara distinción entre las dos subespecies salvajes (Forrest, 2019).

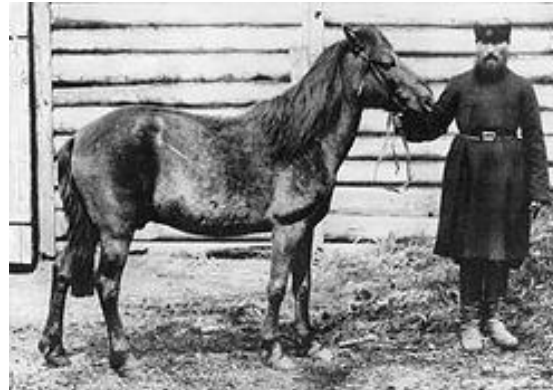
Tadeusz Vetulani en 1938 realizó un experimento de cría seleccionando 19 yeguas y 4 sementales en función de lo que él pensaba que eran caballos tarpanes originales según sus rasgos fenotípicos, pudiendo haber derivado en un alto grado de consanguinidad. Lovász *et al.* (2021a) critica el experimento de cría llevado a cabo por Vetulani debido a que la existencia del tarpán se evidencia únicamente en algunas fuentes anecdóticas.



Asimismo, se ha considerado la raza de caballo doméstico Konik como descendiente directo del tarpán debido a sus caracteres fenotípicos. La primera descripción del tarpán fue realizada por el alemán Johann Friedrich Gmelin en 1774 en el área de Voronezh, Rusia, describiéndolos con una capa gris ratón (coloración parda). La descripción del pelaje de Gmelin fue atribuida a los tarpanes por Vetulani en 1936, utilizando dicho argumento para alegar que los caballos Konik son descendientes del tarpán al mostrar ese fenotipo, aunque realmente el fenotipo del tarpán se desconoce.



**Figura 2. Ilustración de un potro de tarpán.**  
Fuente:  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Equus\\_ferus\\_ferus](https://es.wikipedia.org/wiki/Equus_ferus_ferus)



**Figura 3. El último supuesto tarpán.** Fuente:  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Equus\\_ferus\\_ferus](https://es.wikipedia.org/wiki/Equus_ferus_ferus)

### **1.5. Variabilidad y consanguinidad de los caballos domésticos modernos**

Aunque la domesticación del caballo haya sido uno de los procesos más importantes para la historia del ser humano, trajo consigo algunos inconvenientes a la genética de los caballos. A principios del Holoceno hubo un cambio en la distribución de los caballos salvajes, donde su reproducción se vio alterada al interrumpirse los grupos sociales (Bendrey, 2012). Los humanos con el pastoreo y el consumo de carne fueron probablemente los responsables de la reducción del número de caballos salvajes (Lovász *et al.*, 2021b).

A diferencia de lo que se pensaba, se ha observado una alta diversidad del cromosoma Y hasta hace alrededor de 2.000 años (Librado *et al.*, 2017; Wutke *et al.*, 2018). Sin embargo, varios estudios han indicado la participación de unas pocas líneas paternas en la fundación de las distintas razas de los caballos domésticos modernos al encontrarse únicamente 6 haplotipos del cromosoma Y en las razas europeas de caballos modernos (Wallner *et al.*, 2013) y una variabilidad limitada de los marcadores genéticos tipo microsatélites (Han *et al.*, 2015; Kreutzmann *et al.*, 2014; Wallner *et al.*, 2013). Lippold

*et al.* (2011a) indican que los niveles de variabilidad actuales podrían explicarse con un sesgo en el sexo en los caballos domésticos, pudiendo ser una consecuencia de la domesticación, debido a programas de cría para la producción de sementales. Además, Librado *et al.* (2016) añaden que hubo una gran incorporación de líneas maternas en la domesticación de los caballos, posiblemente mediante la repoblación recurrente de yeguas salvajes durante la expansión de la cría de caballos.

Los caballos de Oriente Medio han tenido una gran representación en la fundación de varias razas de caballos modernos, sobre todo con los caballos purasangre de carreras. Los tres sementales importados a Inglaterra a principios del Siglo XVIII, “Godolphin Arabian o Godolphin Barb” (caballo árabe o tunecino), “Darley Arabian” (caballo árabe) y “Byerley Turk” (caballo turco) son los que más han aportado al acervo genético, siendo la línea paterna de “Darley Arabian” quien representa a la mayor parte de los purasangre machos (Cunningham *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos estudios recientes cuestionan el papel del caballo árabe como el fundador de la raza purasangre y otras razas. **Wallner *et al.* (2017)** realizaron un análisis de haplotipos del cromosoma Y para determinar el origen de “Darley Arabian” y concluyeron que posiblemente este semental, uno de los tres sementales fundadores de la raza purasangre inglesa, se originó a partir del caballo turcomano.

### **1.6. Filogenias moleculares y análisis de secuencias**

Las filogenias moleculares se utilizan para observar las relaciones evolutivas entre distintos taxones. El DNA mitocondrial se usa como marcador molecular gracias a que presenta una disposición muy conservada evolutivamente. Además, es unilineal, en la mayoría de los eucariotas se transmite únicamente por vía materna y no está sometido a recombinación. El gen del Citocromo b (*Cytb*) participa en el transporte de electrones de la cadena respiratoria de la mitocondria. Es uno de los genes más usados para los análisis filogenéticos debido a la variabilidad que presenta en distintos niveles taxonómicos (Irwin *et al.*, 1991). Además, se ha utilizado otro gen mitocondrial, menos común en las filogenias moleculares, el Citocromo C oxidasa III (*Cox3*). El DNA mitocondrial posee una región reguladora, no codificante, denominada *D-Loop*, que presenta una alta tasa mutacional hasta 10 veces superior que el DNA nuclear. Se ha observado que el caballo doméstico moderno es uno de los mayores grupos de diversidad genética mitocondrial al

realizar análisis en el *D-Loop* (Lister *et al.*, 1998; Vilà *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002; Cieslak *et al.*, 2010) y genoma mitocondrial completo (Lippold *et al.*, 2011b; Achilli *et al.*, 2012).

Los objetivos de este trabajo se indican a continuación:

1. Conocer las relaciones filogenéticas de *E. f. caballus* y *E. f. przewalskii*, y su posición en el orden Perissodactyla.
2. Comprobar si el caballo doméstico moderno (*E. f. caballus*) desciende de *E. f. przewalskii* o *E. f. ferus*.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1 Obtención de secuencias mitocondriales de la base de datos del NCBI**

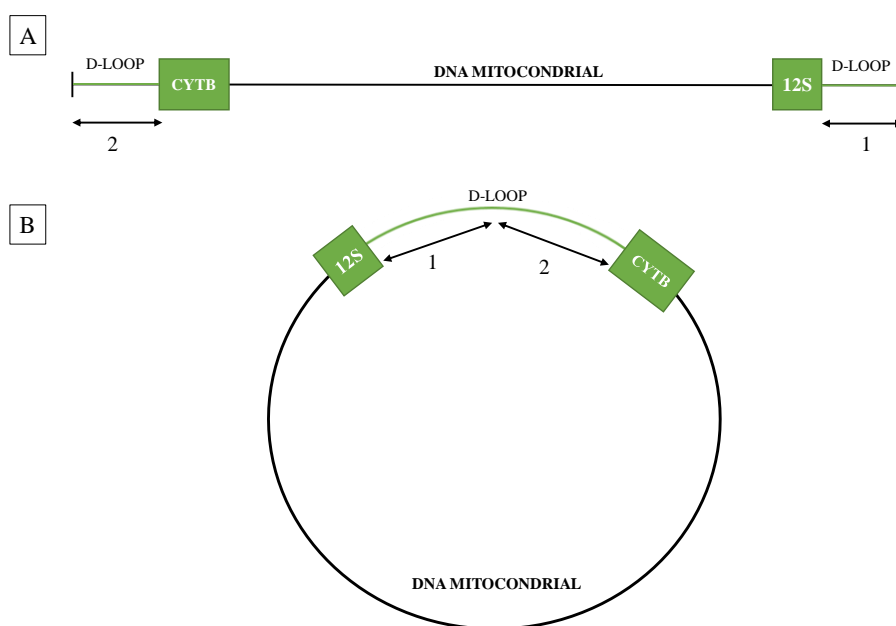
Para llevar a cabo el análisis filogenético tanto de los perisodáctilos como de los caballos domésticos modernos (*Equus ferus caballus*, *Equus ferus przewalskii* y *Equus ferus ferus*) se realizó una búsqueda en la base de datos “GenBank” del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). Se buscaron secuencias del genoma completo para los perisodáctilos y del *D-Loop* para los caballos domésticos modernos. Se utilizaron palabras clave como “Perissodactyla mitochondrion” y “Equus mitochondrion”. Además, se buscaron secuencias del genoma mitocondrial mal anotadas o que el genoma mitocondrial estuviera incompleto, sobre todo identificando individuos de especial interés (fósiles o restos arqueológicos), incluyendo los nombres de los genes deseados. También, se buscó “Equus D-Loop”, descargando todas las secuencias obtenidas en la búsqueda.

### **2.2 Edición, alineamiento de secuencias y análisis filogenético**

Los genes individuales o genomas mitocondriales completos anotados en “GenBank” fueron descargados en formato GenBank. Se utilizó como editor de texto la aplicación TextPad 4.7.3 para visualizar las secuencias en conjunto. En el lenguaje de programación Perl (versión Perl Express 2.5) se extrajeron los genes deseados (*Cytb*, *Cox3* y *D-Loop*) del archivo que contenía los genomas mitocondriales anotados. Se escribió un pequeño programa, “script”, que lee las anotaciones y retiene la secuencia deseada, pasándolo a un nuevo archivo en formato Fasta, disponiendo finalmente Fastas multisequencia listas para su análisis filogenético. El “script” genera nombres comprensivos para las secuencias a

partir de su descripción. Por lo tanto, se obtienen tres sets de datos: secuencias de cada uno de los dos genes por subespecie, y las secuencias *D-Loop* de los caballos.

El genoma mitocondrial es circular y se presenta en las bases de datos cortado en el origen de replicación, que se encuentra en el *D-Loop*. Para restaurar la secuencia del *D-Loop* es necesario unir los extremos de las secuencias del genoma como se muestra en la Figura 4. El *D-Loop* se extendió a toda la región entre la primera y la última secuencia codificante, el *12S* y *Cytb* respectivamente. Para realizar esta tarea de forma automática se escribió otro “script” de Perl.



**Figura 4. DNA mitocondrial y región del *D-Loop*.** A. DNA mitocondrial en forma lineal con el primer gen (rRNA 12S) y el último (CYTB). Se indican con 1 y 2 los fragmentos de secuencia de *D-Loop* (línea verde). B. DNA mitocondrial en forma circular con el primer gen (rRNA 12S) y último gen (CYTB). Se representa con una línea verde la secuencia completa de *D-Loop* correspondientes a los fragmentos 1 y 2.

Se utilizaron los programas MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) y MAFFT (Karaku *et al.*, 2013) para obtener alineamientos múltiples de secuencias (MSAs). En primer lugar, las secuencias codificantes de los genes *Cytb* y *Cox3* fueron traducidas a proteínas, y se utilizó el programa de alineamiento múltiple *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) en MEGA7 para alinear las secuencias. Se llevó a cabo una edición manual de los alineamientos con la ayuda del editor de alineamientos de MEGA7. Las nuevas secuencias que tuvieran una anotación incorrecta o errores de secuenciación, así como secuencias con largos fragmentos con códigos de ambigüedad fueron eliminadas. Se recuperaron las secuencias de nucleótidos de las proteínas alineadas y todos los alineamientos se exportaron a formato MEGA.

Se descargaron un total de 729 secuencias de genoma completo, siendo en su gran mayoría, secuencias de caballos. A pesar de tener un gran número de secuencias, se eligió un único representante de cada taxón (siendo en casi todos los casos taxones de categoría de subespecie o especie) para realizar el análisis filogenético, de acuerdo con el objetivo 1.

**Tabla 1. Tabla informativa de los organismos descargados y elegidos para la obtención de la Figura 5.** Se indica en la primera columna de la izquierda el nombre científico de todas las especies y subespecies utilizadas, seguido de su nombre común; en la tercera columna se indica el número total de secuencias descargadas de cada especie/subespecie, finalizando con el número de acceso en el GenBank de la secuencia utilizada como modelo de cada taxón en la columna de la derecha.

Nombre científico	Nombre común	Nº secuencias descargadas	Nº de acceso en GenBank
<i>Equus ferus caballus</i>	Caballo doméstico	565	HQ439446
<i>Equus ferus przewalskii</i>	Caballo de Przewalski	24	HQ439484
<i>Equus hemionus onager</i>	Onagro persa	1	JX312730
<i>Equus hemionus kulan</i>	Kulan turcomano	1	JX312728
<i>Equus hemionus</i>	Asno salvaje asiático, hemión u onagro	2	NC_016061
<i>Equus hemionus kiang</i>	Kiang	3	NC_020433
<i>Equus asinus</i>	Asno (raza Liangzhou)	19	MG931481
<i>Equus africanus africanus</i>	Asno africano	2	KX669267
<i>Equus africanus somalicus</i>	Asno somalí	2	KM881681
<i>Equus grevyi</i>	Cebra de Grévy o cebra real	5	NC_020432
<i>Equus quagga chapmani</i>	Cebra de Chapman	3	NC_018781
<i>Equus quagga quagga</i>	Cebra de Burcchell	3	NC_044858
<i>Equus zebra hartmannae</i>	Cebra de montaña de Hartmann	2	NC_018780
<i>Equus zebra</i>	Cebra de montaña	4	NC_020476
<i>Equus hydruntinus</i>	Zebro o encebra	1	MK574675
<i>Equus ovodovi</i>	-	3	NC_018783
<i>Equus lambei</i>	Asno o caballo de Yukón	2	KT168318
<i>Equus dalianensis</i>	-	8	MW348985
<i>Equus cf. scotti</i>	Caballo de Scott	2	KT168323
<i>Haringtonhippus francisci</i>	-	27	MF134656
<i>Hippidion sp.</i>	-	3	KM881674
<i>Hippidion saldiasi</i>	-	5	KM881671
<i>Hippidion principale</i>	-	1	KM881678
<i>Tapirus indicus</i>	Tapir malayo o asiático	4	NC_023838
<i>Diceros bicornis</i>	Rinoceronte negro o de labio ganchudo	3	FJ905814
<i>Rhinoceros unicornis</i>	Rinoceronte indio	2	NC_001779
<i>Rhinoceros sondaicus</i>	Rinoceronte de Java	11	KY117574
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	Rinoceronte de Sumatra	19	KY117545
<i>Coelodonta antiquitatis</i>	Rinoceronte lanudo	2	NC_012681

Para el alineamiento de las secuencias no codificantes del *D-Loop* se utilizó el programa MAFFT, que además del método progresivo que utiliza *ClustalW*, mejora los alineamientos mediante un proceso iterativo. Se alineó tantas veces como fue necesario hasta obtener un alineamiento múltiple aceptable. Como en el caso anterior, las nuevas secuencias con ambigüedades o errores de anotación o secuenciación fueron eliminadas.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis filogenético con las secuencias de *Cytb* y *Cox3* alineadas, eligiendo un único representante, como se indica en la Tabla 1. En el caso del *D-Loop*, se utilizaron todas secuencias descargadas, a excepción de las que tuvieron que ser eliminadas. Se utilizó el método de máxima verosimilitud bajo el modelo evolutivo de Kimura-2 parámetros (Kimura, 1980) y un análisis de *Bootstrap* para conocer la fiabilidad de los nodos.

Para un análisis más profundo de la posición evolutiva del caballo de Przewalski (*E. f. przewalskii*), y debido a que se obtuvieron valores de *Bootstrap* bajos en numerosos casos, se realizó un análisis de pares de secuencias para obtener diagramas de cajas o *boxplots*, así como el del tarpán (*E. f. ferus*), de acuerdo con el objetivo 2.

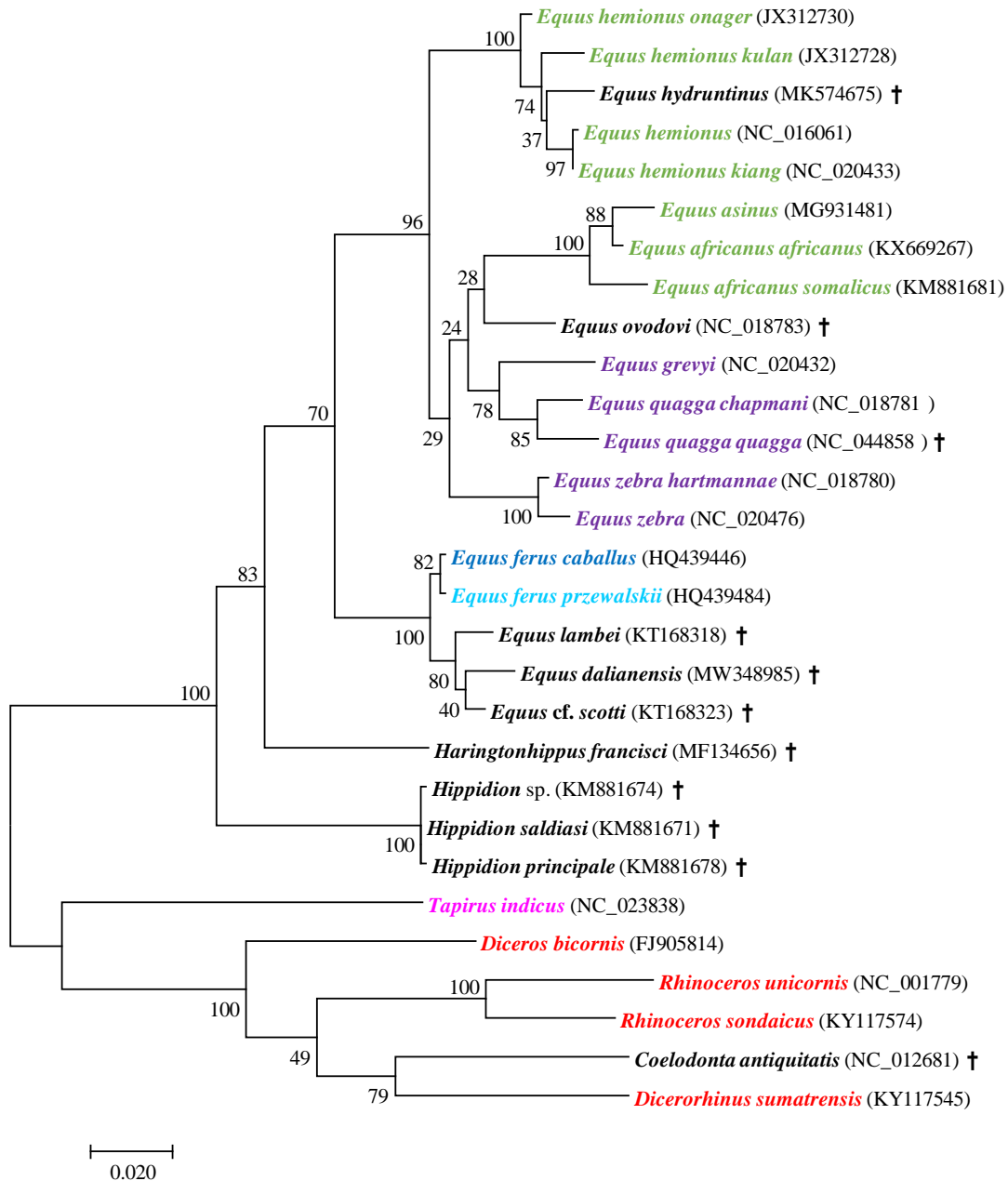
Se utilizó el modelo evolutivo de Kimura-2 parámetros para calcular una matriz de datos estimando las distancias entre parejas de secuencias. Se obtuvieron 3 diagramas diferentes en cada gráfica para comparar, por parejas, las 3 subespecies. De este modo, se obtuvo un diagrama para las distancias entre parejas de secuencias de caballos de la misma subespecie (*E. f. caballus-E. f. caballus*, *E. f. przewalskii-E. f. przewalskii*, *E. f. ferus-E. f. ferus*) y para las distancias entre parejas (*E. f. caballus-E. f. przewalskii*, *E. f. caballus-E. f. ferus*, *E. f. przewalskii-E. f. ferus*). Además, se realizó un cuarto análisis comparando *E. f. caballus* y *E. asinus*.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Perissodactyla**

Con las secuencias obtenidas de *Cytb* y *Cox3* se realizaron dos árboles filogenéticos, seleccionando a un único representante de cada subespecie (en algunos casos, especie), así como especies fósiles. Se utilizó el programa MEGA7 para la obtención de dichos filogramas, mediante el método de máxima verosimilitud. En la Figura 5 se observa la filogenia de los perisodáctilos utilizando el *Cytb*, y en la Figura 6 utilizando el *Cox3*. Los

perisodáctilos se separan en équidos, rinocerontes y tapires. Dentro de la familia Equidae se incluyen asnos, caballos y cebras.



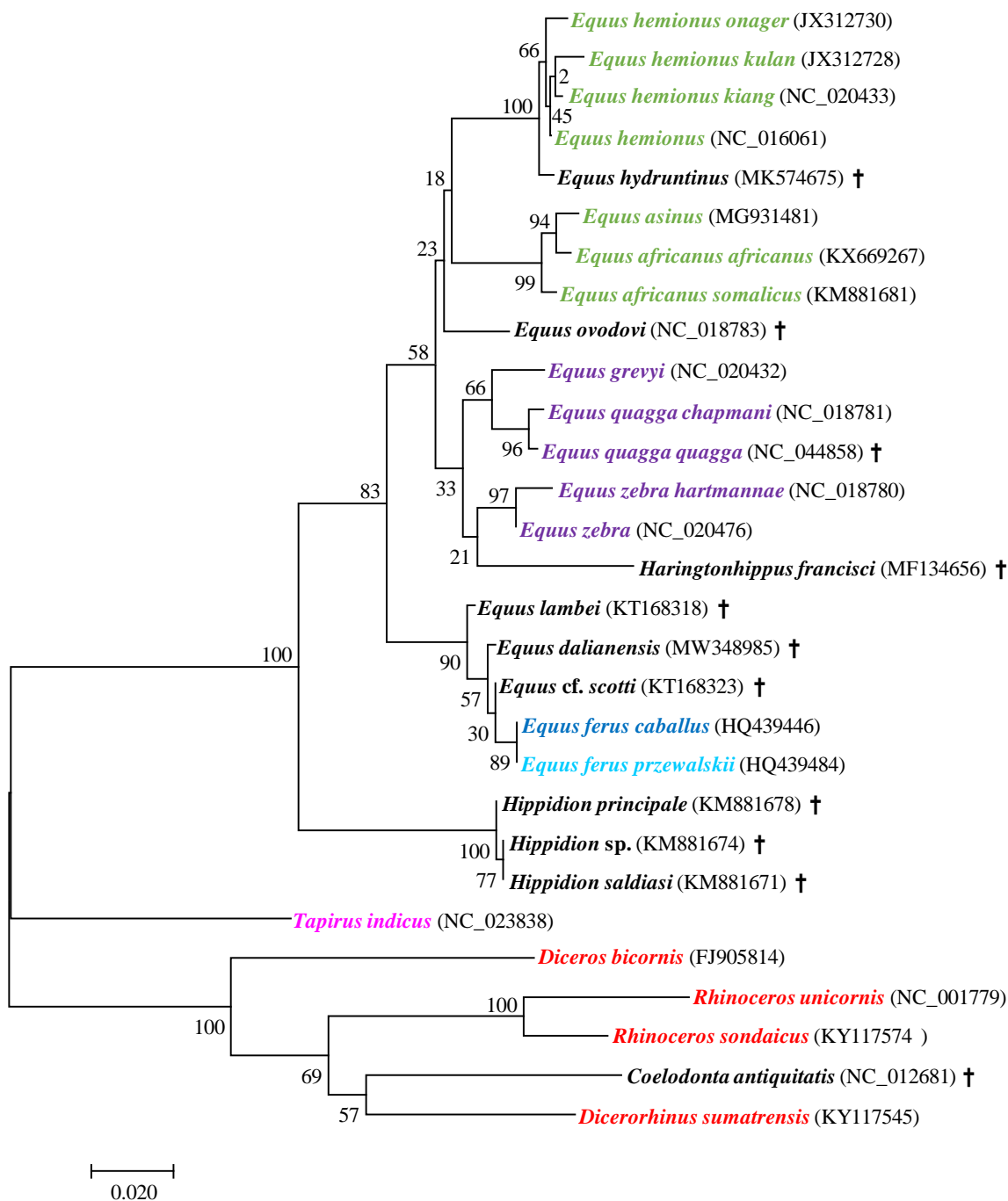
**Figura 5. Filograma de los perisodáctilos utilizando el gen Cytb.** Se encuentran coloreadas las distintas especies del orden Perissodactyla: suborden Hippomorpha (asnos en verde; caballos domésticos modernos y caballos de Przewalski en azul; cebras en morado), suborden Ceratomorpha (rinocerontes en rojo y tapir en rosa). Asimismo, se indican los fósiles en color negro con el símbolo “+”, y con el mismo símbolo pero con el nombre en morado se indica la subespecie extinta no fósil (*Equus quagga quagga*). Se incluye entre paréntesis el número de acceso del “GenBank” de cada representante. Los números indican los valores de *Bootstrap*, siendo bajos en determinados casos. La raíz se posiciona entre los dos subórdenes.

En el filograma métrico (Figura 5) se observan los dos subórdenes separados, équidos por un lado y rinocerontes y tapires por otro. Se encuentran en diferentes grupos, los asnos africanos (*Equus asinus*, *E. africanus africanus*, *E. a. somalicus*), los asnos asiáticos (*E. hemionus kiang*, *E. hemionus*, *E. h. kulan*, *E. h. onager*), que forman un clado hermano de las cebras (*E. grevyi*, *E. quagga chapmani*, *E. q. quagga*, *E. zebra*, *E. z. hartmannae*), otro grupo forman los caballos (*E. ferus caballus*, *E. f. przewalskii*) junto con las especies fósiles (*E. lambei*, *E. dalianensis*, *E. cf. scotti*) y además de otros dos clados diferenciados cada uno en un grupo (*Haringtonhippus francisci* e *Hippidion* sp.), los últimos grupos los forman los rinocerontes (*Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*, *R. sondaicus*, *Coelodonta antiquitatis*, *Dicerorhinus sumatrensis*, *Elasmotherium sibiricum*), y finalmente el tapir (*Tapirus indicus*).

Cada suborden forma un grupo monofilético. Se observa que la línea evolutiva del suborden Ceratomorpha se separó antes que el de Hippomorpha. Dentro del suborden Hippomorpha, *Haringtonhippus francisci* e *Hippidion* forman, cada uno, un grupo monofilético y se posicionan como líneas evolutivas independientes y extintas. Las especies clasificadas en el género *Equus* también forman un grupo monofilético, pero el valor de *Bootstrap* del nodo que representa a su ancestro no es muy grande (70) por lo que no se descarta que *H. francisci* compartiera el ancestro más reciente de todos los équidos. Los caballos (*E. f. caballus* y *E. f. przewalskii*) también forman un grupo monofilético con los caballos fósiles *E. lambei*, *E. dalianensis* y *E. cf. scotti*, apoyado por los valores de *Bootstrap*. Sin embargo, se cuestiona la posición de los dos últimos debido a una valor de *Bootstrap* bajo (40). Los asnos y las cebras también forman un grupo monofilético, siendo un clado hermano de los caballos. El fósil *E. ovodovi* forma un grupo diferenciado de los asnos africanos, pero el valor de *Bootstrap* bajo (22) podría indicar que este fósil compartiera el ancestro de asnos y cebras. También se encuentran valores bajos de *Bootstrap* en el nodo que representa el ancestro de las cebras y asnos africanos (25), cuestionando la posición evolutiva de su ancestro. Por último, los asnos africanos y los asiáticos no forman un grupo monofilético, teniendo más parentesco evolutivo los asnos africanos con las cebras más que con los asnos asiáticos según las secuencias del gen *CytB*, aunque los valores de *Bootstrap* tan bajos (16) del nodo que unen a los asnos africanos con las cebras cuestiona su relación. Al igual que ocurre con *H. francisci*, *E.*



*hydruntinus* también podría compartir el ancestro con los asnos asiáticos debido a los valores de *Bootstrap* bajos (42).



**Figura 6. Filograma del gen *Cox3* de los perisodáctilos.** Se encuentran coloreadas las distintas especies del orden Perissodactyla: suborden Hippomorpha (asnos en verde; caballos domésticos modernos y caballos de Przewalski en azul; cebras en morado), suborden Ceratomorpha (rinocerontes en rojo y tapir en rosa). Asimismo, se indican los fósiles en color negro con el símbolo “+”, y con el mismo símbolo pero con el nombre en morado se indica la subespecie extinta no fósil (*Equus quagga quagga*). Se incluye entre paréntesis el número de acceso del “GenBank” de cada representante. Los números indican los valores de *Bootstrap*, siendo bajos en determinados casos. La raíz se posiciona casi entre los dos subórdenes.

Al realizar el filograma con el gen *Cox3* (Figura 6) se han encontrado algunas diferencias respecto al filograma del *Cytb* (Figura 5). La primera gran diferencia se encuentra con los asnos y las cebras. En la Figura 5 se observa que los asnos africanos comparten ancestro con las cebras, mientras que el ancestro que dio origen a los asnos asiáticos se diversificó antes, aunque los valores de *Bootstrap* bajos podrían desmentir esta hipótesis. Atendiendo a los valores de *Bootstrap*, la posición evolutiva más probable sea el de la Figura 5. También, se cuestiona la posición evolutiva de *Haringtonhippus francisci*, ya que en la Figura 5 aparece como un grupo monofilético y aislado de las cebras, mientras que en la Figura 6 se posiciona como taxón hermano de las cebras de montaña. Apoyado por los valores de *Bootstrap*, la posición evolutiva más correcta podría ser el de la Figura 5 (83>21). Por otra parte, *Equus hydruntinus* forma un grupo polifilético con los hemiones en la Figura 5, con valores de *Bootstrap* bajos (37), mientras que en la Figura 6, gen *Cox3*, forma un grupo monofilético, con valores de *Bootstrap* altos (100), pudiendo ser este segundo caso la posición evolutiva más correcta. Finalmente, se encuentran diferencias en los fósiles de los caballos (*E. lambei*, *E. dalianensis* y *E. cf. scotti*). En la Figura 5 se diferencian dos grupos: los caballos modernos actuales y los caballos fósiles. Como los valores de *Bootstrap* son altos (100) cuando se analiza el gen mitocondrial *Cytb*, la posición evolutiva de estos dos grupos podría ser más correcta en la Figura 5, pudiendo indicar que los caballos modernos actuales descendieron y se domesticaron a partir de un ancestro diferente a los respectivos caballos fósiles.

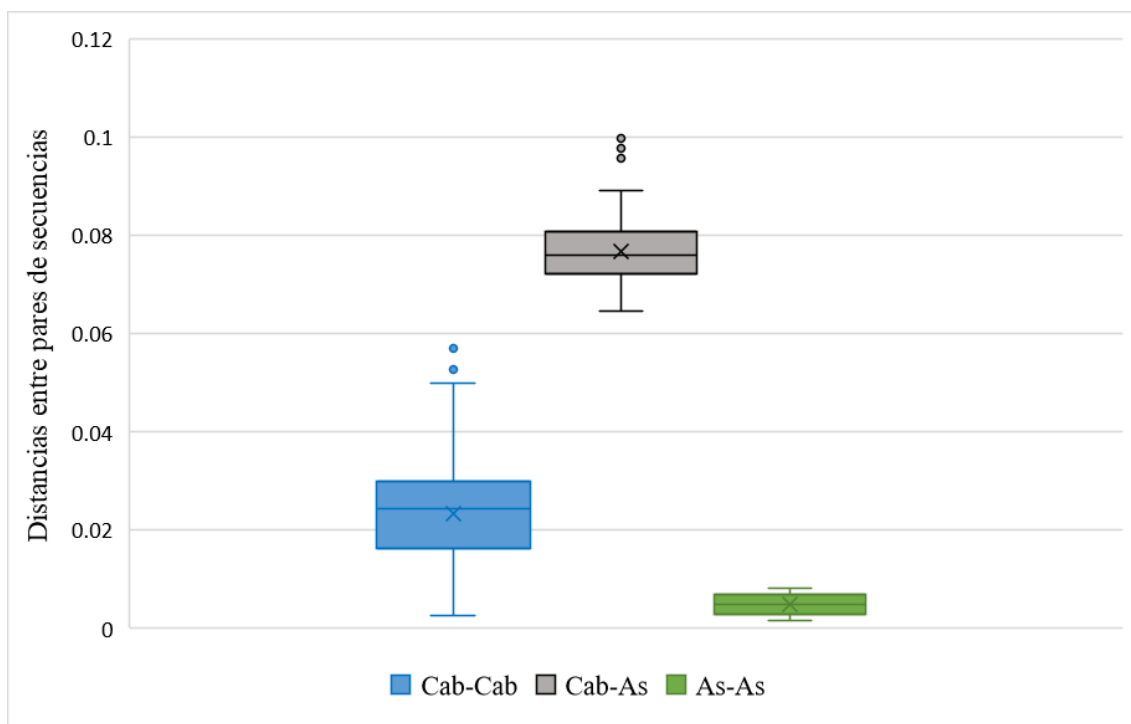
### 3.2 Equus

Las secuencias del *D-Loop*, que cambian más rápidamente que las secuencias codificantes, permitieron elaborar un filograma radial de los caballos, incluyendo también la subespecie extinta *Equus ferus ferus* (tarpán). Para enraizar el árbol se ha utilizado la secuencia de la cebra de montaña (*Equus zebra*), que sirvió como *outgroup* (Figura 6). Cada subespecie se indica con un color diferente, incluyendo la cebra. Los caballos domésticos modernos (representados en azul oscuro) son nombrados en función de su raza. Tras haber visto la posición evolutiva de los caballos en la Figura 5, en la Figura 6 se analiza si cada una de las subespecies forman o no un grupo monofilético.

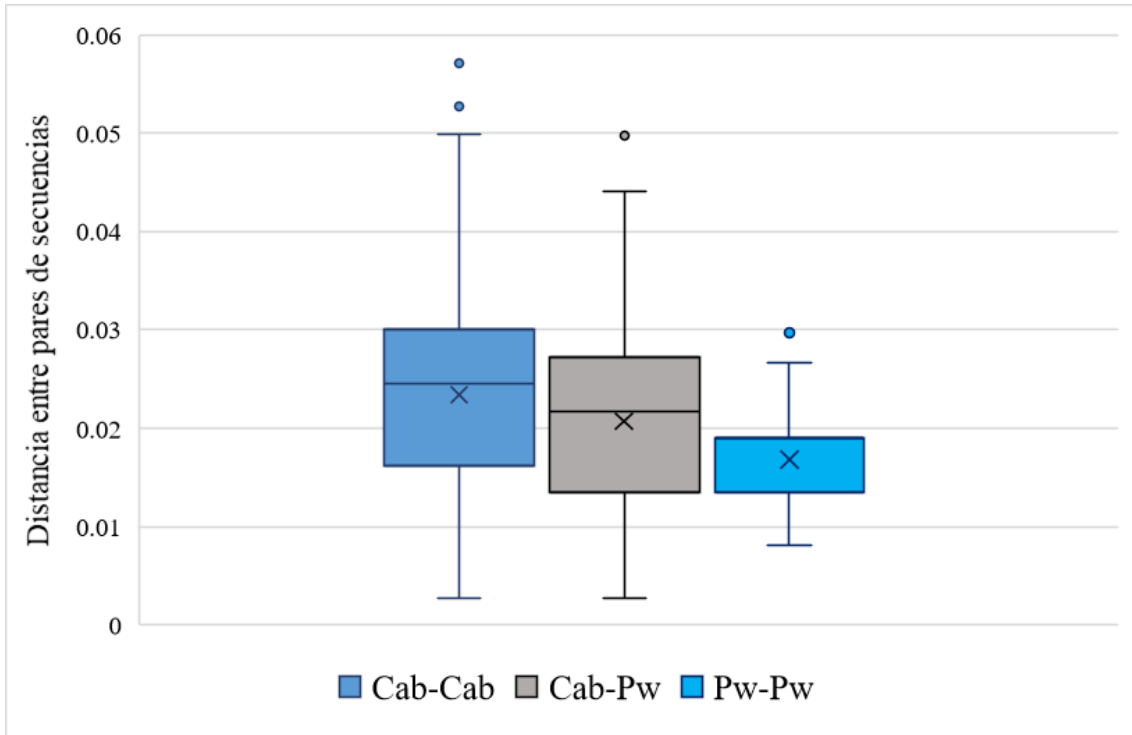


fiabilidad en este análisis de *Bootstrap*, como en el caso de los tarpanes, que indicaría una gran similitud entre las secuencias, aunque todas pertenecientes a la misma línea evolutiva que se correspondería con su subespecie.

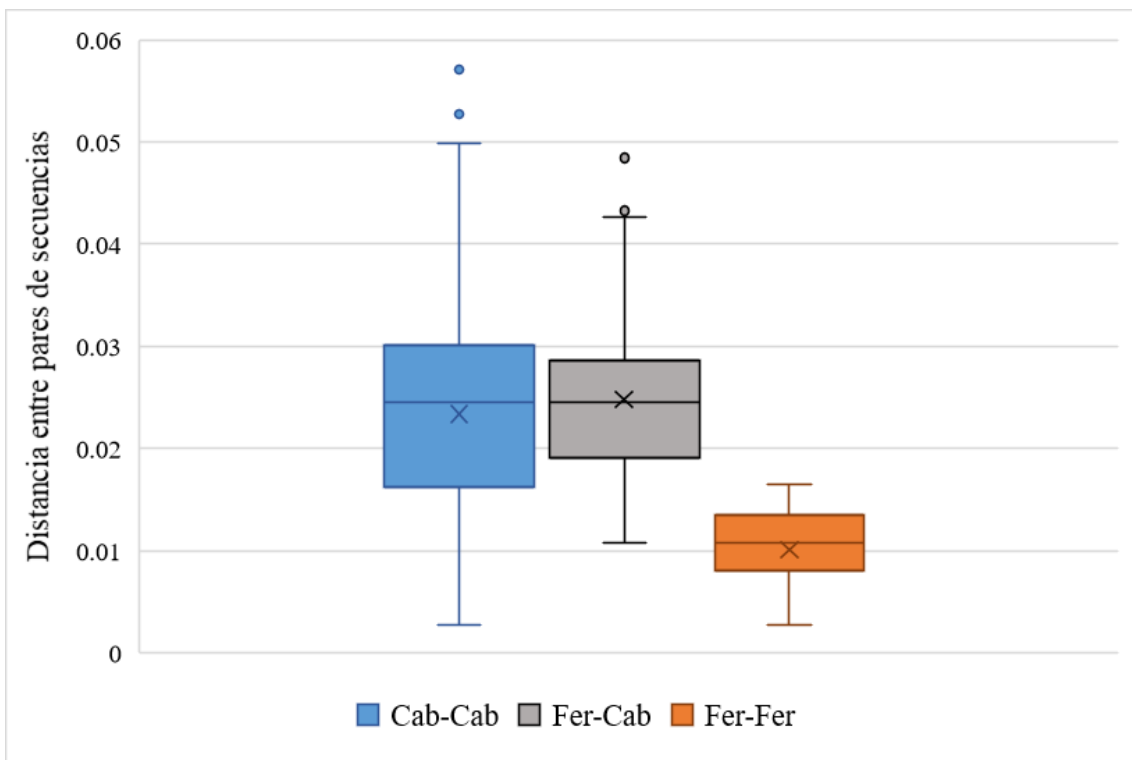
Para confirmar o no las posiciones evolutivas independientes del caballo de Przewalski y del tarpán de la Figura 8, o de la mezcla de secuencias entre los caballos de Przewalski y los caballos domésticos modernos, se obtuvieron las estimaciones de las distancias entre parejas de secuencias utilizando el modelo evolutivo Kimura-2 parámetros en MEGA7, para realizar posteriormente gráficos de cajas o *boxplots*. Se compararon los caballos con los asnos para utilizar el gráfico como control de líneas evolutivas independientes y observar el patrón de cajas en ese caso (Figura 9); el caballo doméstico moderno y el caballo de Przewalski (Figura 10); el tarpán con el caballo doméstico moderno (Figura 11); y el caballo de Przewalski con el tarpán (Figura 12).



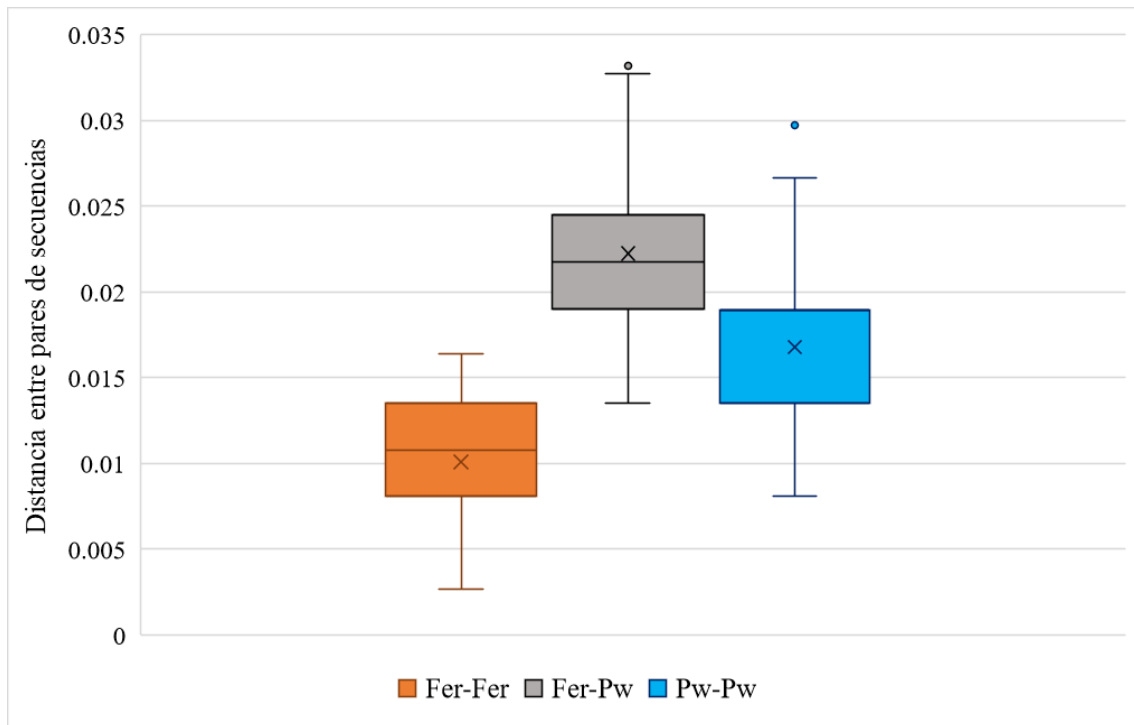
**Figura 8. Boxplot de los caballos domésticos modernos y el asno.** Se analizaron los pares de distancias mediante el método de Kimura 2-parámetros entre *Equus ferus caballus* (Cab) y *Equus asinus* (As).



**Figura 9. Boxplot de los caballos domésticos modernos.** Se analizaron los pares de distancias mediante el método de Kimura 2-parámetros entre *Equus ferus przewalskii* (Pw) y *Equus ferus caballus* (Cab).

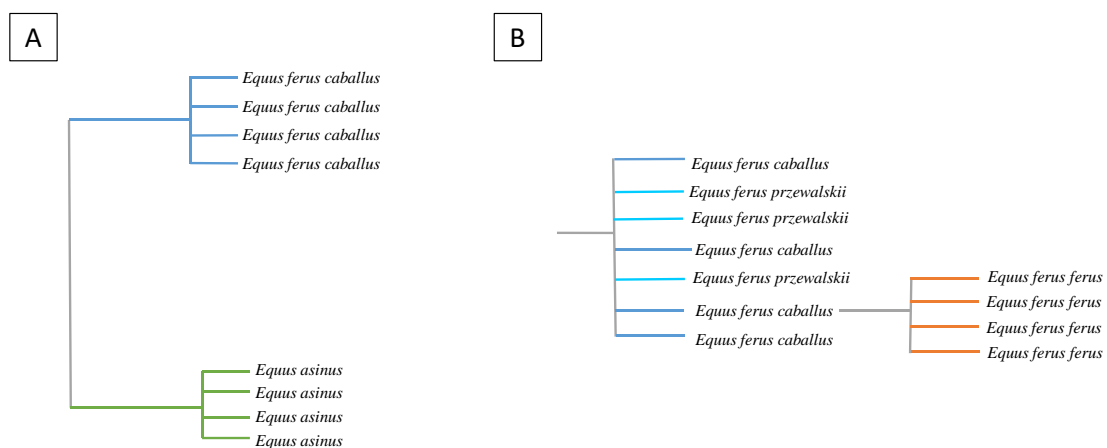


**Figura 10. Boxplot de los caballos domésticos modernos.** Se analizaron los pares de distancias mediante el método de Kimura 2-parámetros entre *Equus ferus ferus* (Fer) y *Equus ferus caballus* (Cab).



**Figura 11. Boxplot de los caballos domésticos modernos.** Se analizaron los pares de distancias mediante el método de Kimura 2-parámetros entre *Equus ferus ferus* (Fer) y *Equus ferus przewalskii* (Pw).

Al comparar las tres subespecies de caballos entre sí se observan más similitudes que cuando se comparan los caballos con los asnos. En todos los casos hay diferencias estadísticas entre las 3 comparaciones de cada figura. Estas diferencias significativas podrían deberse a que el número de comparaciones es muy elevado, pero el comportamiento de las comparaciones muestran patrones diferentes en los *boxplots*.



**Figura 12. Esquema ilustrativo de las líneas evolutivas de los caballos y el asno en función de los resultados de los *boxplots*.** A. Cladograma de la posición evolutiva de *E. f. caballus* y *E. asinus*, observando dos líneas evolutivas diferentes. B. Cladograma de la posición evolutiva de *E. f. caballus*, *E. f. przewalskii* y *E. f. ferus*, observando la misma línea evolutiva entre los dos primeros y una línea evolutiva diferente con *E. f. ferus*, pero deriva de una secuencia de *E. f. caballus*.

En la Figura 8, hay una clara distinción entre las dos especies de équidos, ya que pertenecen a líneas evolutivas diferentes, como se muestra en la Figura 12A. Las comparaciones entre taxones (inter-taxa) presentan una distribución con media y mediana claramente superior a la de las comparaciones dentro de los taxones (intra-taxa). En la Figura 9, se observa una gran semejanza entre los tres *boxplots*, con medianas y rangos muy próximos. La distribución de las comparaciones *caballus-przewalskii* es equivalente a las comparaciones *caballus-caballus* y *przewalskii-przewalskii*. Esto indicaría que *E. f. caballus* y *E. f. przewalskii* son la misma línea evolutiva. En la Figura 10, las distancias *ferus-ferus* son menores que *caballus-caballus* o *caballus-ferus*. Hay distancias grandes entre algunos caballos, que es semejante a la distancia media entre *caballus-ferus*. En este caso, la subespecie *E. f. ferus* está formado por individuos muy parecidos entre sí, formando una línea evolutiva independiente y bien definida. En la Figura 11, aunque las diferencias son menores que entre caballo y asno, el patrón de *boxplots*, a diferencia de las dos figuras anteriores, coincide con el de la Figura 8. Esto indicaría que *E. f. ferus* y *E. f. przewalskii* son líneas evolutivas diferentes. Los patrones evolutivos que pueden deducirse de los resultados de las Figuras 9, 10 y 11 se representan esquemáticamente en la Figura 12B.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Los caballos de Przewalski, ¿la última subespecie salvaje o un híbrido de caballo doméstico?

En el árbol filogenético de la Figura 7 se observa que los caballos de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*) no forma un grupo monofilético, sino que forma un grupo polifilético mezclado con *Equus ferus caballus*. Si el caballo de Przewalski fuese una subespecie diferente a la del caballo doméstico moderno, formaría un grupo monofilético. Como los caballos de Przewalski se diferencian en el número de cromosomas respecto a los caballos domésticos modernos ( $2n = 66$  y  $2n = 64$ , respectivamente) (Benirschke *et al.*, 1965), se podría pensar que son subespecies diferentes. Debido a valores de *Bootstrap* bajos en el filograma del *D-Loop*, los *boxplots* obtenidos en la Figura 6 indican que *E. f. caballus* y *E. f. przewalskii* son la misma línea evolutiva, apoyando los resultados obtenidos en la Figura 9, siendo de diferente línea evolutiva respecto a *E. f. ferus* en función de los resultados de la Figura 11.

La posición evolutiva observada de los caballos de Przewalski en la Figura 7 puede deberse a la introgresión de genes o mitocondrias completas de *E. f. caballus* a *E. f. przewalskii*, siendo estos últimos híbridos o descendientes de híbridos entre las dos subespecies. En análisis llevados a cabo por Lau *et al.* (2009), no se observa que los caballos domésticos y los caballos de Przewalski formen un grupo monofilético al analizar el cromosoma X ni los autosomas. Además, el cruce entre las dos subespecies equinas también ha sido anotado en registros genealógicos de Volf *et al.* en 1991. Al realizar exámenes de los grupos sanguíneos de los caballos de Przewalski y los caballos domésticos modernos, se observó que ambas subespecies presentaban una heterocigosidad promedio similar, indicando la posible reproducción entre ambas (Bowling y Rider, 1987; Bowling *et al.*, 2003). Debido a que se encontraron pedigrees erróneos en la población de caballos de Przewalski fundadores registrada por Volf *et al.* en 1991 en Askania Nova, Ucrania; se realizó un perfil genético de una de las yeguas fundadoras (231 Orlitza III). En los resultados se observaron que esta yegua presentaba en casi todos los marcadores genéticos una superposición con los caballos domésticos modernos. En su mayoría, se encontraron más alelos de los que se podrían explicar únicamente por los caballos fundadores, hallazgo que podría explicarse por la introgresión de genes de los caballos domésticos modernos (Bowling *et al.*, 2003).

Atendiendo a los resultados obtenidos, se pueden apreciar muy pocas variantes del *D-Loop* mitocondrial en los caballos de Przewalski en la Figura 7, además la proximidad a variantes de caballos domésticos modernos indica que las variantes de Przewalski proceden de diferentes razas de *E. f. caballus*. Por lo tanto, las yeguas de Przewalski de las que proceden eran realmente híbridos entre caballos domésticos modernos y caballos de Przewalski. Lau *et al.* (2009) encontraron mayor diversidad autosómica y menor diversidad del cromosoma X en los caballos de Przewalski más que en los caballos domésticos, resultado que puede ser explicado por un cuello de botella en la población de yeguas de Przewalski. Estos datos pueden ser respaldados si se tiene en cuenta el número de caballos de Przewalski fundadores. La disminución casi total de la población de individuos puros y la posterior fundación de la población actual a partir de únicamente 13 individuos podría ser un ejemplo de cuello de botella. Este proceso se caracteriza por una reducción del tamaño de la población durante unas pocas generaciones, que genera una gran deriva genética en la que hay una gran pérdida de alelos irrecuperables, el



crecimiento posterior del tamaño de la población no va acompañado de la recuperación de las variantes genéticas perdidas. En estas poblaciones pequeñas se produce un aumento de cruzamientos endogámicos, y la consanguinidad produce una disminución de variabilidad (heterocigosidad).

Según Gaunitz *et al.* (2018) los caballos de Przewalski son una subespecie asilvestrada, descendiente de los caballos de Botai (Fages *et al.*, 2019), y aislada de los caballos domésticos modernos. Aunque teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la reducción de la población de los caballos de Przewalski podría haber impulsado la reproducción con los caballos domésticos modernos, quedando en su mayoría híbridos. En consecuencia, apenas habría individuos puros en los caballos fundadores capturados en Askania Nova para salvar a la subespecie. Hoy en día, aunque el programa de conservación tuviera éxito y aumentara el número de individuos, realmente casi no se conservan caballos de Przewalski puros.

#### **4.2 El caballo tarpán, ¿subespecie o mito?**

En el árbol filogenético de la Figura 7, *E. f. ferus* aparece como un grupo monofilético independiente de *E. f. caballus* y *E. f. przewalskii*, pudiendo indicar que se trata de una subespecie diferente de las otras dos. Debido a que los valores de *Bootstrap* son bajos también en este caso, a partir de los *boxplots* obtenidos en las Figuras 10 y 11 se ha podido observar que *E. f. ferus* es una línea evolutiva diferente de *E. f. caballus* y *E. f. przewalskii*, apoyado por los resultados obtenidos en la Figura 7. En la figura 10, al comparar los caballos domésticos modernos con los tarpanes, se observa la inclusión de *E. f. ferus* en *E. f. caballus*. Si el tarpán fuese realmente un clado aislado de los caballos domésticos modernos, se observarían patrones similares a las de las Figuras 8 y 11. Además, hace algunas décadas se pensaba que el caballo se domesticó a partir del tarpán (Olsen y Zeder, 2006), pero los resultados obtenidos en las Figuras 7 y 10 desmienten esta hipótesis.

Si realmente los tarpanes no son una subespecie aislada de los caballos domésticos modernos, ¿a qué se debe su agrupación en un clado monofilético?

Al realizar un experimento de cría seleccionando 19 yeguas y 4 sementales en función de lo que Vetulani pensaba en 1938 que eran caballos tarpanes originales según sus rasgos fenotípicos, se podría estar observando un alto grado de consanguinidad y no una subespecie en sí en la Figura 7.

Hay un gran desacuerdo sobre qué caballo, en tal caso de que hubiera alguno, se tendría que llamar tarpán. Además, a diferencia de otras subespecies, el tarpán no cuenta con la conservación de un espécimen real, ni tampoco existe un holotipo de este caballo, cuestionando aún más su existencia. Por lo tanto, los caballos conocidos como tarpanes podrían haber sido caballos domésticos de raza(s) rusa(s) que vivían en estado salvaje en las estepas de Rusia. El experimento de cría con tan pocos individuos podría haber dado lugar a una gran endogamia y consanguinidad de esa raza o razas de caballos rusos, pudiendo producirse un cuello de botella en esa población, resultados que pueden ser respaldados por las Figuras 7 y 10. En un reciente estudio, se sugirió que los tarpanes surgieron de la mezcla de caballos nativos modernos y caballos estrechamente relacionados con el linaje “DOM2” (Librado *et al.*, 2021), pudiendo ser caballos rusos. Por ende, se han rechazado hipótesis previas sobre el origen de estos caballos, como considerarlos el ancestro salvaje o una versión salvaje de “DOM2”, o un híbrido de los caballos de Przewalski (Librado *et al.*, 2021), hipótesis apoyadas por los resultados de las Figuras 7, 10 y 11.

Por otro lado, la creencia popular dice que el caballo Konik es descendiente directo del tarpán. Observando los resultados obtenidos en la filogenia de los caballos (Figura 4), los caballos Konik no presentan proximidad genética con *E. f. ferus*, ni tampoco podría tener relación con la subespecie *E. f. przewalskii*. Estos resultados también se han visto en otras investigaciones, como en Lovász *et al.* (2021a). Por lo tanto, resulta evidente que esta raza de caballos moderna no puede ser descendiente del tarpán. Además, en la filogenia del *D-Loop* (Figura 7) no se observa que los tarpanes den lugar a ninguna raza de *E. f. caballus*.

#### **4.3 Dificultades a la hora de realizar el trabajo**

A la hora de realizar el trabajo se han presentado algunas dificultades. De forma general, la mayor parte de los problemas han surgido en la búsqueda de las secuencias de los genomas mitocondriales y, sobre todo, con las secuencias del *D-Loop*. En varios casos, se han tenido que eliminar determinados genomas debido a su mala calidad, bien porque se ha realizado una mala secuenciación e incluía numerosas posiciones ambiguas, porque al traducir las secuencias codificantes se localizaban cambios de cuadro o porque estaban mal anotados, y también, en el caso de los genomas antiguos, por el deterioro del DNA que produce una secuenciación de fragmentos incompletos con grandes *gaps* que suelen

rellenarse con grandes fragmentos de códigos de ambigüedad. También se detectaron problemas en la clasificación de los individuos de los que proceden las secuencias, sobre todo en el caso de los asnos; algunas de las incorrecciones detectadas en la base de datos del NCBI se muestran a continuación:

*Equus asinus* (MG931481) es un asno de raza Liangzhou (chino). Las 12 razas de asnos chinos provienen de dos linajes maternos de asnos africanos (*Equus africanus africanus* y *Equus africanus somalicus*) (Han *et al.*, 2014). Atendiendo a la filogenia de los perisodáctilos (Figura 5 y Figura 6), podría tratarse de *Equus africanus africanus*.

*Equus hemionus* (NC\_016061) es una especie de asno asiático que presenta varias subespecies, y observando su posición taxonómica en la filogenia de los perisodáctilos (Figura 5), podría tratarse de la subespecie *Equus hemionus kiang*.

*Equus zebra* (NC\_020476) es una especie de zebra de montaña, que engloba a dos subespecies (*Equus zebra hatmannae* y *Equus zebra zebra*). Viendo la filogenia de los perisodáctilos (Figura 5 y Figura 6), podría tratarse de *Equus zebra zebra*.

*Hippidion* sp. (KM881674) es una especie de caballo extinta, y atendiendo a la Figura 6, posiblemente se trate de la subespecie *H. saldiasi*.

En la descripción de *Equus caballus* (KT757761) se indicaba que era tanto *E. f. caballus* como *E. f. przewalskii*, por lo que se eligió como representante de este último.

En el caso del *D-Loop*, había que montar las secuencias y eliminar los fragmentos sobrantes de varios individuos manualmente porque estaban mal anotadas, y en algunos casos, con los asnos, las secuencias eran más largas de lo debido, dificultando así su análisis.

## 5. CONCLUSIÓN

Las conclusiones de este trabajo se enumeran a continuación:

- 1) Las tres subespecies de caballos (*Equus ferus caballus*, *Equus ferus przewalskii* y *Equus ferus ferus*) se engloban en el género *Equus*, siendo *E. ferus* una especie hermana del grupo formado por los asnos y las cebras.
- 2) Se demuestra que ni el caballo de Przewalski ni el tarpán son los antecesores directos del caballo doméstico moderno.
- 3) El caballo de Przewalski desciende del caballo de Botai, aunque en este trabajo se incluirían dentro de la línea evolutiva de *Equus ferus caballus*, debido a diversas hibridaciones entre las dos subespecies.
- 4) No se ha podido concluir lo que es exactamente el tarpán, aunque posiblemente sean caballos rusos que fueron sometidos a procesos endogámicos, observando una gran similitud de secuencias en este análisis.

## 6. REFERENCIAS

- Achilli, A., Olivieri, A., Soares, P., Lancioni, H. *et al.* (2012) “Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication”, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 109 (7), pp. 2449-2454. DOI: 10.1073/pnas.1111637109.
- Bendrey, P. (2012) “From wild horses to domestic horses: A european perspective”, *World archaeology*, 44 (1), pp. 135-157. DOI: 10.1080/00438243.2012.647571.
- Benirschke, K., Malouf, N., Low, R.J. y Heck, H. (1965) “Chromosome complement: Differences between *Equus caballus* and *Equus przewalskii*, Poliakoff”, *Science*, 142 (3668), pp. 382-383. DOI: 10.1126/science.148.3668.382.
- Bernaldez-Sánchez, E. y García-Viñas, E. (2019) “The equids represented in cave art and current horses: a proposal to determine morphological differences and similarities”, *Anthropozoologica*, 54 (1), pp. 1-12. DOI: 10.5252/anthropozoologica2019v54a1.
- Bicho, N.F., Carvalho, A.F., González-Sainz, C., Sanchidrian Torti, J.L. *et al.* (2007) “The upper paleolithic rock art of Iberia”, *Journal of archaeological method and theory*, 14 (1), pp. 81-151. DOI: 10.1007/s10816-007-9025-5.
- Boeskorov, G.G., Potapova, O.R., Protopopov, A., Plotnikov, V.V. *et al.* (2018) “A study of a frozen mummy of a wild horse from the Holocene of Yakutia, East Siberia, Russia”, *Mammal research*, 63, pp. 307-314. DOI: 10.1007/s13364-018-0362-4.
- Bowling, A.T. y Ryder, O.A. (1987) “Genetic studies of blood markers in Przewalski’s horses”, *The journal of heredity*, 78 (2), pp. 75-80. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110340.
- Bowling, A.T., Zimmermann, W., Ryder, O., Penado, C. *et al.* (2003) “Genetic variation in Przewalski’s horses, with special focus on the last wild caught mare, 231 Orlitza III”, *Cytogenetic and genome research*, 101, pp. 226-234. DOI: 10.1159/000075754.
- Cieslak, M., Pruvost, M., Benecke, N., Hofreiter, M., *et al.* (2010) “Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses”, *PLoS One*, 5 (12): e15311. DOI: 10.1371/journal.pone.0015311.
- Cunningham, E.P., Dooley, J.J., Splan, R.K. y Bradley, D.G. (2001) “Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses”, *Animal genetics*, 32 (6), pp. 360-364. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2001.00785.x.
- Damgaard, P.B., Marchi, N., Rasmussen, S., Peyrot, M. *et al.* (2018a) “137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes”, *Nature*, 557, pp. 369-374. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.
- Damgaard, P.B., Martiniano, R., Kamm, J., Moreno-Mayar, J.V., Kroonen, G. *et al.* (2018b) “The first horse herders and the impact of early Bronze Age steppe expansions into Asia”, *Science*, 360 (6396): eaar7711. DOI: 10.1126/science.aar7711.
- Ewart, J. (1906) “The tarpan and its relationship with wild and domestic horses”, *Nature*, 74, pp. 113-115. DOI: 10.1038/074113a0.
- Fages, A., Hanghøj, K., Khan, N., Gaunitz, C. *et al.* (2019) “Tracking five millennia of horse management with extensive ancient genome time series”, *Cell*, 177 (6), pp. 1419-1435. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.049.
- Forrest, S. (2019) “Inventing the wild horse: The manmade history of the takhi and tarpan from 1828-2018”, en Guest, K. y Mafffeld, M. (eds.) *Horse breeds and human society: Purity, identity and the making of the modern horse*. 1ª ed. London: Routledge, pp. 133-153.
- Gaunitz, C., Fages, A., Hanghøj, K., Albrechtsen, A. *et al.* (2018) “Ancient genomes revisit the ancestry of domestic and Przewalski’s horses”, *Science*, 360 (6384), pp. 111-114. DOI: 10.1126/science.aao3297.
- Haak, W., Lazaridis, I., Patterson, N., Rohland, N. *et al.* (2015) “Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe”, *Nature*, 522, pp. 207-211. DOI: 10.1038/nature14317.
- Han, H., Zhang, Q., Gao, K., Yue, X. *et al.* (2015) “Y-single nucleotide polymorphisms diversity in chinese indigenous horse”, *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28 (8), pp. 1066-1074. DOI: 10.5713/ajas.14.0784.

Han, L., Zhu, S., Ning, C., Cai, D. *et al.* (2014) “Ancient DNA provides new insight into the maternal lineages and domestication of chinese donkeys”, *BMC evolutionary biology*, 14: 246. DOI: 10.1186/s12862-014-0246-4.

ICZN, International Commission on Zoological Nomenclature (2003). *Opinion 2027 (Case 3010): Usage of 17 specific names based on wild species which are pre-dated by or contemporary with those on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalis): conserved*. London: Bulletin of zoological nomenclature, 60, pp. 81-84.

Irwin, D.M., Kocher, T.D. y Wilson, A.C. (1991) “Evolution of the cytochrome b gene of mammals”, *Journal of Molecular Evolution*, 32 (2), pp. 128-144. DOI: 10.1007/BF02515385.

Jansen, T., Foster, P., Levine, M.A., Oelke, H. *et al.* (2002) “Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 99 (16), pp. 10905-10910. DOI: 10.1073/pnas.152330099.

Kimura, M. (1980) “A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences”, *Journal of molecular evolution*, 16 (2), pp. 111-120. DOI: 10.1007/BF01731581.

King, S.R.B., Boyd, L., Zimmerman, W. y Kendall, B.E. (2015) “Equus ferus ssp. przewalskii”, *The IUCN red list of threatened species: e.T7961A45172099*. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T7961A45172099.en.

King, S.R.B., Schoenecker, K.A., Fike, J.A. y Oyler-McCane, S.J. (2021) “Feral horse space use and genetic characteristics from fecal DNA”, *The journal of wildlife management*, 85 (6), pp. 1074-1083. DOI: 10.1002/jwmg.21974.

Kreutzmann, N., Brem, G. y Wallner, B. (2014) “The domestic horse harbours Y-chromosomal microsatellite polymorphism only on two widely distributed male lineages”, *Animal genetics*, 45 (3), p. 460. DOI: 10.1111/age.12149.

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016) “MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets”, *Molecular biology and evolution*, 33 (7), pp. 1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

Kuraku, S., Zmasek, C.M., Nishimura, O. y Katoh, K. (2013) “aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity”, *Nucleic acid research*, 41 (W1), pp. W22-W28. DOI: 10.1093/nar/gkt389.

Lau, A.N., Peng, L., Goto, H., Chemnick, L. *et al.* (2009) “Horse domestication and conservation genetics of Przewalski’s horse inferred from sex chromosomal and autosomal sequences”, *Molecular biology and evolution*, 26 (1), pp. 199-208. DOI: 10.1093/molbev/msn239.

Leonardi, M., Boschini, F., Giampoudakis K., Beyer, R.M. *et al.* (2018) “Late quaternary horses in Eurasia in the face of climate and vegetation change”, *Science advances*, 4 (7): eaar5589. DOI: 10.1126/sciadv.aar5589.

Librado, P., Fages, A., Gaunitz, C., Leonardi, M., *et al.* (2016) “The evolutionary origin and genetic makeup of domestic horses”, *Genetics*, 204 (2), pp. 423-434. DOI: 10.1534/genetics.116.194860.

Librado, P., Gamba, C., Gaunitz, C., Der Sarkissian, C. *et al.* (2017) “Ancient genomic changes associated with domestication of the horse”, *Science*, 356 (6336), pp. 442-445. DOI: 10.1126/science.aam5298.

Librado, P., Khan, N., Fages, A., Kusly, M.A. *et al.* (2021) “The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes”, *Nature*, 598, pp. 634-640. DOI: 10.1038/s41586-021-04018-9.

Libro en alemán no disponible de Volf *et al.* (1991) recogido por otros autores incluidos en la bibliografía.

Lippold, S., Knapp, M., Kuznetsova, T., Leonard, J.A. *et al.* (2011a) “Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA”, *Nature communications*, 2: 450. DOI: 10.1038/ncomms1447.

- Lippold, S., Matzke, N., Reissmann, M., y Hofreiter, M. (2011b) “Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication”, *BMC evolutionary biology*, 11: 328. DOI: 10.1186/1471-2148-11-328.
- Lister, A., Kadwell, M., Kaagan, L., Jordan, M.B. *et al.* (1998) “Ancient and modern DNA in a study of horse domestication”, *Ancient Biomolecules*, 2, pp. 267-280. DOI: 10.1038/ng1326.
- Lovász, L., Fages, A. y Amrhein, V. (2021a) “Konik, tarpan, european wild horse: An origin story with conservation implications”, *Global ecology and conservation*, 32: e01911. DOI: 10.1016/j.gecco.2021.e01911.
- Lovász, L., Korner-Nievergelt, F. y Amrhein, V. (2021b) “Grazer density and songbird counts in a restored conservation area”, *PeerJ*, 9: e10657. DOI: 10.7717/peerj.10657.
- Minetti, A. (2003) “Efficiency of equine express postal systems”, *Nature*, 426, pp. 785–786. DOI: 10.1038/426785a.
- Olsen, S.L. y Zeder, M.A. (2006) “Early horse domestication on the eurasian steppe”, en Zeder, M.A., Bradley, D., Emshwiller, E. y Smith, B.D. (eds.) *Documenting domestication: New genetic and archaeological paradigms*. Berkley: University of California press, pp. 245-269.
- Orlando, L. (2020) “Ancient genomes reveal unexpected horse domestication and management dynamics”, *BioEssays*, 42 (1): 1900164. DOI: 10.1002/bies.201900164.
- Outram, A., Stear, N.A., Bendrey, R., Olsen, S. *et al.* (2009) “The earliest horse harnessing and milking”, *Science*, 323 (5919), pp. 1332-1335. DOI: 10.1126/science.116859.
- Schubert, M., Jonsson, H., Chang, D., Sarkissian, C.D. *et al.* (2014) “Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication”, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 111 (52), E5661-E5669. DOI: 10.1073/pnas.1416991111.
- Taylor, W.T.T. y Barrón-Ortiz, C.I. (2021) “Rethinking the evidence for early horse domestication at Botai”, *Scientific reports*, 11: 7440. DOI: 10.1038/s41598-021-86832-9.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acid research*, 22 (22), pp. 4673-4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Vilà, C., Leonard, J., Götherström, A., Marklund, S., *et al.* (2001) “Widespread origins of domestic horse lineages”, *Science*, 291 (5503), pp. 474-477. DOI: 10.1126/science.291.5503.474.
- Wallner, B., Palmieri, N., Vogl, C., Rigler, D. *et al.* (2017) “Y chromosome uncovers the recent oriental origin of modern stallions”, *Current biology*, 27 (13), pp. 2029-2035. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.086.
- Wallner, B., Vogl, C., Shukla, P., Burgstaller, J.P., *et al.* (2013) “Identification of genetic variation on the horse Y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds”, *PLoS One*, 8 (4): e60015. DOI: 10.1371/journal.pone.0060015.
- Wutke, S., Sandoval-Castellanos, E., Benecke, N., Döhle, H.-J. *et al.* (2018) “Decline of genetic diversity in ancient domestic stallions in Europe”, *Science advances*, 4 (4): eaap9691. DOI: 10.1126/sciadv.aap9691.