

ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CABALLO LOCAL DE VERACRUZ, MÉXICO, USANDO MICROSATÉLITES

Domínguez-Sánchez C.^{1*}, Cervantes P.¹, Pérez-Rico A.², Delgado J.V.³, Jiménez L.M.⁴, Aguirre L.⁵, Brandariz C.⁶, Nuñez L.⁷, Cortés O.⁸, Farman S.⁹, Costa M.R.¹⁰, Kelly L.¹¹, Vega-Pla J.L.²

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México. *mvcarlosdominguez@gmail.com / ²Laboratorio de Investigación Aplicada, SGAP-Ministerio de Defensa, España. / ³Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, España. / ⁴Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Colombia. / ⁵Universidad Nacional de Loja, Ecuador. / ⁶Estación Biológica de Doñana, Sevilla, España. / ⁷Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. / ⁸Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. / ⁹The American Heritage for Horse Conservancy for the Spanish Mustang (Europe). / ¹⁰Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará, Brasil. / ¹¹Unidad de Biotecnología Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Canelones, Uruguay.

RESUMEN

El Caballo de Veracruz (CdV) podría ser considerado como una población equina autóctona de México que representa una fuerza de trabajo muy importante en las comunidades rurales. Se observa una tendencia a substituir estos caballos por otros más orientados a la monta y paseo. Conocer su estructura genética es importante para determinar el estado actual de esta población equina y el posible interés para iniciar planes para su difusión y conservación. Se utilizó sangre de 28 CdV de los cuales se obtuvo ADN para su tipificación con 21 microsatélites por medio de PCR. Estos resultados se compararon con 3 razas de difusión internacional y 7 razas criollas americanas. El análisis genético mostró una gran variabilidad cuyos valores para parámetros de diversidad genética como el número medio de alelos de 7.39 o las heterocigosidades medias esperada y observada, con valores de 0.79 y 0.78 respectivamente, son muy similares a los de las razas de difusión internacional y razas criollas americanas. Los estadísticos F ofrecieron valores de F_{IS} (0.02), F_{ST} (0.05) y F_{IT} (0.07) indicando que internamente las poblaciones son homogéneas pero que existe una diferenciación genética entre ellas. El análisis de correspondencia mostró una separación del Pura Sangre Inglés con respecto a las otras razas; y situó al CdV compartiendo espacio con la mayoría de razas comparadas. Además, el análisis de estructura genética estableció que comparte genotipos con los caballos criollos americanos, aunque algunos animales tienen influencia del Pura Sangre Inglés y del Cuarto de Milla.

Palabras clave: Equino; Biodiversidad; Marcadores moleculares; Estructura genética; Distancias genéticas.

GENETIC STRUCTURE OF THE LOCAL HORSE IN VERACRUZ, MÉXICO, USING MICROSATELLITES

ABSTRACT

The horses from Veracruz (CdV) could be considered a native equine population of Mexico which represents a major work force in rural communities. It's observed a tendency to replace these horses by horses more oriented to ride. Know his genetic structure is important in determining the current status of the equine population and the possible interest to initiate plans for dissemination and conservation. 28 CdV blood samples were collected to obtain DNA for typing 21 microsatellites by PCR. The results were compared with 3 international breed and 7 American creoles breeds. Genetic analysis showed a great variability parameters whose values for genetic diversity as the average number of alleles was 7.39, mean heterozygosities observed and expected and, with values of 0.79 and 0.78 respectively, these results was very similar between International and American Creole breeds. The statistical F values offered FIS (0.02), FST (0.05) and FIT (0.07) indicating that populations are internally homogeneous but a there are a genetic differentiation between them. The correspondence analyses showed a separation of the English Thoroughbred breed and the Arabic horses; and place the CvD sharing space with most compared breed. In addition, genetic analysis established that share genotypes with American Creole horses and although some animals have influence of the English Thoroughbred and Quarter Horse.

Keywords: Equine; Biodiversity; Molecular markers; Genetic Structure; Genetic distances.

INTRODUCCIÓN

En el siglo XVI, durante la conquista de América, Hernán Cortés desembarcó los primeros caballos de origen ibérico en el continente; los que posteriormente fueron liberados y dieron origen con su cruce natural a la raza criolla mexicana, un caballo muy similar a los Mustang norteamericanos y a los criollos sudamericanos. El CdV, es un animal rústico, de talla media, huesos gruesos, diversas capas de pelaje y carácter noble. Representa una fuerza de trabajo muy importante en las comunidades rurales del estado de Veracruz, ya que es fundamental para el trabajo en el campo; siendo usado como transporte, arriando el ganado vacuno, ovino y caprino; y como el principal ejemplar en cabalgatas. Se ha visto que estos animales tienen grandes capacidades de adaptación al ambiente agreste de la región, lo cual es importante en la situación actual de cambio climático, con fluctuaciones en la temperatura y lluvias más fuertes (Elsasser *et al*, 2012).

Hoffmann (2010) menciona que las razas locales que se adapten bien a las nuevas condiciones medioambientales pueden llegar a revalorizarse y para ello es fundamental evitar que se siga perdiendo variabilidad genética y ajustar los programas de mejora para incluir aspectos relacionados con la resistencia a enfermedades y al estrés térmico. Debido a esto han surgido grupos de investigación en Iberoamérica cuya principal misión es caracterizar las diversas razas locales y determinar sus capacidades productivas, reproductivas y adaptativas. El objetivo del presente trabajo es caracterizar genéticamente, con el uso de marcadores moleculares, una población de Caballos de Veracruz con características fenotípicas similares y determinar si es una población homogénea producto de la cruce de diversas razas que existen en el territorio Mexicano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 28 muestras de sangre de Caballos de Veracruz (CdV) obtenidas al azar en el Municipio de Veracruz, México. Los resultados se comparan con el mismo número de muestras de 3 razas de difusión internacional: Pura Sangre Inglés (PSI), Árabe (PRá) y el Pura Raza Español (PRE) y 8 razas criollas americanas: Criollo de Ecuador (CCE), Caballo de Vaquería de Casanare, Colombia (CVC), Marajoara de Brasil (MJ), Criollo Paraguayo (PGY), Criollo Uruguayo (URU), Cuarto de Milla Norte Americano (QH) y Spanish Mustang (SMU). Se extrajo el ADN y se amplificaron mediante la técnica de PCR 22 microsatélites recomendados por la FAO (2011): AHT4, AHT5 (Binns *et al.*, 1995), ASB2, ASB17 (Breen *et al.*, 1997), ASB23 (Lear *et al.*, 1999), HMS3, HMS6, HMS7 (Guérin *et al.*, 1994), HTG4 (Ellegren *et al.*, 1992), TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY341, TKY394 (Tozaky *et al.*, 2001) y VHL20. Para la identificación de los fragmentos de PCR se usó una muestra estándar y una de referencia en cada tanda de muestras. Los alelos se observaron mediante electroforesis en un secuenciador ABI 377XL (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Se calcularon las frecuencias alélicas, el número medio de alelos (NMA), las heterocigosidades esperada (H_e) y observada (H_o) mediante el programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001) y la riqueza alélica y los valores de los estadísticos F con el programa FSTATS v 2.9.3.1 (Goudet, 1995). Las muestras fueron analizadas con el método en cadena de Markov para determinar el equilibrio Hardy-Weinberg para cada microsatélite usando el paquete informático GENEPOP v. 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). El árbol de distancias de Nei se realizó con la metodología Neighbor-joining mediante el programa TREVIEX v. 1.6.6 (Page, 2001). Se usó el software STRUCTURE v.2.1 para calcular los clústeres de $K=2$ a $K=6$ (Pritchard *et al.*, 2000). Se realizaron 300.000

interacciones iniciando con 50.000 de calentamiento y un total de 10 repeticiones por cada clúster K. Para determinar el número agrupaciones adecuadas se usó el Método Evanno (Evanno *et al.*, 2005). El análisis factorial de correspondencia (Lebart *et al.*, 1984) se realizó para evaluar la relación entre el CdV y las otras poblaciones usando el módulo “AFD sub populations” del software Genetix v. 4.02. (Belkhir *et al.*, 2004)

RESULTADOS

Diversidad de microsatélites y desequilibrio Hardy-Weinberg

Todos los microsatélites presentan altos niveles de polimorfismo en las poblaciones analizadas, mostrando un mínimo de 10.81 alelos para TKY343 y un máximo de 18.46 alelos para el TKY294; con una media de 14.21 alelos por locus. Las heterocigosidades esperada (H_e) y observada (H_o), y el número medio de alelos (NMA) se muestran en la tabla I.

Tabla I. Variabilidad genética estimada para las diferentes poblaciones de razas equinas (*Genetic variability for different populations of equine breeds*).

Raza ¹	Tamaño de muestra	Heterocigosidad esperada (DE)	Heterocigosidad observada (DE)	Nº Alelos (DE)
CdV	28	0,7872 (0,0125)	0,7815 (0,0169)	7,41 (1,47)
PRá	28	0,6635 (0,0208)	0,6587 (0,0191)	5,73 (1,28)
PRE	28	0,7455 (0,0195)	0,7041 (0,0184)	6,95 (1,36)
PSI	28	0,7380 (0,0125)	0,7354 (0,0178)	5,23 (1,02)
CCE	30	0,8005 (0,0109)	0,7869 (0,0166)	8,18 (1,87)
CVC	29	0,7916 (0,0200)	0,8118 (0,0167)	7,68 (1,53)
MJ	30	0,7852 (0,0141)	0,7731 (0,0163)	7,50 (1,57)
PANA	30	0,8008 (0,0102)	0,7743 (0,0168)	8,10 (1,67)
PGY	30	0,7963 (0,0135)	0,7821 (0,0170)	8,20 (1,94)
QH	30	0,7716 (0,0131)	0,7841 (0,0164)	7,29 (1,42)
SMU	30	0,7888 (0,0210)	0,7692 (0,0168)	7,50 (2,26)
URU	30	0,7417 (0,0209)	0,6534 (0,0198)	7,10 (1,76)

DE. Desviación estándar. ¹Abreviación de raza: CdV, Caballo de Veracruz; PRá, Pura Raza Árabe; PRE, Pura Raza Español; PSI, Pura Sangre Inglés; CCE, Criollo Ecuatoriano; CVC, Caballo de vaquería de Casanare, Colombia; MJ, Marajohara; PANA, Criollo panameño; PGY, Criollo Paraguayo; QH, Cuarto de Milla Norteamericano; SMU, Spanish Mustang; URU, Criollo Uruguayo

Se detectó una media de 7.24 alelos por población, siendo el PRá y el PSI las razas con menor número de alelos (5.73 y 5.23, respectivamente) y el CCE y PGY las mayor número (8.18 y 8.20, respectivamente). De los 22 marcadores analizados, el

CdV presenta 6 en desequilibrio Hardy-Weinberg, el resto de poblaciones presentan todos los marcadores en equilibrio.

Diferencia entre razas y distancias genéticas

Los valores medios para los estadísticos F y sus intervalos de confianza al 95% obtenidos de 10000 'bootstraps' fueron $F_{IS}= 0.02$ (0.005 – 0.033), $F_{ST}= 0.05$ (0.045 – 0.058) y $F_{IT}=0.07$ (0.055 – 0.086), indicando que cada población es homogénea entre sí, pero que existe una diferenciación genética entre ellas. El árbol de distancias de Nei (Figura 1) mostró una alta relación entre el QH y el PSI, así como entre el URU y el PGY, con un acoplamiento igual en el 99% usando 1000 repeticiones. El CdV se agrupa próximo al SMU (33%) y las razas de difusión internacional (66%).

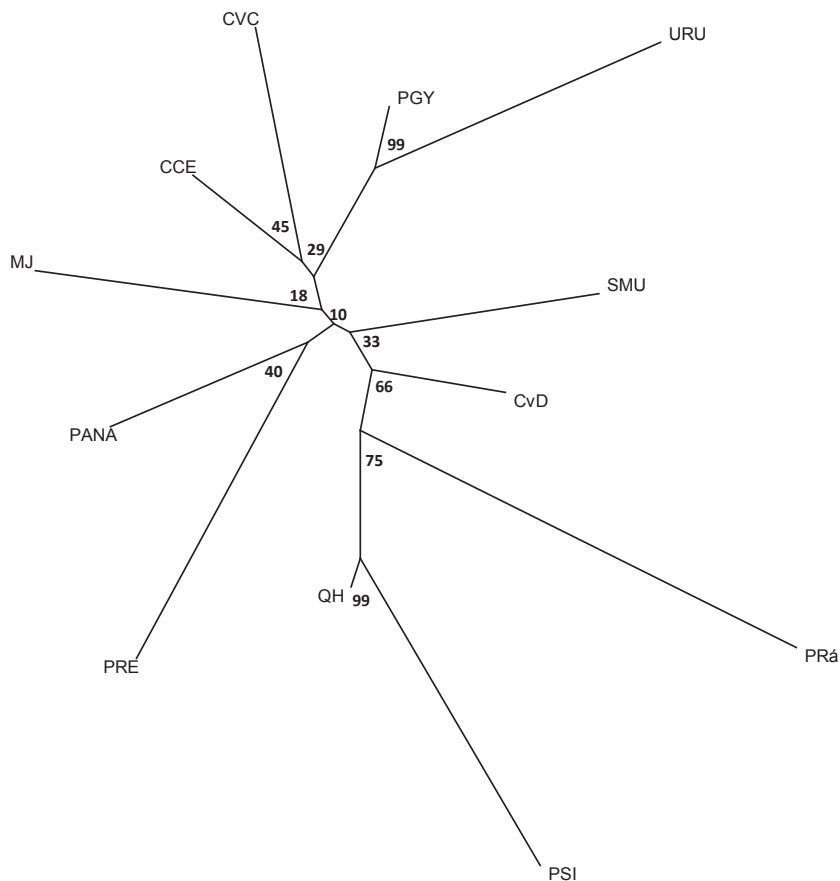


Figura 1. Árbol de distancias D_A de las 12 poblaciones equinas. Los números indican el porcentaje de repeticiones en 1000 interacciones de bootstraps (D_A distances tree from 12 equine populations.

The numbers indicate the percentage of repetitions in 1000 bootstraps interactions).

El análisis de correspondencia se realizó para detectar la relación entre el CdV y el resto de las poblaciones (Figura 2). El primer y segundo eje explican la distribución espacial de las razas comparadas en un 32.39%, demostrando una separación del PSI y el PRá con respecto a las otras razas; y sitúo al CdV compartiendo espacio con la mayoría de razas comparadas.

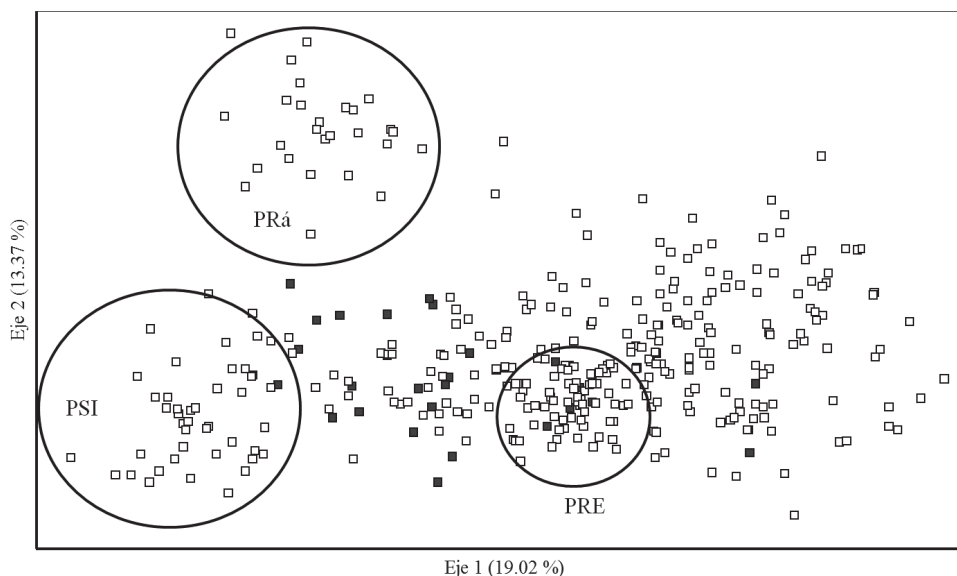


Figura 2. Representación gráfica de los dos primeros ejes del análisis factorial de correspondencia, comparación del Caballo de Veracruz (negro), con las demás poblaciones (blanco) [*Graphical representation of the two first axes from the factorial correspondence analysis, comparison between the horse from Veracruz (black) and the other populations(white)*].

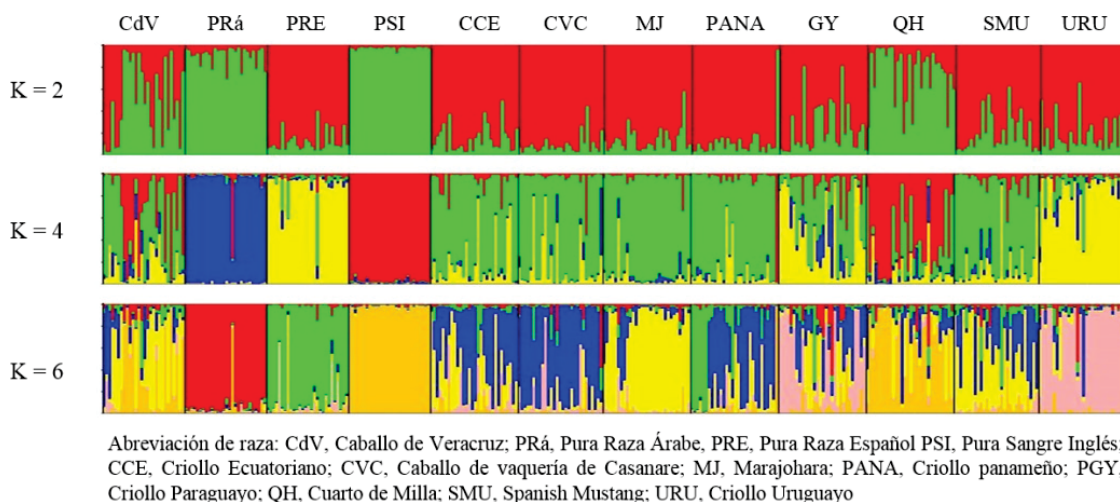


Figura 3. Gráfico de matrices-Q individuales para K = 2 a K = 6 (*Graph of individual Q-matrices for K = 2 to K = 6*).

El análisis de estructura genética mostró que los Clústeres K=2 a K=6 (Figura 3), producen resultados consistentes de agrupación de las poblaciones. K=2 indica la presencia de 2 distintos clústeres correspondientes a los caballos criollos y a los caballos de difusión internacional como el PSI y el PRá donde se aprecia su influencia en el QH y en el CdV. Para K = 4 a K = 6, la asignación reflejó una estructura genética diferenciada de las razas y estableció que el CdV comparte genotipos con los caballos criollos americanos, aunque algunos animales tienen influencia del Pura Sangre Inglés y del Cuarto de Milla que se explota en la región.

DISCUSIÓN

No se conocen estudios previos del Caballo de Veracruz con microsatélites. Los 22 marcadores estudiados son polimórficos y los valores de los parámetros de diversidad genética encontrados son similares en las 12 poblaciones estudiadas y a otras reportadas por otros autores (Aberle *et al.*, 2004; Cañon *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2009; Plante *et al.*, 2007). El número medio de alelos y la riqueza alélica media están altamente correlacionados ($r=0,99$) y junto con las heterocigosidades esperada y observada son ligeramente mayores en esta población que en las razas internacionales de referencia tipificadas y sin embargo muy similares a las criollas; todo ello indica que la población expresa una buena variabilidad alélica. Los valores de los estadísticos F indican una discreta diferenciación genética entre las poblaciones. El análisis de correspondencia indica de forma gráfica que hay una dispersión grande de los CdV, diferenciándose de las razas PSI y PRá; y relacionándose con las otras poblaciones de estudio, en los dos primeros ejes. Por otro lado el Fis no es significativamente diferente de cero (IC 95%) lo que se interpreta que a pesar de expresar una buena variabilidad genética, la muestra es homogénea y carece de exceso o defecto de heterocigotos, lo que puede ser compatible con un sistema de rotación de reproductores adecuado y una muy baja influencia de reproductores ajenos a esta población. Sin embargo, los análisis de correspondencia y sobre todo el de la estructura genética, indican que en algún momento se han utilizado reproductores derivados del PSI y/o del QH y aún se encuentran ejemplares que conservan una gran influencia de otras razas diferentes a los caballos americanos.

CONCLUSIONES

La muestra del Caballo de Veracruz exhibe una elevada diversidad genética dentro de una gran homogeneidad. Es una población equina autóctona que surge de la adaptación de los caballos de la zona al trabajo rural demostrando sobriedad y rusticidad. Esta población no está sometida a ningún control reproductivo por lo

que representa una adaptación de la población local junto con las contribuciones de cruces de otras razas foráneas con más o menos éxito. Todo indica que no está sufriendo introducciones de reproductores de otras razas y por lo tanto tiene un futuro prometedor si se empieza a gestionar como una raza local autóctona de México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca mixta otorgada para la realización de la estancia académica en la Universidad de Córdoba, España. A la Universidad Veracruzana, México, Universidad de Córdoba, España y al Laboratorio de Investigación Aplicada de Cría Caballar, España.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle K.S., Hamann H., Drögemüller C. & Distl O., 2004. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Anim. Genet.* 35, 270–277.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). [WWW Document]. *Genet. Introd.* URL <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm> (accessed 11.5.11).
- Breen M., Lindgren G., Binns M.M., Norma, J., Irvin, Z., Bell, K., Sandberg, K. & Ellegren, H. (1997) Genetical and physical assignments of equine microsatellites – first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 8, 267–73.
- Binns M.M., Holmes N.G., Holliman A. & Scott A.M. (1995) The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in Thoroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal* 151, 9–15.
- Cañon J., Checa M.L., Carleos C., Vega-Pla J.L., Vallejo M. & Dunner S., 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet.* 31, 39–48.
- Ellegren H., Johansson M., Sandberg K. & Andersson L. (1992) Cloning of highly polymorphic microsatellites in horse. *Animal Genetics* 23, 133–42.
- Elsasser T., Li C., Shaffer J. & Collier J. 2012. Effects of Environment on Animal Health: Mechanisms and Regulatory Inputs. Pp 129 – 164. En: *Environmental Physiology of Livestock*, 1era ed., (Ed. Collier, R. y Collier, J.) John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- FAO. 2011. Molecular genetics characterization of animal resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. No 9. Rome
- Goudet J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.

- Guerin G., Bertand M. & Amigues Y. (1994) Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HMS8. *Animal Genetics* 25, 62.
- Hoffmann I. 2010. Climate change and the characterization, breeding and Conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41 (1): 32–46.
- Lear T.L., Brandon R., & Bell K. (1999) Physical mapping of ten equine dinucleotide repeat microsatellites. *Animal Genetics* 30, 235.
- Lebart, L., Morineau, A. & Warwick K.M., 1984. Multivariate descriptive statistical analysis: correspondence analysis and related techniques for large matrices. Wiley.
- Leroy, G., Callède, L., Verrier, E., Mériaux, J.-C., Ricard, A., Danchin-Burge, C. & Rognon, X., 2009. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. *Genet. Sel. Evol.* 41, 5.
- Park S.D.E., 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin.
- Plante Y., Vega-Pla J.L., Lucas Z., Colling D., de March B. & Buchanan, F., 2007. Genetic diversity in a feral horse population from Sable Island, Canada. *J. Hered.* 98, 594–602.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Raymond M. & Rousset F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–9.
- Tozaky T., Kakoi H., Mashima S. Hirota K., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N. & Tomita M. (2001) Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 63, 1191–7.