



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN ZOOTECNIA Y GESTIÓN SOSTENIBLE**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN  
EQUINA MARISMEÑA Y SU RELACIÓN CON OTRAS  
POBLACIONES EQUINAS MEDIANTE MICROSATÉLITES**

**MONTSERRAT PABLO GÓMEZ**



**CÓRDOBA 2017**

TITULO: **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EQUINA  
MARISMENA Y SU RELACION CON OTRAS POBLACIONES  
EQUINAS MEDIANTE MICROSATELITES**

AUTOR: *Montserrat Pablo Gómez*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN ZOOTECNIA Y GESTIÓN  
SOSTENIBLE**

**Línea de Producción, Economía y Gestión Genética Animal**

**TÍTULO**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EQUINA  
MARISMEÑA Y SU RELACIÓN CON OTRAS POBLACIONES  
EQUINAS MEDIANTE MICROSATÉLITES**

**PRESENTADO POR**

**MONTSERRAT PABLO GÓMEZ**

**Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba**

**Córdoba, 2017**

*“La ciencia no sirve sino para darnos una idea de cuan vasta es nuestra ignorancia.”*

Félicité de Lamennais (1782-1854) *Escritor religioso francés.*



### **TÍTULO DE LA TESIS:**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EQUINA MARISMEÑA Y SU RELACIÓN CON OTRAS POBLACIONES EQUINAS MEDIANTE MICROSATÉLITES**

**DOCTORANDO/A:** MONTSERRAT PABLO GÓMEZ

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El planteamiento de la Tesis doctoral es la caracterización genética de la población con marcadores moleculares (microsatélites) y mediante análisis estadísticos conocer la estructura interna de la raza así como sus relaciones con otras razas equinas. También proporcionar una herramienta que permita establecer criterios de selección de reproductores para futuras generaciones.

Derivado de las relaciones del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba con la Asociación de Ganaderos de Razas Marismeñas, se ha podido acceder a un muestreo de prácticamente la totalidad de la población. Dicho muestreo se ha podido realizar en la fiesta tradicional denominada la Saca de las Yeguas que se realiza en junio en Almonte donde se concentra la mayoría de cabezas de ganado de la Marisma.

Se han ido realizando comunicaciones en congresos con los resultados preliminares y se ha publicado un trabajo en la revista Italian Journal of Animal Science.

- Gómez, M.P., Landi, V., Martínez, A.M., Carpio, M.G., Baena, S.N., Bermejo, J.V.D., Oom, M. do M., Luis, C., Ouragh, L., Vega-Pla, J.L., 2017. Genetic diversity of the semi-feral Marismeño horse breed assessed with microsatellites. *Italian Journal of Animal Science* 16, 14–21. doi:10.1080/1828051X.2016.1241132
- Pablo Gómez, M., Landi, V., Martínez, A.M., Gómez, M., Nogales Baena, S., Delgado Bermejo, J., Vega-Pla, J., 2014. Análisis Preliminar de la Contribución a la Biodiversidad de la Raza Equina Marismeña, en: Resúmenes del Congreso de la Sociedad Española de Recursos Genéticos Animales. Palencia.
- Pablo Gómez, M., Landi, V., Vega-Pla, J., 2015. Marcadores genéticos como apoyo a la selección de reproductores de Caballo Marismeño, en: Actas Del V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba.
- Pablo Gómez, M., Martínez, A.M., Nogales Baena, S., Gómez, M., Oom, M.M., Luis, C., Landi, V., Delgado Bermejo, J., Vega-Pla, J., 2015. Relaciones genéticas del Caballo Marismeño con otras razas equinas, en: Resúmenes del Simposio Iberoamericano Sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. Villavicencio, Colombia.
- Pablo Gómez, M., Landi, V., Nogales, S., Martínez, A., Delgado, J., Vega-Pla, J., 2014. Diversidad Genética de la Raza Equina Marismeña. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* 4, 114–116.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 2 de Octubre de 2017

Firma del/de los director/es



Fdo.: Jose Luis Vega Pla



Fdo.: Vincenzo Landi

## DEDICATORIA

Para mi familia.

Esta "odisea", digna del mismísimo Homero, empezó hace ya casi 6 años en la puerta de la que fue nuestra casa, una noche de verano en la que muchas dudas, inquietudes e inseguridades flotaban en el aire, además del intenso calor del verano cordobés. Muchas cosas, incluidos nosotros mismos, han cambiado desde entonces. El motivo y el fin de este "proyecto de vida" que planeamos en ese momento también son diferentes: las aspiraciones, los sueños...nada tienen que ver ahora con lo que eran entonces, y quién sabe dónde nos llevarán. ¡Queda tanto camino por recorrer!

A Jesús, que fue el que me animó a retomar de nuevo mi carrera científica, y que, con infinita paciencia me ha tomado la mano para levantarme todas las veces que me he caído, me he quejado, todas las veces que he tenido ganas de dejarlo todo...que me ha hecho ver las cosas con perspectiva con esa visión que sólo él es capaz de transmitirme. Él ha sido mi "coach" todo este tiempo, y estoy absolutamente convencida que si no hubiera estado a mi lado, no lo habría logrado. GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE AHÍ.

A mi hijo, Jesús, porque hace que quiera ser mejor persona, y porque, siendo sólo un niño, ha sido capaz de entender el enorme sacrificio que representa embarcarse en una Tesis siendo madre. Porque jamás me ha reprochado que le robe un tiempo que le habría dedicado a él para dedicárselo a mi Tesis, porque me ha regalado algo que jamás va a recuperar...su infancia.

A mi padre, Joaquín. Te echo tanto de menos que duele. Espero que allí donde estés, te sientas orgulloso.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Director de Tesis, José Luis: todas las palabras de agradecimiento que te pueda dedicar, se quedan cortas. Porque siempre me has dejado claro que estabas ahí, para asesorarme, ayudarme, explicarme...en definitiva para llegar donde yo no llegaba; porque eres mi maestro y mi mentor. Gracias por tu confianza, aunque en algunas ocasiones yo haya sentido que ha sido inmerecida.

A la Dra. Amparo Martínez, por abrirme las puertas de su Laboratorio y de su casa, por ayudarme y guiarme en los inicios de este proyecto, cuando cursaba mi Máster. Fuiste mi primer referente cuando empezaba, y has sido mi ejemplo a seguir: madre y esposa al pie del cañón, gran e impecable científica; ojalá algún día pueda estar a tu altura.

Al Dr. Vincenzo Landi por aguantarme en las interminables y extenuantes (para mí) horas en el laboratorio, por haber sido mi amigo y compañero, además de codirigir la presente Tesis, ¡¡¡te mereces un monumento a la paciencia!!! Siempre recordaré con afecto el tiempo que pasé aprendiendo de ti.

A la Dra. Mayra Gómez y a Sergio Nogales por su ayuda recogiendo las muestras que fueron el primer paso para esta Tesis. Sin vuestro trabajo yo no estaría aquí.

A Miguelito por los buenos ratos pasados en el Laboratorio de la UCO, y por su inestimable ayuda que siempre me prestó de forma desinteresada.

A mi compañera del Laboratorio de Investigación Aplicada, Mari Carmen Martínez Parlón por el grandísimo trabajo realizado en el Laboratorio, sin su impecable trabajo, esta Tesis habría sido imposible.

Al Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo por ser una fuente de inspiración para todos sus alumnos, entre los que tengo el privilegio de poder incluirme, y por estar siempre dispuesto a escuchar y apoyar a todo el que se acerca a tocar a su puerta.

A mis compañeros del Master en Zootecnia: Ander, Diana, Gaby, Javi, María de Jesús, Lupita, Raquel...espero no dejarme a nadie, por esos fantásticos ratos que pasamos entonces que perdurarán en mi memoria para siempre.

A María Miró, mi compañera y amiga, por sus consejos y su apoyo, por darme siempre ánimos, por su mentalidad siempre positiva...y por tantas y tantas cosas...GRACIAS.

GRACIAS A TODOS los que en mayor o menor medida me habéis ayudado a realizar y terminar este trabajo, que no es sólo mío, es de TODOS VOSOTROS.

## Tabla de contenido

<i>1. INTRODUCCIÓN</i> .....	9
OBJETIVOS .....	11
<i>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i> .....	12
2.1 Introducción histórica.....	12
2.2 Espacio Natural de Doñana .....	13
2.3 Climatología de la zona.....	15
2.4 La Saca de las yeguas .....	15
2.5 Razas equinas .....	19
2.5.1 Marismeño .....	19
2.5.2 Caballo de las Retuertas .....	21
2.5.3 Hispano-Árabe.....	22
2.5.4 Mallorquina .....	23
2.5.5 Menorquina.....	24
2.5.6 Pottoka.....	25
2.5.7 Asturcón .....	25
2.5.8 Losino .....	27
2.5.9 Pura Sangre Inglés .....	28
2.5.10 Pura Raza Árabe .....	29
2.5.11 Trotador Español .....	30
2.5.12 Pura Raza Español.....	31
2.5.13 Berberisco .....	32
2.5.14 Sorraia.....	34
2.6 Microsatélites .....	35
2.6.1 Clasificación y origen.....	36
2.6.2 Aplicación de los microsatélites en genética animal.....	36
<i>3. MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	50
3.1 Poblaciones en estudio .....	50
3.2 Procesamiento y análisis de las muestras .....	51
3.3 Análisis estadístico .....	54
3.3.1 Variabilidad Intrapoblacional.....	54
3.3.2 Estructura y distancia entre poblaciones, asignación individual .....	54
3.3.3 Contribución a la diversidad.....	56
<i>4. RESULTADOS</i> .....	57

4.1 Variabilidad intrarracial de la población Marismeña. ....	57
4.2 Comparación genética de la población Marismeña con otras razas. ....	58
4.3 Estructura y distancias entre poblaciones:.....	59
4.3.1 Distancias genéticas.....	59
4.3.2 Árbol de distancias $D_A$ de Nei utilizando el método Neighbor Joining. ....	60
4.3.3 Análisis Factorial de Correspondencia. ....	62
4.3.4 Estructura genética de las poblaciones: .....	63
4.3.5 Test de asignación: .....	66
4.4 Contribución a la diversidad.....	68
4.4.1 Método de Weitzman: .....	68
4.4.2 Método de Caballero y Toro y Pétit et al.: .....	69
5. <i>DISCUSIÓN</i> .....	71
5.1 Variabilidad intrarracial de la población equina Marismeña. ....	71
5.2 Comparación genética de la población Marismeña con otras razas. ....	72
5.3 Estructura y distancias entre poblaciones. ....	72
5.3.1 Distancias genéticas. Árbol de distancias $D_A$ de Nei. (método NJ).....	72
5.3.2 Análisis Factorial de Correspondencia. ....	74
5.3.3 Estructura genética de las poblaciones (STRUCTURE) .....	75
5.4 Contribución a la diversidad. ....	75
6. <i>CONCLUSIONES</i> .....	78
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	79

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los équidos han ocupado, y sin duda aún ocupan, un lugar muy importante en el devenir histórico del hombre. Se pueden encontrar aún hoy fuertes lazos culturales asociados a razas de caballos y zonas geográficas que contribuyen a la preservación de las tradiciones locales.

La explotación equina tradicional se enfocaba principalmente al uso de las caballerías como animales de silla, tiro o enganche y muy ligados a las labores del campo para el manejo de otras especies ganaderas. En la actualidad estos usos están derivando hacia una en la práctica más lúdica e incluso deportiva en los países más desarrollados.

El Caballo Marismeño es sin duda un heredero de estas tradiciones en un entorno tan peculiar como la Marisma del Guadalquivir y el Entorno Natural de Doñana. En esta zona siempre ha habido caballos criándose en semilibertad existiendo referencias sobre los derechos de explotación de los ganaderos de Almonte y o Hinojos sobre los caballos que podían tener en propiedad pastando en semilibertad en este área tan peculiar. Una de las tradiciones que se ha conservado desde hace más de 500 años es la Saca de las Yeguas de Almonte. Se trata de recoger una vez al año el ganado disperso y reunirlo para seleccionar los ejemplares destinados a otros usos como la venta o el sacrificio, identificar y marcar los potros y cortar las crines para evitar enredos con la maleza.

El Caballo Marismeño fue evolucionando con tiempo y en la segunda mitad del siglo XX fue perdiendo su rusticidad y sobriedad a medida que su uso en el campo perdía interés y aumentaba la demanda de animales de más alzada para su monta. Algunos ejemplares se conservaron en la Reserva Biológica de Doñana derivando en lo que hoy se conoce como la raza Caballo de las Retuertas, reconocida como tal en el año 2016. Otros fueron adaptándose a las necesidades del momento, única garantía de supervivencia de este antiguo caballo, configurando el actual Caballo Marismeño, cuyo reconocimiento como raza en peligro de extinción tuvo lugar a partir del año 2003. Sin embargo, los cruzamientos indiscriminados que sufrió este caballo a finales del pasado siglo no

fueron capaces de borrar características tan típicas y necesarias como la rusticidad y sobriedad. El entorno hostil de la Marisma ha mantenido una presión de selección natural que sólo ha permitido sobrevivir a aquellos ejemplares que expresaban mejor su resistencia. Así, hoy todavía abundan caballos con una gran capacidad de adaptación a este entorno y por esa razón, y a pesar de los cruzamientos, obtuvieron el reconocimiento como raza para preservar y gestionar su futuro de forma más ordenada.

Una vez que la Asociación de Criadores de Ganado Marismeño se hace cargo de la gestión del Caballo Marismeño se plantea el reto de conseguir un caballo que tenga una oportunidad en su conservación, no como una especie zoológica, sino adaptado a los nuevos usos y costumbres de la sociedad actual, como siempre había sido, pero sin olvidar su origen e integración como parte de la Marisma y de Doñana.

Se hace necesario por lo tanto utilizar las herramientas disponibles para iniciar este apasionante proyecto de conservación del Caballo Marismeño entre las que se encuentra la caracterización genética de la población con marcadores moleculares, la selección de reproductores que cumplan mejor con las exigencias estéticas y funcionales que indique la Asociación y el apoyo del control genealógico para que el Registro de los ejemplares sea lo más fiable posible, dificultad añadida por su explotación en condiciones de semilibertad.

## **OBJETIVOS**

- 1.** Caracterizar genéticamente el Caballo Marismeño utilizando como marcadores genéticos secuencias microsátélites del ADN.
- 2.** Determinar la relación genética entre el Caballo Marismeño y el Caballo de las Retuertas.
- 3.** Evaluar la posible singularidad genética del Caballo Marismeño comparándola con otras razas autóctonas españolas, americanas y europeas.
- 4.** Analizar la estructura genética de la población y asignación individual a la raza como herramienta del programa de conservación.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### *2.1 Introducción histórica*

La tradición caballar en el área de las marismas data desde el Bajo Imperio Romano (siglos III y IV d.C). Esta tradición tuvo continuidad tras la invasión y asentamiento de los árabes y culturas norteafricanas en la Península Ibérica desde que cruzaron el estrecho en el año 711 d.C. Las yegudas musulmanas tenían un propósito exclusivamente militar.

Según los textos de la época, hay constancia de los cruces realizados para la mejora y especialización de la raza autóctona, con sangre de caballos norteafricanos, conocida como la raza árabe.

Durante la Edad Media, las yegudas exclusivamente militares dieron paso a una ganadería extensiva donde se mezclaba todo tipo de ganado: caballar, vacuno, caprino, ovino y porcino. Fue durante esa época en la que se produjo una reducción significativa de los pastos comunales y una restricción a la entrada de ganado foráneo.

En la Edad Moderna se produjo una emigración de personas importante, asociada a los viajes a las Américas, junto a las que también emigró ganado. La aportación de ganado implicó también la de los usos ganaderos que acabaron remedando el modelo marismeño, único en España por su extraordinaria adaptación ecológica a las condiciones climatológicas del trópico.

Tras la conquista del reino de Granada, el duque Don Juan (1466-1507), segundo de la Casa de Medina Sidonia, se dispuso a reorganizar sus posesiones territoriales, que comprendían un área de aproximadamente 6000 km<sup>2</sup>. Una de las medidas más importantes que tomó fue la publicación de las Ordenanzas Ducales del año 1504, cuyas disposiciones se mantuvieron vigentes como leyes locales hasta el s. XIX.

A pesar de su extinción, algunos usos tradicionales relativos a los aprovechamientos agropecuarios de aquellas viejas ordenanzas, siguen sustancialmente vivos en nuestros pueblos.

Durante la Edad Moderna hubo varios pleitos por los pastos almonteños. Tras su resolución diplomática, el ganado marismeño empezó a sentar un precedente que, con los años, se volvió en uso y disfrute pacífico y que tuvo continuidad en el s. XVIII, con sus más y sus menos, y sus tiras y aflojas con la Casa Ducal.

En el año 1900 se produjo la venta del Coto de Doñana a Guillermo Garvey, lo que implicó una reordenación productiva del coto hacia la caza deportiva y afectó muy negativamente al pastoreo del ganado equino, que fue disminuyendo paulatinamente.

Al llegar los años sesenta, un cambio de mentalidad se hace patente en todas las políticas internacionales. El conservacionismo se pone de moda, y la comunidad internacional pone sus ojos en las Marismas del Guadalquivir. En 1963 se crea la Reserva Biológica de Doñana, y en 1969, por Real Decreto 2412 de 16 de Octubre, el Parque Nacional de Doñana, que incluye los terrenos de Almonte, Hinojos y Aznalcázar. Las yeguas tienen que compartir a partir de ese momento los espacios protegidos y conviven formando parte de sus ecosistemas. La competencia entre el ganado, y los animales salvajes por los recursos alimenticios, a menudo ha sido fuente de conflicto. Su permanencia en las marismas será regulada a partir de ese momento por este organismo estatal.

La carga ganadera del Parque Nacional de Doñana ha ido disminuyendo con el tiempo, la actividad ganadera, principalmente yeguar y vacuna, ha dejado de ser considerada molesta y no deseable para pasar a ser vista como un aprovechamiento tradicional compatible con la conservación.

En febrero de 1982 se crea en Almonte la Asociación de Criadores de Ganado Marismeño, cuyos fines, en líneas generales, son los siguientes:

- Defender los intereses de los asociados.
- Velar por la continuidad de la raza autóctona marismeña, tanto la vacuna como la equina.
- Mejorar genéticamente la raza, controlando la introducción de sementales.
- Adquisición de sementales selectos para la mejora de la raza.
- Conseguir que los terrenos en los que tradicionalmente han pastado estos animales se mantengan con igual dedicación y superficie.
- Recabar los medios económicos y gestionar la base territorial que posibilite el pasto de los animales en épocas adversas.

De todos los asociados, unos 420 son criadores de yeguas marismeñas.

## *2.2 Espacio Natural de Doñana*

La raza equina Marismeña, se desenvuelve en lo que, desde la aplicación de la Ley de creación del Espacio Natural de Doñana 8/1999 de 27 de octubre, integra el Parque Nacional de Doñana y al Parque Natural de Doñana en un espacio único llamado Espacio

Natural de Doñana, exceptuando la Reserva Biológica de Doñana que la ocupa el Caballo de las Retuertas. Su superficie total son 108087 Ha, de las cuales 54.252 Ha son del Parque Nacional, y 53.835 Ha son de Parque Natural.

El territorio comprende la llamada Comarca de Doñana: Se distribuye en tres provincias: Huelva, Sevilla y Cádiz, y comprende los municipios de: Almonte, Bollullos Par del Condado, Bonares, Hinojos, Lucena del Puerto, Moguer, Palos de la Frontera y Rociana del Condado (Huelva); Aznalcázar, Isla Mayor, Pilas, La Puebla del Río y Villamanrique de la Condesa (Sevilla); Sanlúcar de Barrameda (Cádiz).

El Espacio Natural de Doñana es muy variado en lo que se refiere a ecosistemas representados, muchos de ellos protegidos y únicos, de gran riqueza: Lagunas y marismas costeras, dunas móviles, playa, matorral mediterráneo y pinar, dunas fósiles y marismas transformadas. Algunos de ellos son fruto de la intervención humana prolongada, no son todos ecosistemas naturales: las cadenas de dunas, los pinares y la propia marisma son algunos ejemplos de ello.

Está integrado en numerosas redes de conservación:

*Parque Nacional de Doñana:*

- Reserva de la Biosfera, (Programa MaB - UNESCO)
- Humedal de importancia internacional por el Convenio de Ramsar
- Diploma del Consejo de Europa a la Conservación Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA).
- Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO

*Parque Natural de Doñana:*

- Reserva de la Biosfera, (Programa MaB - UNESCO)
- Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA)
- Lugar de Importancia Comunitaria (LIC)
- Humedal de importancia internacional por el Convenio de Ramsar

(fuente: [www.donana.es](http://www.donana.es), [www.juntadeandalucia.es](http://www.juntadeandalucia.es), [www.mapama.gob.es/es/](http://www.mapama.gob.es/es/) )

Todo esto hace que tanto el entorno, como la fauna y flora que encontramos, tanto salvaje como doméstica se conviertan en un patrimonio de valor incalculable, que es necesario conservar y proteger.



Figura 1. Mapa del Espacio Natural de Doñana. Fuente: [www.donana.es](http://www.donana.es)

### 2.3 Climatología de la zona

Castroviejo (1993) define el clima de Doñana como mediterráneo con influencias oceánicas, o mediterráneo subhúmedo con influencia atlántica. Se trata de un clima suave, de temperaturas suaves durante todo el año (la temperatura máxima media es de 24,3°C, y la mínima media es de 14,1°C), con inviernos húmedos y veranos secos.

Las precipitaciones se concentran en determinados meses del año, lo que hace que el clima se limite a dos estaciones: la seca, de abril a septiembre, y la húmeda, de octubre a marzo. El verano se caracteriza por tener de 3 a 5 meses de aridez, lo que produce una carencia importante (en ocasiones dramática) de agua.

Las lluvias varían mucho de unos años a otros: hay años muy secos, que no alcanzan los 200 l/m<sup>2</sup> y otros muy húmedos, con precipitaciones que superan los 1000 l/m<sup>2</sup>.

### 2.4 La Saca de las yeguas

La Saca de las Yeguas es una tradición muy vinculada al ganado equino y a las localidades de Almorte y El Rocío, que cuenta con más de 500 años de antigüedad. El número de espectadores de la Saca de las Yeguas ha ido en aumento, sobretudo en la

fase que sucede en la aldea del Rocío, una de las más vistosas y emotivas. La Saca de las Yeguas ha dejado de ser un evento únicamente ganadero, para pasar a ser un fenómeno social.

A lo largo de cientos de años, algunos grupos de vecinos de las localidades que rodean las marismas, y particularmente de Almonte, habían ido perfilando un singular sistema de manejo del ganado que permitiera aprovechar los pastos que ofrecían estas tierras. Siguiendo una bien articulada estrategia de cría extensiva, perfectamente adaptada a sus ciclos ecológicos (Jordan, 1993), los ganaderos de Almonte dejan que sus yeguas y sus vacas anden a su aire y sobrevivan por sí mismas en las Marismas, un ambiente hostil que pasa de ser un lago superficial a convertirse en un erial cuarteado en pocos meses. Su interferencia en la vida de los animales es reducida y se concentra, principalmente, en torno a un rodeo anual conocido por la Saca de las Yeguas, en el que la mayoría de los animales, especialmente las hembras y sus potros, es reunida y después trasladada hasta Almonte pocos días antes de la Feria patronal de San Pedro para la tusa, el herrado y la compra-venta (Murphy 1987; González Faraco y Murphy 1999a). El término “tusa” es una palabra arcaica que hace referencia al acicalado de las crines de los animales, concretamente al corte del pelo de la cola y del cuello, para evitar que los animales se enreden las crines, se las llenen de barro y puedan herirse accidentalmente durante el año. La Saca, como otras actividades ganaderas en la Marisma, ha ido evolucionando hasta adquirir una compleja configuración cultural en la que muchos elementos han sido incorporados muy recientemente. Todas estas novedades, más o menos intencionalmente planeadas y ejecutadas, se han revelado muy eficaces para preservar esta actividad pecuaria en momentos de agudo cambio social en estas comunidades y de frecuentes crisis en sus relaciones con la Administración del Parque (Murphy y Gonzalez Faraco, 2002)

Salvo las *rapas das bestas* que se celebran en algunos lugares de la Galicia rural (Cabada Castro, 1992) y algunos otros ejemplos en el norte del país, nada parecido a la Saca de las Yeguas de las Marismas de Doñana resta ya en nuestra geografía.

Cada 26 de junio los yegüerizos de Almonte, tras pasar una noche al raso entre animados coloquios y evocaciones nostálgicas (Pérez Martínez, 1992), alguna que otra copla y más de un trago de vino, desmontan los improvisados y escuetos campamentos instalados en la vera, en las vetas y en otros puntos del llano marismeño, y, desde allí, en pequeños grupos, salen para localizar las yeguas que andan dispersas. El laborioso rodeo de los animales pone a prueba la habilidad de los jinetes, que se sirven de una vara de medianas

proporciones o chivata para arrearlos. Poco a poco, conforme el sol va saliendo, se van formando grupos de caballos cada vez más grandes. Desde el Sur, en las Marismillas o en las Nuevas, o desde la Marisma de Hinojos, jinetes y animales se van encaminando hacia el Norte de la Marisma levantando una densa polvareda.

En ciertos puntos específicos de la Marisma se van congregando las primeras tropas para ir, poco a poco, confluyendo en las playas del Rocío, a la vista de la ermita de la Virgen. Es allí donde se concentra el grueso del ganado y es entonces cuando se termina por decidir —labor que ya en gran parte se ha realizado marisma adentro— qué animales deben seguir viaje hasta Almonte y cuáles deben permanecer en la Marisma. No es tarea sencilla apartar del grupo a aquellos que han de quedarse; el instinto gregario de estos animales es muy fuerte. Las carreras se suceden y la manada, inquieta, se agita y llena el aire de relinchos.

Los yegüerizos, con la cabeza protegida del sol con un pañuelo ajustado bajo la gorra, toman posiciones alrededor de cientos de yeguas que apenas se entrevén en medio de las nubes de polvo. Muchos espectadores se acercan, a prudente distancia, a ver el vibrante espectáculo del rodeo. Hasta hace pocos años, presenciarlo era mucho más difícil, puesto que las operaciones finales se realizaban en el interior de la Marisma de Hinojos y las yeguas, ya seleccionadas, seguían una ruta distante de la Aldea del Rocío para tomar el Camino de los Tarajales y, por fin, llegar a Almonte. Desde hace algunos años, la «Aldea Sagrada» (González Faraco y Murphy, 1999b) se ha convertido también en escenario principal de la Saca. A última hora de la mañana, precedidas por una hilera de yegüerizos, las yeguas entran en las arenosas calles del Rocío y, tras un último agrupamiento, son conducidas al trote hacia el santuario. Allí, desde una de las puertas, abierta de par en par, mientras las yeguas pasan, un sacerdote reza una oración y bendice a jinetes y animales. Terminado este acto, al que asisten muchas personas, las yeguas emprenden viaje, por alguna de las rutas tradicionales, hacia la villa de Almonte. La entrada por las calles de Almonte es esperada por una muchedumbre que ocupa esquinas y aceras a lo largo de todo el recorrido por el pueblo. La Feria de San Pedro está al caer y el Chaparral, un llano arbolado que sirve de recinto ferial, ya está engalanado con farolillos y luces, y su perímetro ya lo ocupan las casetas. Las yeguas, divididas en tropas de unas decenas de cabezas, van circulando entre la gente.

La mayoría de los animales termina en unos corrales, dentro de un recinto ganadero municipal que está a las afueras del casco urbano, donde, al día siguiente, tendrá lugar la tusa: el corte de las crines y las colas para evitar que, de nuevo en la Marisma, su

abundante pelo se enrede en las alambradas o en los altos matorrales espinosos. Los potros nuevos, tras una dura pugna por separarlos de sus madres en un corral atestado de yeguas, serán marcados a fuego por sus propietarios. En los mismos corrales o en la improvisada cantina, construida a semejanza de las casetas populares de la feria, tienen lugar los tratos de compra-venta en un ambiente festivo. Desde hace algunos años, se vienen celebrando concursos morfológicos para premiar la «autenticidad racial» del ganado, en los que viejos yegüerizos y técnicos cualificados clasifican y evalúan, siguiendo un supuesto patrón morfológico óptimo, a aquellas yeguas que optan a los premios. Este empeño por recuperar las señas del ganado marismeño autóctono se une a una variada gama de tácticas culturales, tanto en la Saca como en el conjunto de la cría del ganado, cuyo sentido es el de reforzar su carácter de tradición local, cuando su función económica es ya residual y se acentúa el control de las áreas de pasto por parte de las autoridades conservacionistas. El objetivo no es otro que resistir y enfrentar este proceso de acciones restrictivas sobre la actividad y la misma presencia de los ganaderos almonteños y de los vecinos del pueblo en general, en las Marismas protegidas (Murphy y Gonzalez Faraco, 2002).

Los caballos se han convertido en un elemento central de la cultura de la comunidad, han dejado de ser una actividad primordialmente económica (aunque quizás se debería empezar a ver al caballo como un atractivo turístico cuya explotación habría que pensarse valorar) para convertirse en un fenómeno social y cultural, recreativo, e incluso religioso, pues en la Saca de las Yeguas se bendice a los animales a su paso por la Ermita de la Virgen del Rocío.

Como consecuencia de estas prácticas culturales, la cría de yeguas marismeñas parece haber logrado esquivar su desaparición como actividad en el interior del Parque Nacional y asegurar su permanencia en condiciones de regulación aceptables para los ganaderos. Sin embargo ha sido inevitable que los caballos marismeños también se adaptasen a los tiempos modernos, ha sido el precio que ha habido que pagar para mantener las tradiciones vivas. Cada ganadero dispone de un cupo muy pequeño de caballos, fundamentalmente yeguas que puedan pastar en los terrenos del Parque Nacional, esto significa que hay multitud de propietarios. Cada propietario siempre ha elegido los sementales que entendía que eran más apropiados para sus intereses ya que nunca hubo un plan de cubrición conjunto. Los ganaderos tradicionales saben que no pueden introducir razas de caballos foráneas en el Parque Nacional pues éstas no se desarrollan bien en las

condiciones tan duras y peculiares del mismo, pero también saben que manteniendo un porcentaje alto de sangre marismeña consiguen obtener animales más altos y vistosos sin renunciar a la rusticidad que asegura la supervivencia de los mismos en estado de semilibertad en la marisma. Así, durante los últimos 30 años ha habido un cruce incontrolado de las yeguas marismeñas con sementales de diferentes razas, mayoritariamente Pura Raza Española. Este cruzamiento se ha enfocado principalmente al interés de mejorar la alzada y el carácter de forma que puedan destinarse estos caballos a la monta, sobre todo en las grandes fiestas de la zona como el Rocío donde llegan a concentrarse varias decenas de miles de caballos. De todas formas hay que ver positivamente estos cruces pues han permitido seguir manteniendo las actividades ecuestres asociadas a las tradiciones y a la cultura. Quizás el antiguo caballo de las marismas no hubiese tenido ninguna oportunidad si se hubiera mantenido tal como se recuerda, un caballo muy rústico y sobrio acostumbrado a una vida en semilibertad que lo hacía poco atractivo para su uso como caballo de silla. Tal es el caso del Caballo de las Retuertas, un grupo de ejemplares de caballos procedentes de los antiguos caballos marismeños que por encontrarse en la Reserva Biológica de Doñana, se han mantenido aislados de las influencias de otros caballos luchando por sobrevivir, algo que queda garantizado ya que son titularidad del Estado a través del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en concreto pertenecen a la Estación biológica de Doñana.

## *2.5 Razas equinas*

### **RAZAS AUTÓCTONAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**

#### 2.5.1 Marismeño

Recibe su nombre del área geográfica donde tradicionalmente se ha localizado a esta raza, las marismas del Parque Nacional de Doñana, en el municipio de Almonte (Huelva), perteneciente a la Comunidad Autónoma de Andalucía. Originada a partir de los caballos primitivos que habitaban en las marismas del río Guadalquivir, a lo largo de su evolución ha sufrido cruces con otras razas, fundamentalmente del norte de África. Algunos autores la mencionan como la forma ibérica de donde derivan los caballos americanos, al ser llevada a América en los viajes de Cristóbal Colón, y de donde procedería el antiguo Caballo Andaluz. Las labores de recuperación y caracterización de esta raza se iniciaron

en el año 2003. El Catálogo Oficial de Razas de Ganado incluye a la raza equina Marismeña en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

Es una raza eumétrica, de perfil subconvexo y proporciones corporales sublongilíneas. Conformación robusta y armónica en ambos sexos. Cerca de tierra. De cabeza algo grande, cuello corto, tronco profundo, vientre voluminoso y extremidades medianas y finas. Carácter equilibrado, apacible, pero vivo y resuelto en el trabajo. De gran resistencia y rusticidad. Movimientos elevados y seguros, rápido paso y facilidad para la concentración. La alzada a la cruz se sitúa en un rango medio que varía entre 140 y 148 cm. Existe una gran variedad de capas, siendo más frecuentes las tordas, castañas y negras.

Su distribución se corresponde con las marismas del Parque Nacional de Doñana en Huelva, de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

La organización social de los caballos marismeños en Doñana sigue el esquema del "harén": un semental encabeza un grupo de hembras con sus crías. Mc Cort (1984: 494-495) cita otras dos modalidades de agrupamiento también relativamente típicas: los grupos con varios machos y hembras, y los grupos de machos sin hembras, que, aunque son menos frecuentes, también se pueden ver.

El sistema de explotación es pastoreo en libertad en las zonas de las marismas del Guadalquivir en el Parque Nacional de Doñana. Los animales se recogen en corrales una vez al año, durante la Saca de las yeguas, para realizar las labores de manejo básicas, lo cual debido al carácter asilvestrado de la población presenta cierta dificultad. Ese día, que tradicionalmente coincide con el 26 de junio, se realiza una feria que gira alrededor del fomento del caballo marismeño.

Los caballos marismeños pastan por fincas públicas, aunque todos los animales de esta raza, son de propiedad privada. Cada ganadero tiene unos 2 o 3 caballos, normalmente yeguas, en propiedad por los que pagan una tasa anual que les permite tener a sus animales alojados en las fincas del Parque. Esta particularidad ha dificultado la adopción y puesta en práctica de estrategias de cría y selección de la raza hasta la creación de la Asociación.

El ganado asilvestrado en Doñana se ha considerado como intruso durante décadas por los conservacionistas, y probablemente ha sido el motivo por el que se ha obviado su estudio durante tanto tiempo. Este hecho no deja de ser algo contradictorio, pues la ganadería, y sobre todo la equina, ha sido y sigue siendo una actividad ancestral en Doñana.

Cabe destacar que el ganado caballar casi ni se nombra en la información turística que se puede encontrar en los medios de comunicación o en internet donde se promueven y se publicitan las actividades que se realizan en el Parque.

Al caballo Marismeño no se le ha prestado mucha atención desde un punto de vista racial hasta hace poco tiempo por lo que ha sido sometido a cruces con distintas razas principalmente el Pura Raza Español aunque también han participado sementales de otras tales como el Bretón, el Árabe, el Anglo-Árabe o el Pura Sangre Inglés (Fernandez Rodriguez et al., 2010).

#### 2.5.2 Caballo de las Retuertas

El Catálogo Oficial de Razas de Ganado incluye, desde Julio del año 2016, según la Orden AAA/1357/2016 de 29 de julio por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre al Caballo de las Retuertas en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción. La Estación Biológica de Doñana, Instituto de Investigación perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, gestiona 10.000 ha de terreno en el interior del Parque Nacional de Doñana (Reservas Científicas o Reserva Biológica de Doñana). En ellas se mantiene una pequeña población equina denominada Caballo de las Retuertas. Toda la cabaña de esta raza es de propiedad pública (en contraste con los de raza Marismeña, que son de propiedad privada). Estos animales viven completamente asilvestrados, y algunos de ellos no se capturan ni siquiera una vez al año; no reciben otra alimentación que la que consiguen por sí mismos en el campo; las tropas se constituyen de una manera natural, con los machos disputándose las hembras por medio de peleas entre ellos; los potros son amamantados por sus madres hasta que se destetan por sí mismos. Se trata de un caballo singular, propio de Doñana y su entorno, que procede de antiguos caballos marismeños que no tenían dueño denominados despectivamente como “retorteros” ya que se agrupaban el verano en la base de las dunas donde manaba agua. A estas emanaciones se las denominaba retuertas. Son caballos de pequeña alzada y extremadamente resistentes a la dureza climática de la zona. Este caballo se ha utilizado tradicionalmente para realizar tareas ganaderas, de transporte o para arrastrar en la marisma barcas de fondo plano atadas a su cola, cargadas con alimentos o enseres. Las condiciones en que estos caballos debían trabajar y vivir son de una dureza extrema, como corresponde a la marisma encharcada y los arenales, donde la vida y los desplazamientos son verdaderamente penosos en algunas épocas.

La Estación Biológica de Doñana tiene como uno de sus objetivos conservar la variabilidad genética del Parque Nacional y su entorno, también en animales domésticos asilvestrados como es el caso de este caballo. En los años 70 se inicia un proyecto de recuperación de este tipo de caballo sin otra intención de darle ningún otro uso más que el de mantener una Reserva Biológica lo más conservada posible, razón por la que no fue sometido a las presiones propias de la época para mejorar su aspecto. En el año 2003 se le propuso al Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba y al Laboratorio de Genética Molecular del Servicio de Cría Caballar y Remonta del Ministerio de Defensa un estudio genético de la raza. Se encontró, en un porcentaje muy alto de los ejemplares, una variante del gen de la *Esterasa* desconocida hasta ahora. Se han realizado análisis morfológicos, de distancia genética y de marcadores moleculares, y se ha comparado el Caballo de las Retuertas con otras razas españolas y extranjeras.

El descubrimiento de la singularidad que representa el Caballo de las Retuertas es un acontecimiento de primera magnitud tanto para los amantes del caballo como para los entusiastas de Doñana. Ello supone, además, aumentar el ya de por sí rico patrimonio natural que posee la zona, con una nueva raza de caballo propia de su territorio.

### 2.5.3 Hispano-Árabe

Recibe su nombre de las dos razas que la originaron. El proceso de formación de la raza se desarrolla fundamentalmente en Andalucía, iniciándose en los tiempos de la invasión musulmana de la Península Ibérica. El objetivo era conseguir un animal que aunara las características de ambas razas. Del caballo Árabe su equilibrio, resistencia y cualidades atléticas, y del Pura Raza Español su sobriedad, inteligencia y capacidad de aprendizaje; buscando un caballo versátil, muy preparado para el trabajo, tanto con esfuerzos cortos y precisos, como en aquellos que le exigen resistencia.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza equina Hispano-Árabe en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

La zona principal de asentamiento de la raza se corresponde fundamentalmente con la Comunidad Autónoma de Andalucía; sin embargo el área de dispersión de la misma se considera todo el territorio peninsular español.

Se trata de un caballo de silla, con particular predisposición para el deporte, en especial para carreras de campo a través y saltos, así como para las disciplinas de doma clásica y vaquera. Asimismo es caballo con temperamento muy adecuado para el TREC (Técnicas de Recorrido Ecuestre de Competición), las marchas ecuestres y los deportes en grupo. La

conjunción de dotaciones fisiológicas para la marcha de las dos razas parentales ha proporcionado a la raza una forma intermedia de movimientos, en los que se asocian buenas elevaciones con amplias extensiones, sin ser aquellas demasiado pronunciadas. Resultan caballos de fácil manejo y pronta compenetración con jinetes y cuidadores. Son capaces de superar situaciones adversas sin gran esfuerzo.

#### 2.5.4 Mallorquina

Recibe su nombre de la Isla de Mallorca del Archipiélago Balear donde se originó. Procede de la variante meridional de los primitivos caballos de la Península Ibérica, existiendo referencias a la raza desde antiguo. Muy asociada a labores agrícolas, donde además destacaba por su producción mulatera, utilizándose, en menor medida, para el tiro de carruajes pequeños.

Las yeguas donde se criaban se localizaban tradicionalmente anexas a la explotación agrícola. Con la mecanización del medio rural sufrió una importante regresión en su censo. En 1985 se inició un proceso de localización de los caballos de la raza Mallorquina, continuando con el proceso de su cría y selección.

El Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza equina Mallorquina en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

Se trata de un caballo de tipo eumétrico, sublongilíneo, de perfil ligeramente convexo y de esbelta silueta.

Cabe destacar su resistencia, rusticidad, sobriedad y su gran adaptación al medio donde se localiza. La capa es negra, admitiéndose todas sus variantes, no así cualquier otro color. Se admiten las manchas blancas en la cara.

Los machos tienen una alzada a la cruz media de 161 cm. y un peso medio de 456 Kg. y las hembras de 162 cm. y un peso medio de 467 Kg.

Es una raza local que habita en la Isla de Mallorca, de la cual procede, mayoritariamente en las antiguas masías y de manera puntual en explotaciones agrícolas. Las clásicas yeguas se conservan excepcionalmente.

Es una raza que por su historia presenta una gran aptitud para las labores agrícolas, producción mulatera, silla y enganche. Cabe destacar su rusticidad, sobriedad y su capacidad reproductiva. En la actualidad su aptitud se ha dirigido a caballo de ocio, dadas sus características muy aptas para la equitación, aires pausados, rítmicos, medidos y firmes, con tranco uniforme y pisada fuerte, además de su buen carácter. Esta última característica le concede cierta predisposición para el enganche.

### 2.5.5 Menorquina

Debe su nombre a la Isla de Menorca, perteneciente al Archipiélago Balear donde se originó. En textos anglosajones puede aparecer con la denominación de Minorca.

Procede de la variante meridional de los primitivos caballos de la Península Ibérica. Tradicionalmente se utilizaba como animal de carga y montura, debido a la dificultad que presentaban los caminos locales para el tránsito de carruajes. La mecanización del medio rural y la llegada de ejemplares de otras razas para uso deportivo provocaron una importante regresión en su censo. Fue a partir del año 1986 cuando se inicia el proceso de recuperación de su población.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza equina Menorquina en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

Son animales centroides (subconvexo) o rectilíneos, eumétricos y mediolíneos de esbelta figura.

La capa es negra, admitiéndose todas sus variedades, siendo excluyente cualquier otra capa. Se permiten las manchas blancas en cabeza y extremidades siempre que sean pequeñas en extensión.

La alzada a la cruz media ronda los 160 cm., tanto en machos como en hembras, siendo ligeramente superior en los primeros.

Se corresponde principalmente con la Isla de Menorca. Se localizan núcleos de cría en algunos países europeos como Francia, Italia, Alemania, Holanda y Dinamarca lo que denota un cierto proceso de expansión de la raza.

El sistema de explotación es mixto, de estabulación y pastoreo, generalmente en minifundios de una o dos yeguas. La estabulación es más o menos continua para los machos, mientras que las hembras se localizan en cercados de piedra donde permanecen la mayor parte del año.

Se alimentan en pastoreo por el aprovechamiento de los recursos naturales, siendo las hembras gestantes o lactantes suplementadas, si escasea el pasto.

Son caballos de fácil y cómoda montura, resistentes y muy adaptados a caminos agrestes. Su carácter dócil y las cualidades positivas de sus aires han permitido en los últimos años su incorporación en el mundo deportivo, como un animal para la Doma Clásica y Menorquina, en la que se están obteniendo buenos resultados.

Cabe destacar asimismo, la gran relación que presenta esta raza con la cultura popular en las Islas Baleares, siendo el protagonista principal de todas las fiestas populares en la Isla

de Menorca. Este importante vínculo ha permitido el mantenimiento de esta población en el medio hasta el momento, dando una mayor importancia a los machos que a las hembras.

#### 2.5.6 Pottoka

El Pottoka o Poney Vasco es una raza equina autóctona del País Vasco, cuya presencia, se remonta a más de 30.000 años, como demuestran las pinturas rupestres existentes. Se ha mantenido en su pureza hasta tiempos recientes, aunque en algunos lugares de nuestra geografía ha sufrido un proceso de hibridación al cruzarse con razas foráneas, circunstancia esta que ha puesto en peligro su existencia.

La raza, conocida en el País Vasco desde tiempos inmemoriales, y existiendo un estándar oficial en Iparralde desde 1970, no es reconocida, como tal, en dicha Comunidad Autónoma hasta junio de 1995, momento en el que se publicó su estándar racial.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza Pottoka en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

Se trata de animales de conformación general sombría, elipométricos, de perfiles rectos a subcóncavos y mediolíneos.

La alzada a la cruz media es 124 cm en ambos sexos, teniendo un peso medio los machos que varía entre 200 y 250 Kg. y el de las hembras entre 170 y 200 Kg.

Aunque en tiempos anteriores se aceptaron varios tipos de capas, hoy en día solamente se admite la capa negra o castaña muy oscura.

El ámbito de actuación de esta Federación se circunscribe al territorio de la Comunidad Autónoma del País Vasco. También existen ejemplares en Navarra y sur de Francia.

En general el sistema de explotación es extensivo, los animales de raza Pottoka pastan en las montañas del País Vasco en estado semisalvaje durante nueve meses, en los tres meses restantes, de invierno, habita en pastizales cercanos a la explotación o semiestabulado.

Actualmente está en desuso su utilización como animal de carga y de tracción. Hoy en día la utilidad del pottoka está orientada a la actividad de la equitación de recreo, así como a las diversas disciplinas deportivas y de turismo ecuestre.

#### 2.5.7 Asturcón

El poni Asturcón, originario de Asturias, tiene un pasado milenario. Era criado por los astures tanto para sus tareas agrícolas y ganaderas como para la guerra. En esa faceta fue conocido y admirado por los conquistadores romanos, los cuales, una vez se apoderaron del territorio y sus animales, los dieron a conocer en Roma, donde fueron

ampliamente reconocidos. Así las primeras citas bibliográficas conservadas que hacen referencia a ellos datan del 78 a.C. en “Retorica ad Herennium”, donde se mencionan los pequeños caballos de las tribus astures que era considerado un animal sagrado.

Vivió épocas de esplendor en la Edad Media con miles de cabezas distribuidas por toda la región. Después de la Guerra Civil su número disminuyó alarmantemente, sobre todo debido a las políticas de reforestación aplicadas. Quedaron varios núcleos aislados, en el oriente situado en la sierra del Suevo y en el occidente a lo largo de los cordales más inaccesibles de varios ayuntamientos. Fue en 1979 cuando se constituye la Asociación Regional de Criadores de Ganado Caballar de Raza Asturcón, nacida para la recuperación de la raza, que por aquel entonces constaba de 23 ejemplares propiedad de 4 criadores. Posteriormente se transforma en la actual Asociación de Criadores de Poni de Raza Asturcón, organismo encargado de la gestión del Libro Genealógico de la raza y de su salvaguarda y difusión. Actualmente contamos con más de 140 asociados y un censo de más de 1.300 animales.

Alzada media en torno al 1,35 m., de capas negra, castaña o alazana, sin más manchas aceptables que una pequeña estrella frontal. Cabeza de tamaño medio, perfil frontonasal recto o subcóncavo, orejas pequeñas y ollares amplios. Cuello de longitud media, fuerte y buena conformación. Espalda larga, sin demasiada inclinación. Miembros rectos y finos, con cerneas escasas y pequeños espejuelos que pueden estar ausentes en miembros posteriores. Costillares bien arqueados y grupa inclinada, nunca doble, de anchura proporcionada.

En Asturias se diferencian dos núcleos aislados. Los del núcleo oriental son exclusivamente de capa negra y los del occidental son de capa castaña. También se cuenta con numerosos socios y animales a lo largo de todo el territorio nacional.

Existen dos sistemas de cría diferenciados. Los animales de prado, que se crían en estrecho contacto con el hombre, en pastizales o prados y que serán destinados fundamentalmente a ponis de deporte, destacando en las disciplinas de salto y enganche, aunque se muestran como excelente montura para la práctica del “horseball”.

Por otro lado, nos encontramos a los animales de sierra, que viven en puertos de montaña de difícil acceso, en estado de semilibertad y totalmente integrados en el ecosistema. Estos animales una vez domados se muestran especialmente hábiles para el trabajo con el ganado en el monte gracias a su gran fortaleza física y a su habilidad para desenvolverse en las zonas más agrestes. Contribuye al mantenimiento y limpieza de los montes, aunque

gracias a su docilidad y resistencia cada vez gana más fuerza en el aspecto deportivo, el cual será sin duda el futuro de la raza.

#### 2.5.8 Losino

Recibe su nombre del área geográfica de donde procede, Valle de Losa de la provincia de Burgos. Las teorías sobre su origen pueden resumirse en dos: la monofilética, que lo emparenta con el primitivo Przewalskii , y la polifilética (mayoritaria), según la cual se origina a partir de los cruces que se dieron entre los caballos celtas y las primitivas poblaciones de caballos salvajes que habitaban la Península Ibérica. Las pinturas rupestres de Ojo Guarena en Merindad de Sotoscueva (40.000 – 9.000 a.C.) permiten pensar en los losinos como patrón racial diferenciado desde tiempos inmemoriales. La mecanización del medio rural tuvo un importante efecto negativo sobre su censo y es en el último cuarto del siglo pasado cuando se inician las labores de recuperación de la raza.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza equina Losina en el Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción.

Se caracterizan por ser animales eumétricos y mediolíneos. Cabeza proporcionada y de rasgos finos, orejas pequeñas y cuello robusto. Pecho amplio, lomo ancho y algo ensillado. Extremidades finas, cernejas poco pobladas y corvejones ligeramente cerrados. Grupa redondeada y derribada con inserción de la cola baja. Son animales de capa negra, admitiéndose la variante morcillo, con tonalidades rojizas en verano y más oscuras en invierno. Crin abundante y negra. En los machos se admite estrella y en las hembras estrella y lucero.

Las crías hasta los dos años, que adquieren el pelo propio de la raza, presentan un pelo grosero tipo a los asnos. En adultos la alzada mínima debe ser 130 cm. en los machos y 120 cm. en las hembras. La alzada máxima en ambos sexos es de 147 cm. El peso varia en un rango de 300 a 350 Kg en animales adultos.

Su localización se corresponde con el área de la cual es originaria en la provincia de Burgos. No obstante, existen actualmente dos grandes núcleos de cría: El Valle de Losa (en Las Merindades) y los Montes Obarenes (Pancorbo).

Sigue un régimen de explotación extensiva en terrenos montañosos ricos en matorral. La suplementación de la ración se realiza solo ante condiciones climáticas muy adversas. Se caracteriza por un elevado coeficiente digestivo.

La reproducción se realiza por monta natural dirigida, manteniendo a los machos separados de las hembras con el objetivo de programar los partos en el momento más adecuado. Las yeguas presentan índices de fertilidad elevados.

Destacan sus cualidades como caballo de silla, adaptado a su pequeño tamaño. Su paso es firme, temperamento vivo y muy eficaz en terrenos accidentados, lo que le convierte en un animal muy válido para el turismo ecuestre de montaña.

## **RAZAS INTEGRADAS EN ESPAÑA**

### **2.5.9 Pura Sangre Inglés**

Durante el siglo XVIII, los ingleses cruzaron sus yeguas locales con sementales árabes con el objetivo de obtener caballos veloces y resistentes. En concreto, los sementales eran el berberisco Byerley y los árabes Darley y Godolphin.

Considerado como el equino más veloz, posee un cuerpo esbelto y unas extremidades muy finas. De ahí que también sea conocido como Pura Sangre de Carreras. Hoy en día, el Pura Sangre Inglés es una de las razas más rápidas, admirables y costosas del mundo.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado incluye a la raza equina Pura Sangre Inglés en el Grupo de Razas Integradas en España.

Esta raza agrupa animales de gran personalidad, sensibles e inteligentes. Presentan un cuello largo y musculoso, un dorso ancho y recto, unas extremidades alargadas y fuertes y una alzada a la cruz en torno a 1,60- 1,80 metros.

Su color de capa más común es el castaño, y son frecuentes las manchas blancas en su frente, apareciendo también la capa alazana, negra y torda.

Su mejor marcha es el galope de tranco amplio y ritmo constante, con gran aptitud para las carreras desde edad muy temprana. Es un caballo confiado y tranquilo, que guarda sus energías para cuando se las pide el jinete. Esta raza equina se distribuye por todo el territorio español.

El Pura Sangre Inglés se caracteriza por ser animales longevos, de gran fecundidad y de gran potencia muscular y amplitud de movimientos. Así el principal objetivo de su crianza radica en las carreras de velocidad, donde los expertos fijan una edad óptima para competir que sitúa entre los tres y los seis años aproximadamente, sin olvidar las posibles excepciones de caballos precoces o incluso de equinos que con más de diez años siguen compitiendo.

Igualmente destaca en su participación en otras disciplinas hípcas, como son el salto de obstáculos, los concursos completos y la doma clásica, donde obtienen grandes resultados.

Tanto la gestación como el nacimiento y el destete del recién nacido son importantes. Una vez que el potrillo ha nacido, se le cría en la yeguada. El primer año permanece en un prado con su madre al lado, por lo que es muy importante que el prado en el que permanezca sea rico en minerales, puesto que la cría los necesita para alcanzar un perfecto desarrollo.

#### 2.5.10 Pura Raza Árabe

El caballo Árabe nace en el desierto, entre el Mar Rojo y el Golfo Pérsico y hacia el norte alcanza hasta parte de Irán e Irak. Arqueólogos e historiadores no han podido precisar exactamente tiempo y espacio de este nacimiento. Sin embargo, existen indicios razonables para pensar que los caballos de tipo árabe estaban domesticados, en la citada área geográfica, 1.500 años antes de Cristo. El caballo árabe ha estado sometido a un sistema de selección contrastada por el hombre, durante 350 generaciones.

El Árabe, es el más antiguo, y único pura raza que existe, siendo el origen de todas las razas, de caballos modernos, de tipo ligero, y de sangre caliente (Pura Sangre Ingles, Anglo-Árabe, Hispano-Árabe, Lipizano, Morgan, Trakehner, y un largo etc.).

Un hecho histórico importante, en términos del caballo en general en nuestro país, es cuando la Reina Isabel II ordeno importar un grupo de sementales de pura raza del desierto, con la finalidad de “Mejorar la Cabaña Equina Española”. El Libro Registro Genealógico del caballo árabe en España, que data de 1847, es el más antiguo del mundo. Años después, se importaron ejemplares seleccionados de Egipto, Polonia y de todo el Oriente Medio. Estas importaciones unidas a estrictos sistemas de selección y cría del caballo Árabe, dieron lugar a la “Joya Genética” que hoy disfrutamos.

España aún conserva, como único país en el mundo, 22 líneas directas, y en expansión, de las yeguas importadas del desierto de Najed.

La imagen general es la de un caballo armónico, proporcionado y atractivo, que respalda el calificativo “más bello del mundo”, a la vez que le confiere un sello especial que los expertos llaman “desierto”.

La alzada del caballo Árabe oscila entre 148 y 156 cm., presentan una cabeza pequeña y cóncava, tronco piramidal y corto, quijadas amplias, orejas cortas y separadas, una grupa

amplia y redondeada con nacimiento alto de la cola, extremidades musculosas, el tórax es amplio y sus costados bien arqueados. Se distribuye por todo el territorio español.

Su aptitud más destacable es su enorme resistencia unida a su velocidad, debido a que su selección fue realizada con vistas a soportar las duras condiciones del desierto. Dado que su característica más significativa es la resistencia, el Raid es la disciplina en la que se desenvuelve con mayor facilidad, destacando sobre la demás razas.

En muchos países de los distintos continentes, existen también carreras de caballos reservadas a los de pura raza Árabe.

Es una raza que por su procedencia se adapta perfectamente a cualquier zona geográfica, incluso a las de más dureza. No debe de olvidarse que es la raza más extendida en todo el mundo.

#### 2.5.11 Trotador Español

La historia sitúa en torno a finales del siglo XIX cuando se empiezan a realizar las primeras carreras de caballos en la modalidad de trote y con carácter oficial en Mallorca.

A principios del siglo XX comienzan a realizarse las primeras importaciones de algunos sementales y yeguas anglo-normandas de raza trotadora. Pero en concreto, hasta los años 20, no se inician verdaderos esfuerzos para crear los cimientos de un deporte que comenzaba a expandirse, cuyo base se encuentra en la crianza de esta raza equina, el Trotador Español.

El Trotador Español prácticamente se cría solo en las Islas Baleares, por lo que también se le conoce con el nombre de trotador mallorquín. Raza típica de enganche o de arnés, que realiza sus prestaciones al trote como exclusivos aires de marcha.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado incluye a la raza equina Trotador Español en el Grupo de Razas Integradas en España.

La raza equina Trotador Español agrupa animales que poseen un cuerpo amplio, con un dorso y unas espaldas robustos y un tercio posterior descendente bien musculado, con unas extremidades largas y fuertes, con una alzada a la cruz de 1,60 a 1,70 metros. Su capa es castaña, alazana, rodilla a veces negra y raras veces torda, apareciendo marcas blancas en la cabeza y extremidades de forma discreta.

Su carácter es dócil, obediente y colaborador, condiciones indispensables para la prestación enganchada.

Es notable la crianza del Trotador Español en las Islas Baleares, archipiélago donde existe gran afición por esta raza equina.

Estos robustos y elegantes caballos poseen una extraordinaria resistencia, su valentía y buena disposición los hacen ideales para las carreras de trotones tanto en enganche como con montura.

## **RAZAS AUTÓCTONAS DE FOMENTO**

### 2.5.12 Pura Raza Español

El caballo de Pura Raza Española (PRE) se conoce en múltiples países, donde se ha adaptado, con gran facilidad, a sus sistemas de explotación y manejo y ha intervenido en la formación de otras razas equinas.

Es conveniente no caer en otras denominaciones como caballos ibéricos o cartujanos, ya que no se corresponden con ninguna raza, siendo los cartujanos una familia dentro del PRE.

El Catalogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la raza equina Pura Raza Española en el Grupo de Razas Autóctonas de Fomento.

Agrupar animales de líneas suaves y redondeadas, eumétricos, mesolíneos y de perfil subconvexo a recto. De conformación proporcionada, notable armonía general y de gran belleza, con apreciable dimorfismo sexual. El cuello es esbelto, con el borde superior suavemente arqueado. Crines largas, onduladas y sedosas. Con una grupa redondeada y fuerte y una región lumbar corta y ancha. El nacimiento de la cola es bajo y permanece pegada al cuerpo. Se admiten todas las capas.

Aires brillantes, enérgicos, cadenciosos y elásticos con apreciables elevaciones y extensiones de acusada facilidad para la reunión y los giros sobre el tercio posterior. De paso firme, tranco rítmico, movimiento acompasado, equilibrio manifiesto y sostenido y marcha atractiva y de trote corto, rápido, gran facilidad de desplazamiento del centro de gravedad para cambios de marcha, paradas súbitas y arranques pronto. De brioso temperamento, dócil, noble y equilibrado, con gran capacidad de aprendizaje. Obediente al mando, con respuesta generosa a las ayudas más elementales, de manejabilidad y colaboración generosa, reconocido como caballo fácil, noble, generoso, inteligente, sacrificado y cooperador, de base atlética y buena funcionalidad.

Posee una excepcional aptitud para la doma clásica, la doma vaquera, alta escuela y los enganches, siendo un caballo de silla extraordinario.

El caballo PRE es la raza más extendida en España, se distribuye por todas sus Comunidades Autónomas y, asimismo, está presente en 62 países, tanto en la Unión Europea como en Países Terceros.

Su sistema de explotación sigue el patrón semi-extensivo, con amplios cercados que permiten a los animales mantener su buena forma física debido al ejercicio diario. Sus ejemplares están muy bien posicionados en el mercado, por lo que su alimentación es cuidada al más mínimo detalle.

Cuenta con un programa de Mejora Genética mediante el cual los ejemplares se valoran genéticamente y se seleccionan los mejores reproductores para la doma clásica, la morfología o su aptitud para la silla.

Los resultados deportivos de esta raza son excepcionales, destacando la Medalla de Bronce en la WEG de Jerez de la Frontera (Cádiz) en el año 2002 y la Medalla de Plata en los Juegos Olímpicos de Atenas en el año 2004.

## **OTRAS RAZAS**

### 2.5.13 Berberisco

El caballo bereber o berberisco es una raza de caballo existente en Barbaria (Magreb) desde hace siglos. Sus orígenes son discutidos pero sus características actuales se remontan a la época de la conquista islámica. Su nombre procede de la palabra "bereber", que fueron los primeros habitantes del territorio marroquí. Éstos utilizaban a los caballos de esta raza para desplazarse. Como caballo de guerra ha merecido el elogio de muchos especialistas, demostrando sus cualidades hasta la década de 1950. Esta raza fue la favorita de los musulmanes dedicados a la conquista de España y en otros lugares de Europa. Se habla de estos caballos como una de las razas más importantes e influyentes en la mejora y aparición de otras razas.

Cuando los árabes conquistaron el norte de África la cría de caballos por parte de los bereberes, que ya estaba plenamente desarrollada, recibió el incentivo de la bendición de la nueva religión. Un aspecto importante fue la llegada de caballos árabes de pura raza. No por su influencia directa pero sí por la aparición de caballos mezclados árabes-

bereberes. En el Magreb conviven desde entonces tres castas de caballos: los bereberes tradicionales, los de pura raza árabe (caballo árabe) y los árabes-bereberes.

El estilo de vida tradicional de las tribus del interior permitió conservar las cualidades más útiles en un caballo de guerra (resistencia y rusticidad) sin perder velocidad, arranque o agilidad. Esencialmente, los mejores caballos bereberes del siglo octavo eran muy parecidos a los que después elogió el general Daumas y el coronel Denis Bogros. En las obras del general Daumas (especialmente en "Les chevaux du Sahara" que incluye aportaciones fundamentales del emir Abd el Kader sobre el tema) se explican las costumbres y la forma de cría de los bereberes.

A partir de caballos de razas diferentes, el norte de África produjo el caballo bereber "clásico", aún existente en cantidades importantes hasta 1950. Posteriormente, las cifras de caballos bereberes puros fueron menguando hasta rozar el peligro de extinción. En 1987 se fundó en Argelia la Organisation Mondiale du Cheval Barbe (OMCB), con el objetivo de preservar la raza.

La relación del caballo bereber con los caballos andaluces en general, el caballo español de Felipe II, el caballo PRE ("Pura Raza Española"), los caballos Napolitanos, los caballos Lipizzanos, los Mustangs y los caballos criollos americanos y otros similares, se explica de forma muy diferente según los autores. Hay dos versiones opuestas.

Primeramente, unos dicen que el caballo bereber está en el origen de muchas razas. Que todos los caballos indicados serían, fundamentalmente, caballos bereberes o con influencia berberisca predominante. Esta opinión dio origen al concepto del caballo Spanish Barb.

La segunda versión, mucho menos extendida, considera que los caballos ibéricos de la zona de Andalucía no tuvieron una influencia significativa del caballo bereber. Esta teoría considera inapropiada la expresión Spanish Barb.

Probablemente la realidad se encuentra entre las dos teorías. Parece comprobado que en épocas prehistóricas y antes de las colonias griegas y fenicias, los caballos del sur de la península ibérica y los caballos del norte de África estuvieran muy emparentados. Desde entonces hasta los tiempos de la invasión musulmana del sur de Europa hubo un trasvase importante de caballos en ambos sentidos. Desde África hacia Andalucía y desde Andalucía hacia África.

Durante la ocupación musulmana, las aportaciones de caballos atravesando el estrecho de Gibraltar hacia el norte y hacia el sur fueron relativamente escasas pero significativas. Se puede afirmar que, numéricamente, los caballos andaluces y los caballos bereberes se mantuvieron independientes, con aportaciones puntuales de cierta importancia.

El caballo bereber actual puede tener alturas variables. Es más alto y robusto al este que al oeste. Las características físicas son las siguientes: caballo "cuadrado", tan alto como largo, con una altura de 1,45 a 1,60m. El perímetro de la caña tiene un mínimo de 18cm. Su peso oscila entre los 400kg y los 550kg. Sus capas más frecuentes son la negra, castaña, alazana y gris. De cuerpo corto y fino y grupa inclinada, posee crines espesas y pobladas. La raíz de su cola es de inserción baja. Cabeza estrecha, de perfil convexo o ligeramente curvado. Narinas poco destacadas. Orejas estrechas y cortas, ojos almendrados con arcos superciliares poco destacados. Su cuello es grueso y musculoso, curvado en forma de cuello de cisne. Extremidades musculosas, delgadas pero fuertes. Uñas pequeñas y muy duras.

Los caballos berberiscos generalmente sólo tienen 5 vértebras lumbares, como los caballos árabes de pura raza.

El caballo bereber es dócil y rústico. Además, es polivalente: gran velocidad en distancias cortas, velocidad considerable en distancias medias y gran resistencia en trayectos largos. Buen saltador en función de su talla, es de carácter tranquilo, equilibrado y valiente. Aparentemente perezoso, cuando es solicitado por su jinete demuestra una fogosidad impetuosa. Es fácil de aregar y adiestrar, y muestra una resistencia insuperable en las condiciones más difíciles.

En función de sus capacidades y prestaciones, un coste de mantenimiento mínimo y su carácter tranquilo, el caballo bereber se puede comparar favorablemente con otras razas más difundidas.

#### 2.5.14 Sorraia

El Caballo Sorraia es la raza de caballos portugueses que se considera muy próxima al caballo ibérico de la prehistoria (Andrade, 1954; Loch,1986; Cordeiro, 2002). El nombre Sorraia es debido a lo que Ruy de Andrade (1945) lo descubrió en el valle del río Sorraia que es un afluente del Tajo y proviene de la confluencia de dos ríos: Sôr y Raia. Las pinturas que existen en cuevas de la Península Ibérica, anteriores a la última glaciación, nos muestran un caballo muy parecido al caballo Sorraia. La población de caballos Sorraia es muy reducida, lo que produce niveles muy altos de consanguinidad en esta raza.

El caballo de Sorraia recuerda al caballo Tarpan que es el ancestro del caballo doméstico Indo-Europeo (Loch,1986). Además de eso, varias pinturas rupestres indican que justo antes de la última Glaciación existió un caballo muy similar al caballo Sorraia en la península Ibérica. Existen actualmente un número reducido de caballos Sorraia y yeguas

dedicadas a esta raza lo que originan que existan, en estos caballos, valores de consanguinidad extremadamente elevados (Oom, 1992).

La altura de estos caballos es muy similar a la de las cebras o los asnos. Sus crines y sus colas presenten dos colores: son principalmente negras, pero presentan una franja alargada de un color claro. Los colores de sus capas son los primitivos: bayo, gris y negro. Igualmente son características sus marcas de cebra en las extremidades y en la cruz.

Aunque son caballos salvajes éstos presentan un temperamento calmado y dócil. Son fuertes y resistentes debido a la vida que están acostumbrados a llevar. Pueden alimentarse con poco forraje, soportar temperaturas extremas, y aun así presentan una longevidad destacable.

Son caballos de carácter independiente debido a su historia claramente salvaje.

## *2.6 Microsatélites*

Los microsatélites son marcadores moleculares conocidos como SSRs (Simple Sequence Repeats), STRs (Short Tandem Repeats), SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphisms), SSMs (Simple Sequence Motifs), STMs (Sequence Target Microsatellites). Son regiones no codificantes de ADN compuestas por moléculas de 1 a 6 nucleótidos repetidas en tándem (Fries *et al.*, 1990; Goldstein and Pollock, 1997; Mommens *et al.*, 1999). Se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, son muy abundantes, exhiben gran polimorfismo y son fáciles de identificar; estas circunstancias hacen que se utilicen como marcadores genéticos. Los microsatélites han sido ampliamente utilizados como marcadores moleculares y tienen el particular atributo de sufrir tasas de mutaciones más altas que en el resto del genoma (Jarne, 1996). Se han planteado muchas hipótesis sobre la función de los microsatélites, una de ellas es que pueden tener una función sobre la estructura de los cromosomas (Nordheim and Rich, 1983) y, aunque la función de este DNA no se ha determinado completamente, se cree que podría actuar como punto focal para la recombinación genética durante la meiosis (Gross and Garrad, 1986).

La ventaja de los microsatélites son su estabilidad y la posibilidad de realizar reacciones denominadas múltiplex, amplificando varios *loci* al mismo tiempo (Kimpton *et al.*, 1993). Por

otra parte su análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN.

### 2.6.1 Clasificación y origen

Los microsatélites se clasifican según el tipo de repetición en las secuencias, como perfectos, imperfectos, interrumpidos o compuestos.

En los microsatélites denominados perfectos las secuencias repetidas no son interrumpidas por ninguna base que no pertenezcan a las mismas, como por ejemplo: GAGAGAGAGAGA. Los microsatélites imperfectos son reconocidos porque existe un par de bases entre las secuencias repetidas que no coincide con la misma, como el caso de la siguiente secuencia, TATATAT**GT**TATATATA. En el caso de los microsatélites interrumpidos, se observa una pequeña secuencia que no corresponde a las repeticiones, CGCGCGCG**TAG**CCG. Finalmente, un microsatélite compuesto contiene dos secuencias distintivas adyacentes, **CGCGCGCGT**TATATATATA. (Oliveira *et al.*, 2006). El origen de los microsatélites aún no está claro; es posible que se deba a la ocurrencia inicial de una secuencia corta al azar u originada por mutaciones en la secuencia poli dA en el extremo 3' de una secuencia *Alu* adyacente. En este proceso se observa una prevalencia selectiva de (dC-dA), explicadas por la metilación de residuos dC en la secuencia 5'dGdC3' que se encuentra normalmente en el genoma. Los residuos dC metilados pueden ser deaminados produciendo una transición de dC a dT. Este proceso puede llevar hacia un incremento de la secuencia 5'dG-dT3' y su complementario 5'dC-dA3' y la subsecuente expansión de estas secuencias puede ser debida a un proceso en el ADN denominado "*strand lippage*" o deslizamiento de la hebra, creando polimorfismos en la longitud, separados por algunas repeticiones en el tiempo (Koreth *et al.*, 1996).

### 2.6.2 Aplicación de los microsatélites en genética animal

Los marcadores microsatélites han sido utilizados ampliamente para estudios de caracterización y diversidad genética, relaciones genéticas entre poblaciones, influencia de una o varias razas sobre otra (*admixture*), pruebas de paternidad, consanguinidad, cuellos de botella genéticos entre otros y son una herramienta poderosa para determinar la diferenciación genética entre especies domésticas como los equinos, bovinos, caprino, ovino y cerdos (Buchanan *et al.*, 1994; Zamorano *et al.*, 1998; Díez-Tascón *et al.*, 2000;

Gutiérrez Espeleta et al., 2000; Martínez et al., 2000; Arranz et al., 2001; Casellas et al., 2004; Ceccobelli et al., 2015; Cortés et al., 2016; Villalobos-Cortés et al., 2015)

### 2.6.2.1 Caracterización genética

En el caso de los estudios de caracterización y diversidad genética, los índices que se han utilizado con mayor frecuencia son: Heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas, contenido de información polimórfica, número medio de alelos y número efectivo de alelos.

**2.6.2.1.1 Heterocigosidad:** el concepto de Heterocigosidad se puede resumir como la proporción o frecuencia promedio de individuos de una población que ostentan dos alelos diferentes en un *locus* concreto. Del concepto de Heterocigosidad se originan la Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ).

La  $H_o$  se obtiene dividiendo el número de individuos heterocigotos para cada *locus* por el total de individuos analizados. La  $H_o$  media para varios *loci* es una buena medida del grado de variación genética (Sosa, 1991; Aranguren, 2002).

La  $H_e$  es la probabilidad que dos alelos seleccionados aleatoriamente sean diferentes en una población en equilibrio. Es calificada como una medida más apropiada de la variación genética y conocida como índice de diversidad genética de Nei (Nei, 1977; Nei, 1987).

El cálculo de la  $H_e$ , puede realizar mediante la ecuación:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Donde  $p_i^2$  es la homocigosidad.

**2.6.2.1.2 Número medio de alelos por *locus* ( $N_a$ ):** es el promedio de alelos por *locus* presente en una población:

$$n = (1/K) \sum n_i$$

Siendo  $K$  el número de *loci*, y  $n_i$  el número de alelos en cada *locus*. Gracias a esta medida obtenemos información complementaria a la que tenemos con el

polimorfismo. Su cálculo sólo requiere contabilizar los alelos por *locus*, y hacer el promedio.

**2.6.2.1.3 Número efectivo de alelos ( $N_e$ ):** Esta medida indica el número de alelos esperados en cada *locus* de una determinada población y está afectada por la proporción de *loci* polimórficos, el número de alelos por *locus* polimórfico, y las frecuencias alélicas. El cálculo de este índice se realiza mediante la ecuación de Kimura y Crow (1964)

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia relativa del alelo  $i$  y  $n$  es el número total de alelos.

**2.6.2.1.4 Frecuencias Alélicas:** es el cociente que se obtiene del número de alelos iguales en una población dividido por el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias se hace por recuento alelos presentes, asumiendo que la observación de un solo alelo se corresponde la condición de homocigosis y por lo tanto que no hay alelos nulos.

**2.6.2.1.5 Contenido de Información Polimórfica (PIC):** desde el punto de vista cualitativo, un marcador es denominado polimórfico si contiene por lo menos dos alelos y generalmente el criterio más utilizado es que un *locus* será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en la población que se encuentra bajo estudio (Shete *et al.*, 2000). Es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los *loci*. Existen varias ecuaciones matemáticas que lo definen y en todas ellas sus valores varían siempre entre 0 y 1. Para realizar el cálculo del Contenido de Información Polimórfica (PIC) de cada microsatélite se aplica una fórmula propuesta por (Botstein *et al.*, 1980). Con dicho índice es posible determinar si un marcador es o no informativo, los valores de PIC superiores a 0,5 son altamente informativos, valores entre 0,25 y 0,5 son medianamente informativos y los valores inferiores a 0,25 son poco informativos.

El modelo que se utiliza para el cálculo del PIC es el siguiente:

$$\left( \frac{n}{n-1} \right) \frac{n-1}{n}$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1} p_i^2 - \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} 2 p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia alélica del i-ésimo alelo y  $n$  el número de alelos observados

**2.6.2.1.6 Equilibrio Hardy-Weinberg:** El 10 de julio de 1908, Godfrey Harold Hardy en Inglaterra y Wilhelm Weinberg en Alemania demostraron que las frecuencias génicas de una población, bajo ciertas condiciones, permanecían esencialmente constantes de una generación a otra, constituyendo la denominada Ley de Hardy-Weinberg. La ley se cumple fundamentándose en las siguientes suposiciones:

- 1) Hay apareamientos aleatorios en la población.
- 2) No actúan fuerzas de selección.
- 3) No existe migración.
- 4) No hay mutación.

Consideradas en conjunto, estas condiciones son suficientes para que la población esté en equilibrio, sin embargo se debe tener en cuenta que no implica que se cumplan todas las condiciones enumeradas anteriormente.

Las desviaciones del HWE pueden producirse debido a varios factores como por ejemplo:

- Los apareamientos no se producen al azar
- Existen subdivisiones dentro de la población (Principio de Wahlund)
- Coancestros, antepasados comunes
- Selección natural (ventaja de los heterocigotos)
- Migración o flujo de genes desde una población externa
- Diferencias sexo-específicas en las frecuencias alélicas
- Técnica de muestreo incorrecta
- Presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente

De hecho, alguna o varias de estas condiciones pueden ser violadas y las frecuencias genotípicas seguir presentando las proporciones predichas por la ley. Por otro lado, existen ciertas condiciones que por sí mismas son capaces de variar las frecuencias esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Una de las condiciones que más afecta a las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg es el cruzamiento dirigido en una población, como el caso de la de la selección artificial por parte de la acción humana.

El equilibrio Hardy-Weinberg es una condición previa en el estudio de la estructura genética de poblaciones, como el caso de los métodos basados en modelos Bayesianos

en los que se requiere que la población esté en equilibrio. Bajo esta suposición, cada alelo de cada *locus* en cada genotipo, es una muestra independiente (Pritchard *et al.*, 2000).

El procedimiento común de calcular si existen desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg es el de comparar los genotipos observados con los esperados dentro de una muestra. Se usa la prueba de  $\chi^2$  para detectar la discordancia de las frecuencias genotípicas para cada combinación *locus*/población. Se construye una tabla de contingencia de genotipos y se hace un cálculo de  $\chi^2$  con los datos de los genotipos observados frente a los esperados. Con este procedimiento se obtienen resultados aceptables cuando el tamaño de la muestra es grande y el número de alelos de cada *locus* es pequeño.

Sin embargo, cuando la muestra es pequeña y la cantidad de alelos es grande los valores de  $\chi^2$  no son fiables. Estos inconvenientes se evitan utilizando programas informáticos que generan una distribución sintética de la población a partir de los genotipos observados. Se usan métodos como el de Monte Carlo que unen alelos aleatoriamente en genotipos, repitiendo esta operación por ejemplo 1000 veces, con lo que se produce una serie de nuevas poblaciones que son evaluadas para el HWE haciendo una prueba de  $\chi^2$ . Por ejemplo con el programa informático Genepop (Raymond and Rousset, 1995) si hay más de cuatro alelos se utiliza la estimación no sesgada (Guo and Thompson, 1992).

**2.6.2.1.7 Probabilidad de Fisher:** Consiste en observar todos los posibles lotes de frecuencias genotípicas para un determinado lote de frecuencias alélicas y rechazar la hipótesis de HWE si las frecuencias genotípicas resultan ser inusuales. Si hay más de cuatro alelos para un *locus*, se realiza un cálculo no sesgado de la probabilidad de HWE usando el método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov, con miles de iteraciones (Guo y Thompson 1992).

**2.6.2.1.8 Probabilidad de verosimilitud:** Se basa en el uso de un test de proporción de verosimilitud que detecta la discordancia de cada frecuencia genotípica con el valor esperado y el significado empírico de cada test,  $L$ , se calcula con el mismo método de permutación de flujo de alelos descrito en el apartado anterior (Weir, 1990).

## **2.6.2.2 Estructura y distancias entre poblaciones**

Existe una serie de cálculos que son de mucha utilidad para determinar, tanto la estructura de las poblaciones que se están estudiando, como para establecer si existe alguna relación entre las mismas. A continuación se citan una serie de metodologías que son de utilidad

para este cálculo: Estadísticos F de Wright (1965) o Weir y Cockerham (1984), matrices de distancia, árboles de distancias genéticas, análisis multivariado como el factorial de correspondencia (Belkhir *et al.*, 2003) y modelos basados en técnicas bayesianas (Pritchard *et al.*, 2000).

**2.6.2.2.1 Estadísticos F:** La estructura de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero relacionadas: la estructura poblacional y la genética. La estructura de poblaciones las determinan los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de apareamiento y la historia de vida. La estructura genética está determinada por la estructura de la población, los procesos genéticos como la selección, la recombinación y la mutación.

De los tres pioneros de la teoría de la genética de poblaciones (Fisher, Haldane y Wright), este último se interesó en la estructura de las poblaciones y su papel en la evolución. Gran parte del trabajo teórico de Wright puede ser considerado como una demostración de cómo la estructura poblacional determina la estructura genética. Wright propone tres parámetros:  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  para medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas.

El estadístico  $F_{IT}$  es la correlación relativa a la población total o índice de fijación de los individuos respecto al total de la población, o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total respecto a las esperadas considerando que existe equilibrio Hardy-Weinberg. Si la población total se encuentra en panmixia (individuos con igual probabilidad de cruzarse) el valor sería 0.

El estadístico  $F_{IS}$  es la correlación entre dos alelos, relativa a la subpoblación o el exceso o déficit de heterocigotos que podría haber entre individuos de la misma subpoblación. Este parámetro puede variar entre -1 y 1. Valores negativos de  $F_{IS}$  indican exceso de heterocigotos en la población respecto a las proporciones esperadas de equilibrio de Hardy Weinberg y valores positivos indican el efecto contrario.

El estadístico  $F_{ST}$  es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación. Ha sido interpretado como el grado de diferenciación genética o flujo genético entre las poblaciones, denominándose índice de diferenciación genética. Su valor varía de 0 a 1 y a diferencia del  $F_{IS}$  y el  $F_{IT}$ , no puede ser un valor negativo (Nei, 1973). Un valor de cero indica que las frecuencias alélicas son iguales en las poblaciones analizadas y por el contrario, un valor de 1 demuestra que las frecuencias alélicas están fijadas y son

diferentes en las poblaciones. Valores de 0,00 y 0,05 se consideran bajos, 0,05 y 0,15 indican diferenciación genética moderada y un rango de 0,15 y 0,25 señalan que la diferenciación es alta. Valores superiores a 0,25 indican que la diferenciación es muy alta (Wright, 1943; Wright, 1978; Montoya et al., 2005).

Los tres parámetros están relacionados mediante la siguiente ecuación:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

Cabe destacar que la idea inicial de Wright se aplicaba al análisis de un solo *locus* y un par de alelos neutrales y número infinito de subpoblaciones aunque existe controversia en la forma de calcularlos, de ahí que Weir y Cockerham (1984) incluyeran los parámetros  $F$ ,  $\theta$  y  $f$  que corresponden con los estadísticos  $F$  de Wright:  $F = F_{IT}$ ,  $\theta = F_{ST}$  y  $f = F_{IS}$ .

De la misma forma que los estadísticos de Wright se pueden relacionar, los estadísticos propuestos por Weir y Cockerham se relacionan mediante la siguiente ecuación.

$$f = (F - \theta) / (1 - \theta)$$

Por otro lado, la diferenciación genética se ve condicionada por la tasa de migración ( $Nm$ ) de manera que cuando hay un mayor flujo genético entre dos poblaciones, menor será la diferenciación entre ellas. Existe una relación entre la  $F_{ST}$  y el  $Nm$  expresada mediante la siguiente ecuación descrita por Wright (1969):

$$Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}$$

De esta manera un flujo que supera el valor de 1 sería suficiente para que no se considere como poblaciones diferentes, según Wright (1931) y valores por encima de 2 serían suficientes para contrarrestar los efectos de la deriva. Si el valor de  $Nm$  es muy bajo, predomina el efecto de la deriva y la mayoría de las poblaciones estarán fijadas. Si  $Nm$  es grande, la deriva genética será poco importante y contrarrestada por la migración; por tanto, las subpoblaciones tenderán a mantener las mismas frecuencias génicas.

**2.6.2.2 Distancias Genéticas:** la distancia genética entre pares de poblaciones muestra un valor estimado del tiempo que ha pasado desde el momento que se inició la

diferenciación entre las mismas. Distancias pequeñas pueden indicar que existe flujo genético entre las poblaciones o también un completo aislamiento de las mismas pero que la separación haya sido reciente. Cuando están aisladas genéticamente, los procesos de mutación, selección y deriva llevan a la diferenciación en las frecuencias alélicas; conforme se incrementa el tiempo de separación, las frecuencias alélicas también se diferencian. Algunas distancias se basan en el modelo de deriva exclusivamente y otras incluyen en los algoritmos de cálculo los procesos de mutación. A su vez pueden presuponer que cualquier alelo tiene la misma oportunidad de surgir como las distancias de Nei (1972), Nei (1973) y Nei (1977), Reynolds (1983) y Cavalli-Sforza y Edwards (1967), o bien que éstos sigan un orden en su aparición como los algoritmos propuestos por Slatkin (1995) y Goldstein (1995).

En estudios de distancia genética, la distancia estándar o  $D_s$  de Nei (Nei 1972) era la medida más utilizada. También la medida de Cavalli-Sforza original,  $D_C$  (Cavalli Sforza 1969), que está influenciada por la existencia de alelos raros y disminuye a medida que aumenta el tamaño de la muestra. La distancia de Cavalli-Sforza modificada (Nei *et al.*, 1983) es aplicada para poblaciones relacionadas donde la deriva genética es la principal determinante de la diferenciación evolutiva. Nei y col. (1983), modificaron esta medida para corregir esta deficiencia e introdujeron la distancia  $D_A$ . Desde el punto de vista de la evolución, en periodos de tiempo cortos la  $D_A$  es lineal con el tiempo astronómico, pero esta relación se rompe a medida que aumenta la distancia genética por encima de un determinado nivel. Este problema es particularmente agudo con datos de microsatélites de poblaciones divergentes debido a una alta tasa de mutación y un elevado número de alelos. Por otro lado, el estadístico de  $F_{ST}$  de Wright (1969) o índice de fijación, puede ser utilizado como medida de distancias genéticas ya que considera, a diferencia de las distancias convencionales, la tasa de migración entre poblaciones (Slatkin and Voelm, 1991). Otros modelos de distancias comúnmente utilizados son los que se muestran a continuación tomados de (Takezaki and Nei, 2008):

Distancia  $D_A$  de Nei (Nei *et al.*, 1983): Mediante el proceso de mutación de alelos infinitos (IAM), Nei simuló esta distancia y llegó a la conclusión que era más eficiente que la distancia estándar ( $D_s$ ), distancia media ( $D_M$ ), distancia de Reynolds ( $D_R$ ) y la de Cavalli-Sforza ( $D_C$ ):

$$D_A = 1 - (1/r) \sum_j^r \sum_i^m (X_{ij} Y_{ij})^{1/2},$$

Dónde:  $X_{ij}$  y  $Y_{ij}$  son las frecuencias de los  $i$ -ésimos alelos en el  $j$ -ésimo *locus* en la población X e Y y  $m_j$  es número de alelos del  $j$ -ésimo *locus*.

Distancia mínima  $D_M$  de Nei (Nei, 1973)

$$D_m = (J_x + J_y) / 2 - J_{xy}$$

Dónde:  $J_x$  y  $J_y$  son la homocigosis promedio sobre *loci* en la población x e y respectivamente

Distancia estándar  $D_S$ , de Nei (Nei, 1972)

$$D_S = -\ln [J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}]$$

Dónde:  $J_x$  y  $J_y$  son la homocigosis promedio sobre *loci* en la población x e y respectivamente

Cavalli-Sforza y Edwards en el año 1967, proponen la distancia de cuerda o  $D_C$  definida por:

$$D_C = 2/\pi \sum_j [2(1 - \sum_i (X_{ij} Y_{ij})^{1/2})]$$

Dónde:  $X_{ij}$  y  $Y_{ij}$  son las frecuencias de los  $i$ -ésimos alelos en el  $j$ -ésimo *locus* en la población X e Y y  $m_j$  es número de alelos del  $j$ -ésimo *locus*.

De los métodos de distancias mostrados, los que mayor probabilidad de obtener el árbol correcto fueron  $D_A$  y  $D_C$ , y entre ambos, el  $D_A$  obtuvo resultados ligeramente mejores que  $D_C$  en poblaciones con historia conocida (Takezaki and Nei, 1996).

**2.6.2.2.3 Árboles Filogenéticos:** para construir árboles filogenéticos, hay una diversidad de métodos de los cuales destacan dos, que son: el Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA) y Neighbor-Joining (NJ).

El UPGMA es el método más simple de construcción de árboles, y fue originalmente desarrollado en la construcción de fenogramas (representación gráfica de una semimatriz de índices de distancia en los procedimientos feneticistas). En el fenograma, los taxones

se agrupan en función de su similitud global, por ejemplo árboles que reflejan las similitudes fenotípicas entre Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU's), pero son útiles para construir árboles filogenéticos si la tasa de evolución se mantiene constante entre las diferentes líneas estudiadas. El UPGMA utiliza sucesivos agrupamientos con el criterio de distancias promedios, asumiendo una tasa de evolución constante. En un inicio se utilizó para representar el grado de similitud fenotípica en un grupo de especies. Sin embargo puede utilizarse para reconstruir filogenias a partir de datos moleculares, particularmente de frecuencias génicas. Este modelo produce árboles relativamente buenos pero produce mayores errores cuando la cantidad de alelos es pequeña (Takezaki y Nei, 1996).

El método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987), es un método que identifica los pares más próximos de OTU's, de forma que se minimice la longitud total de un árbol. Es importante definir el concepto de "vecino" como dos poblaciones que están conectadas por un nodo en un árbol sin raíz con dos ramas que se unen en un nodo interior. Al principio se obtiene una figura como una estrella en la que todas las ramas parten del mismo punto. Se consideran vecinos el par de grupos que, cuando se juntan, producen el árbol cuya longitud total es la más corta, y éstos se unen para formar una unidad combinada. El procedimiento para identificar los vecinos entre un número reducido de unidades se repite hasta que sólo quedan tres unidades. Así se obtiene un árbol sin raíz. Saitou et al (1987) establecen que con este método se consigue el árbol correcto para datos puramente aditivos, en donde la distancia entre cada par de unidades (OTU'S) es la suma de las longitudes de las ramas que las unen en el árbol. Este método es el más eficiente en la medida que todos los supuestos se cumplen (Tateno *et al.*, 1994).

Para poder tener valores fiables se utilizan las técnicas de remuestreo. El más utilizado es el "bootstrap", que permite la evaluación de la topología mediante la técnica de Monte Carlo. Dado que los datos consisten en  $n$  observaciones, un "bootstrap" genera una muestra de  $n$  dibujos al azar, realizado por medio del reemplazamiento de los valores iniciales. De esta manera, todas las observaciones originales tienen la misma probabilidad de ser reemplazadas, y al final el valor de los nuevos datos será el promedio para el parámetro muestreado (Tivang *et al.*, 1994). El proceso se realiza repetidamente, en cientos hasta miles de veces, creando una gran cantidad de datos, pudiendo calcular promedios y desviaciones estándares (Felsenstein, 1988).

**2.6.2.2.4 Análisis Factorial de Correspondencias (AFC):** El análisis multivariante es un conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente grupos de datos en el sentido de que hay variables medidas para cada individuo u objeto estudiado. Debido a que las variables se consideran simultáneamente, éstas permiten realizar interpretaciones más complejas que en los métodos univariados. El análisis multivariado utiliza las relaciones entre las variables o entre los objetos que el método univariado no considera directamente.

El AFC es una técnica multivariante que analiza las relaciones de interdependencia entre variables. El AFC permite descubrir similitudes entre conjuntos de variables, presentando matrices o tablas de contingencia de frecuencias y valores promedios. Es el equivalente del procedimiento de Componentes Principales para variables cualitativas e intenta explicar una variable hipotética denominada factor, mediante un modelo lineal en el que uno o varios factores son la función de un grupo de variables perceptibles. La técnica es descriptiva para representar tablas en donde se recoge la frecuencia de ocurrencia de dos o más variables cualitativas en un conjunto de elementos. El Análisis de Componentes Principales y el Análisis Factorial de Correspondencia tienen como objetivo encontrar la estructura más sencilla reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información importante. Para realizar esta reducción se simplifica el número de variables a un pequeño número de índices. Cuando trabajamos con microsatélites se cuenta con el programa Genetix v.4.05 (Belkhir et al., 2003), donde se elabora un cuadro que corresponde a una codificación más conveniente para los datos de la genética de los organismos diploides tal como fue propuesto por (She et al., 1987). Los objetos analizados se ven como una nube de puntos en un hiperespacio que tiene tantas dimensiones como alelos. El algoritmo busca las direcciones independientes en este hiperespacio y la longitud de las cuales es la inercia. Estas direcciones, que son definidas por los vectores propios de la matriz, determinan una serie de ejes factoriales. Por convenio, el primer eje es el que tiene la contribución mayor a la inercia total. Para utilizar los datos genotípicos individuales, cada individuo está representado por su resultado para cada modalidad de cada variable categórica, asignando 0 para la ausencia, 1 para la presencia del alelo en el estado heterocigoto y 2 para el estado homocigoto. El Análisis de Correspondencia puede condensar la información de un gran número de alelos y *loci* en pocas variables sintéticas. Con este método las frecuencias alélicas de las poblaciones en todos los *loci*, se usan como variables y el agrupamiento de cada población se representa gráficamente (Li et al., 2005).

**2.6.2.2.5 Asignación de Individuos a una Población:** Se ha descrito una variedad de procedimientos para obtener la correcta asignación de individuos a una población a la que podría pertenecer. Originalmente se utilizaban metodologías descritas por (Paetkau *et al.*, 1995; Rannala and Mountain, 1997; Cornuet *et al.*, 1999). Posteriormente se han utilizado otras metodologías basadas en modelos Bayesianos (Pritchard, *et al.*, 2000; Corander *et al.*, 2008) donde se considera el área geográfica, que han resultado más precisos. Otros trabajos exploran la utilización de coordenadas geográficas basadas en mosaicos de Voronoi (Durand *et al.*, 2005; Guillot, 2008; Gillot *et al.*, 2009).

Los dos métodos más utilizados para asignar individuos a poblaciones son: basados en distancias genéticas y modelos probabilísticos.

**2.6.2.2.5.1 Modelos Basados en Distancias:** Se han descrito anteriormente y consisten en establecer una distancia entre el individuo y la población. Se han definido numerosos métodos de distancias genéticas: las distancias entre poblaciones (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967; Nei, 1972) y las distancias entre individuos (Bowcock *et al.*, 1994). Se construye una matriz entre pares de individuos, se crea una representación gráfica con apariencia de un árbol y los grupos son identificados visualmente. La presencia de alelos nulos, patrón de mutación, y la homoplasia (similitud no debida a parentesco), pueden ser factores de error que afectan la utilidad de estas herramientas.

**2.6.2.2.5.2 Métodos Probabilísticos:** Funcionan con dos supuestos que deben cumplirse: que no haya desequilibrio de ligamiento y que las frecuencias alélicas se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg.

**Método de frecuencias:** Descrito originalmente por Paetkau *et al.* (1995), consiste en asignar un individuo a una población basándose en el valor de probabilidad de su genotipo individual de pertenecer a ella. La asignación por este método se realiza en tres etapas: Las frecuencias alélicas de todas las poblaciones potenciales se calculan luego, la probabilidad de ocurrencia de cada genotipo y finalmente asigna el individuo a la población en la cual el genotipo obtuvo la mayor probabilidad.

**Métodos Bayesianos:** (Pritchard *et al.*, 2000) introdujeron un método para identificar poblaciones diferentes considerando dos modelos: el primero es un “no admixture model” o modelo de individuos no mezclados, en el que se asume que los individuos son puros provenientes de alguna de las  $k$  poblaciones y el “admixture model” o modelo mezclado,

en el que se supone que han existido cruzamientos de los ancestros; es decir, una fracción  $q_k$  del genoma de un individuo viene de la subpoblación  $K$  ( $\sum_k q_k = 1$ ) en el que se asume que no hay ligamiento dando información propia de los ancestros. Posteriormente se incluyó en el modelo la existencia de ligamiento entre marcadores, en el modelo combinado, que contabiliza la correlación entre los marcadores ligados que surgen del resultado de esa mezcla. Este modelo permite la estimación del origen de la región del cromosoma dentro del individuo y proporciona una mejor resolución en el estudio del proceso histórico de la muestra (Falush *et al.*, 2003). Los principales supuestos para estos modelos son que las frecuencias alélicas están en equilibrio de ligamiento y que existe equilibrio Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones, por tanto, la similitud del genotipo del individuo está condicionada por las frecuencias alélicas en su población de origen (Pritchard *et al.*, 2000).

### **2.6.2.3 Contribución a la diversidad.**

#### **→ Método de Weitzman (1992):**

Como se ha descrito en la sección correspondiente, la medida de la diversidad genética dentro de razas (intra-racial) utilizando marcadores moleculares se realiza mediante el cálculo de una serie de parámetros como la heterocigosidad, la riqueza alélica o el estadístico  $F_{IS}$  entre otros, mientras que para medir las diferencias genéticas entre razas (diversidad genética inter-racial) se suelen calcular distancias genéticas entre ellas. La medida de la diversidad genética entre razas mediante el cálculo de distancias genéticas ha sido criticada por varios autores (Caballero and Toro, 2002; García and Cañón, 2007) y como consecuencia en los últimos años se han desarrollado nuevas medidas de la diversidad genética más complejas con el objeto de priorizar razas para la conservación de una forma objetiva según la contribución de cada una de ellas a la diversidad genética global. Weitzman propone un método que utiliza distancias genéticas entre pares de poblaciones para obtener una única medida que tiene la propiedad de que si se añade una población, la diversidad total es al menos la misma que había antes y si las distancias genéticas entre las poblaciones aumentan también lo hace la diversidad. La contribución de una raza a la diversidad total puede conocerse calculando la diversidad total incluyendo y excluyendo esta raza y comparando los valores de diversidad obtenidos (Weitzman, 1992, 1993). Este método tiene el inconveniente de que no tiene en cuenta la diversidad genética dentro de razas, los cálculos son más complejos de realizar, asume distancias

ultramétricas (Goyache et al., 2006; Thaon D'Arnoldi et al., 1998) y por ello se han ido incorporando otros métodos. Se han desarrollado otras metodologías para priorizar razas para la conservación en los que se tiene en cuenta la diversidad genética entre y dentro de razas (Boettcher et al., 2010), aunque no existe un consenso en cuanto al peso relativo que cada una de ellas debe tener a la hora de plantear un programa de conservación y muchas veces los resultados obtenidos difieren en función de la metodología utilizada.

**→Método de Caballero y Toro (2002):**

El método de Caballero y Toro (2002) utiliza como herramienta la Diversidad Genética de Nei (1987):  $GD=1-f$ , donde  $f$  es la coancestría molecular total, equivalente al coeficiente de parentesco.

La contribución a la diversidad según este método tiene 2 componentes: la diversidad intrapoblacional, y la distancia genética entre razas, por lo que:

$$GD_T=GD_W+GD_B$$

En este caso, la Diversidad Genética, tiene que mantenerse máxima en el grupo de razas a preservar. Esto equivale a minimizar la coancestría molecular total ( $f$ ). Una contribución positiva a la diversidad, equivale, con este método, a que el grupo que queda aumenta la diversidad total, como consecuencia, la población a estudiar no sería escogida para su conservación por su aportación. Con este método se valora la diversidad genética; cuanto más diversa sea una población, mejor, por lo que si la población en estudio es poco diversa, no resultará elegida para su conservación, pues no añade valor al pool genético, el conjunto de poblaciones que nos quedaría es más diverso que el que pretendemos conservar.

**→Método de Petit et al. (1998):**

El método de Petit et al. (1998) tiene un enfoque distinto. Usa un estimador de la riqueza alélica en toda la población:  $k_T^g$  y  $k_{T/i}^g$  es el estimador de la riqueza alélica total cuando se excluye la población en estudio (i).

La contribución a la diversidad según este método tiene 2 componentes: la contribución debida a la riqueza alélica de la población en estudio, y la contribución debida a su divergencia (a lo distinta que es del resto de poblaciones), por lo que:

$$C_T^g(i) = \frac{k_T^g - k_{T/i}^g}{k_T^g - 1}$$

Donde  $k_T^g$  es la riqueza alélica de toda la población (metapoblación) y  $k_{T/i}^g$  es la riqueza alélica de la población restante, excluyendo la población en estudio.

$C_T^g(i)$  tiene 2 componentes:  $C_S^g(i)$  que es la contribución a la riqueza alélica total debido a la riqueza propia de la población (i) estudiada; y  $C_D^g(i)$  que es la contribución debida a su divergencia.

Se obtienen así:

$$C_S^g(i) = \frac{1}{n} \left( \frac{k_i^g - k_{T-i}^g}{k_T^g - 1} \right)$$

Donde  $k_{T-i}^g$  es la riqueza alélica (en número de alelos) de la población restante, tras quitar la población que interesa.

La contribución debida a la divergencia es la resta de los dos cálculos anteriores:

$$C_D^g(i) = C_T^g(i) - C_S^g(i)$$

Una contribución positiva a la diversidad de una población dada utilizando este método, significa que el grupo de poblaciones que queda tiene menor número de alelos que el original (que incluía la población de estudio), como consecuencia, la población estudiada sería elegida para su conservación.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### *3.1 Poblaciones en estudio*

Para la realización de los análisis presentados en este estudio se ha trabajado con la totalidad de la población de caballo Marismeño (1387 muestras), aunque para determinados análisis se han tomado muestras de la población Marismeña de forma aleatoria.

Se incluyen muestras de trece poblaciones más, obtenidas del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del Grupo de Investigación AGR-218 de la Universidad de Córdoba. Ocho razas autóctonas españolas: Pura Raza Español (PRE) (60); Retuertas (RET) (55); Mallorquín (MAL) (30); Menorquín (MEN)(69); Trotador Español (TRO)(46); Pottok (POT)(26); Asturcón (AST)(39); y Losino (LOS) (59). Dos razas internacionales: Árabe (ARA) (48); Pura Sangre Inglés (PSI) (46). Y se añadieron muestras de la raza Hispano-Árabe (HA) (60), Berberisco (21) y Sorraia (23).

### 3.2 Procesamiento y análisis de las muestras

Se utilizó un panel de 25 microsatélites seleccionados a partir de las recomendaciones hechas por la FAO/ISAG (Food and Agriculture Organization/ International Society on Animal Genetics) para realizar estudios de biodiversidad genética equina (FAO, 2004). La tabla 2 muestra los datos generales de los microsatélites utilizados. Hay que señalar que el microsatélite LEX3 está ligado al cromosoma X y no se utiliza en los estudios de diversidad genética. Sin embargo, se ha dejado en el presente trabajo puesto que estos mismos animales se han sometido a control de filiación como paso previo para su inscripción en el Libro Genealógico y por tanto se ha analizado este marcador en todos los animales.

Tabla 1.- Microsatélites analizados, secuencias de los primers directo y reverso, rango de tamaños en pares de bases (bp) y referencias bibliográficas.

<b>Microsatélite</b>	<b>Directo y reverso (5´-3´)</b>	<b>(bp)</b>	<b>Referencia</b>
AHT4	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT ACGGACACATCCCTGCCTGC	138-170	(Binns et al., 1995)
AHT5	GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC	128-156	(Binns et al., 1995)
ASB17	GAGGGCGGTACCTTTGTACC CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	89-131	(Breen et al., 1997)
ASB2	CCTTCCTGTAGTTTAAGCTTCTG CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	222-256	(Breen et al., 1997)
ASB23	GCAAGGATGAAGAGGGCAGC CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC	179-213	(Lear et al., 1999)
HMS3	CCAACCTCTTTGTACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	150-174	(Guerin et al., 1994)
HMS6	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA	153-171	(Guerin et al., 1994)

<b>Microsatélite</b>	<b>Directo y reverso (5´-3´)</b>	<b>(bp)</b>	<b>Referencia</b>
HMS7	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	167-191	(Guerin et al., 1994)
HTG10	CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA TTTTTATTCTGATCTGTACATTT	89-115	(Marklund et al., 1994)
HTG4	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	127-141	(Ellegren et al., 1992)
LEX3	ACATCTAACCAGTGCTGAGACT AAGAACTAGAACCTACAACACTAGG	194-220	(Shiue et al., 1999)
LEX33	TTTAATCAAAGGATTGAGTTG TTTCTCTTCAGGTGTCCTC	194-220	(Shiue et al., 1999)
VHL20	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	89-107	(Van Haeringen et al., 1994)
TKY312	AACCTGGGTTTCTGTTGTTG GATCCTTCTTTTTATGGCTG	90-130	(Tozaki et al., 2001)
TKY301	AATGGTGGCTAATCAATGGG GTGTATGATGCCCTCATCTC	140-170	(Tozaki et al., 2001)
TKY337	AGCAGGGTTTAATTACCGAG TAGATGCTAATGCAGCACCAG	170-185	(Tozaki et al., 2001)
TKY297	GTCTTTTTGTGCCTCGGTG TCAGGGGACAGTGGCAGCAG	215-250	(Tozaki et al., 2001)
TKY344	GTGTCCATCAATGGATGAAG CTTAAGGCTAAATAATATCCC	75-115	(Tozaki et al., 2001)
TKY343	TAGTCCCTATTTCTCCTGAG AAACCCACAGATACTCTAGA	135-170	(Tozaki et al., 2001)
TKY321	TTGTTGGGTTTAGGTATGAAGG GTGTCAATGTGACTTCAAGAAC	175-210	(Tozaki et al., 2001)
TKY287	ATCAGAGAACACCAAGAAGG TCTCTGCTATAGGTAAGGTC	215-245	(Tozaki et al., 2001)
TKY333	CCTTCACTAGCCTTCAAATG TTGTGTTTAGACAGTGCTGC	85-155	(Tozaki et al., 2001)
TKY341	TATCCAGTCACCCATTTTAC TTGTGTCAGTACACTCTATG	135-160	(Tozaki et al., 2001)
TKY 294	GATCTATGTGCTAGCAAACAC CTAGTGTTCAGATAGCCTC	210-235	(Tozaki et al., 2001)
TKY394	GCATCATCGCCTTGAAGTTG CCTTTCTGGTTGGTATCCCTG	230-260	(Tozaki et al., 2001)

Se extrajo el ADN del pelo de los animales muestreados tomando 5 hebras de pelo con folículo piloso. Se procedió a agregar a la muestra de pelo 100 µL de una resina al 5% (CHELEX de Biorad). Posteriormente se sometió a 95°C durante 5 min y posteriormente se congeló a -20°C. En el caso de las muestras de sangre, se mezclaron 3 µl de sangre total

con 100 µl de resina, se incubó a 95 °C durante 5 min y se conservó a -20 °C. Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se tomaron 5 µl de cada muestra para un volumen final de 25 µl. La concentración de Mg<sup>2+</sup> fue de 2,5 mM, 0,3 µM de cada cebador, 200 µM de los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y 1Ud de DNA polimerasa.

Los fragmentos obtenidos de la PCR se separaron por medio de una electroforesis en un gel de poliacrilamida utilizando un secuenciador automático ABI Prism 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Con el programa Genescan Analysis (Genescan 672 v.3.1.2) se analizaron los datos obtenidos del secuenciador automático que proporciona información del tamaño de los fragmentos estudiados.

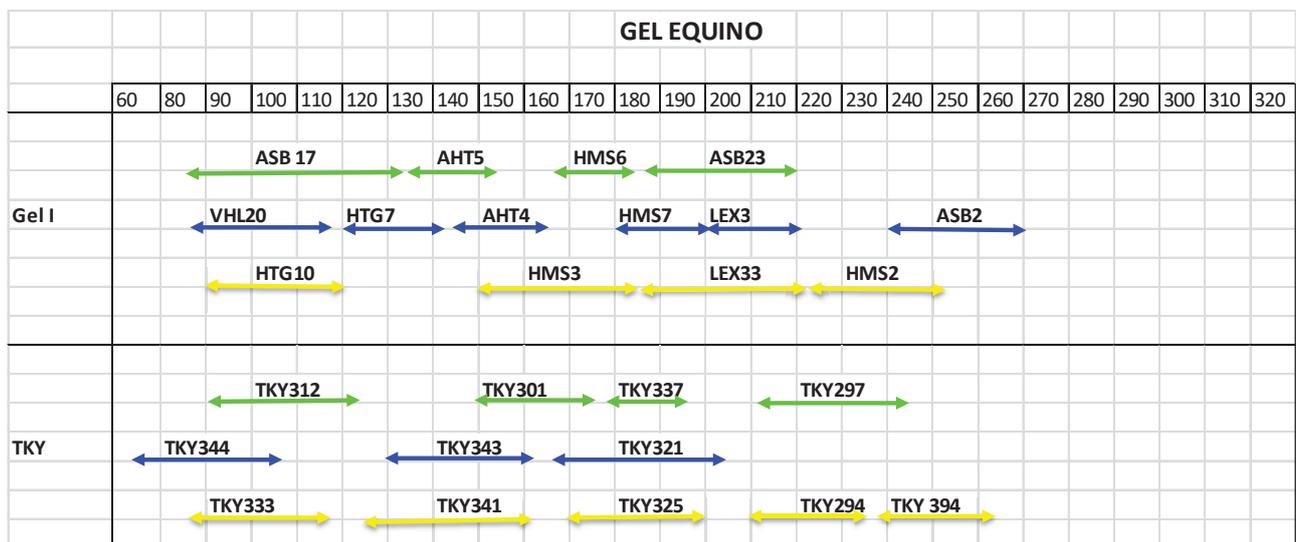


Figura 2. Distribución de los microsatélites en los geles utilizados en el secuenciador.

Se utilizó el estándar Genescan 400HD-ROX para calcular el tamaños de los fragmentos entre 60 y 400 nucleótidos.

Una vez calculado el tamaño de cada banda se exportaron los ficheros de datos al programa Genotyper 3.7. Con ayuda de este programa se identifican los diferentes alelos presentes en cada uno de los microsatélites.

Se aconseja emplear una denominación alélica y no el tamaño del fragmento calculado por el programa ya que se producen variaciones entre tandas de electroforesis que pueden dar lugar a errores, por esa razón se tipifica siempre un mismo individuo en todas las tandas de muestras.

### 3.3 Análisis estadístico

#### 3.3.1 Variabilidad Intrapoblacional

Para evaluar la variabilidad genética dentro de cada población, se calcularon los siguientes parámetros: la heterocigosidad observada y esperada ( $H_e$ ,  $H_o$ ), total de alelos por población ( $N_a$ ), número medio de alelos por población ( $MNA$ ), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), el contenido de información polimórfica (PIC) y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg por población. Para calcular las frecuencias alélicas, las heterocigosidades y el valor de Fis (Wright, 1965; Weir and Cockerham, 1984) se utilizó el programa Genetix v. 4.02 (Belkhir et al., 2003). Para el cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) se utilizó el programa GENEPOP v.3.1c (Raymond and Rousset, 1995) mediante la aplicación del test exacto de Fisher usando el método en cadena de Monte Carlo Markov, desmemorización = 5000, 100 lotes y 10000 iteraciones por lote (Guo and Thompson, 1992). Para el cálculo del Contenido de Información Polimórfica (PIC) de cada microsatélite se aplicó la fórmula propuesta por (Botstein et al., 1980) empleando el complemento The EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT (Park, 2001), utilizando el programa EXCEL. Se practicó un análisis factorial de correspondencias, mediante el programa GENETIX v. 4.02 (Belkhir et al., 2003).

#### 3.3.2 Estructura y distancia entre poblaciones, asignación individual

Se obtuvo una matriz de distancias genéticas (Nei *et al.*, 1983) utilizando el programa POPULATIONS 1.2.28 (Olivier Langella, [www.cnrsgif.fr/pge/bioinfo/populations/](http://www.cnrsgif.fr/pge/bioinfo/populations/)). Con los valores obtenidos se calcularon árboles de distancias. Para representar gráficamente los árboles de distancias se empleó el programa TREEVIEW (Page, 1996).

Se utilizó la versión 2.2.3 del programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), para identificar la estructura de las K poblaciones utilizadas y al mismo tiempo calcular las proporciones de mezcla (*Admixture*). El programa también permite la detección de individuos puros de los grupos formados, así como el potencial de individuos mezclados entre los diferentes K. Se aplicó un modelo Bayesiano Monte Carlo Cadena de Markov (MCMC) que utiliza modelos basados en *clusters* o agrupamientos de individuos. Los criterios de agrupación de los individuos fueron el de reducir al mínimo el equilibrio Hardy-Weinberg y la fase de desequilibrio entre *loci* dentro de los grupos. El programa DISTRICT (Rosenberg, 2004)

también fue empleado en la representación gráfica de la estructura de la población, por tener una mayor variedad de colores disponibles. Se evaluó la estructura de la población utilizando todo el conjunto de la muestra ( $n = 599$ ), y suponiendo que éstos pertenecen a un número desconocido de  $K$  grupos diferentes genéticamente. El valor de probabilidad posterior de  $K$  se calculó por duplicado y progresivamente de 2 a 9, con 1.000.000 de repeticiones MCMC y un periodo previo de calentamiento de 200.000 iteraciones sin información previa. Se calculó la proporción de mezcla con la información de las poblaciones una vez obtenido el valor óptimo de  $K$ .

Los archivos resultantes de STRUCTURE posteriormente se representaron gráficamente con DISTRUCT (Jacobson and Rosenberg, 2007).

Se realizaron 8 simulaciones independientes (de  $K=2$  a  $K=9$ ) para identificar el  $K$  más probable mediante la determinación de la distribución modal de  $\Delta K$  (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005) utilizando el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012). Este test se utiliza para detectar la habilidad del algoritmo utilizado por el programa STRUCTURE para asignar individuos a su grupo de origen cuando hay más de 2 poblaciones. El análisis se utiliza para detectar el número de grupos genéticos que encajan mejor en la base de datos, utilizando la determinación de la distribución modal de  $\Delta K$ . El resultado depende del marcador utilizado, el número de loci analizados, el número de poblaciones muestreadas y del número de individuos por muestra. La estructura genética no siempre resulta ser un reflejo de la distancia geográfica entre poblaciones.

### **Test de asignación**

El método aplicado considera que existen una serie de poblaciones de referencia o razas de caballos con las que los Caballos Marismeños pueden o no haber tenido relación en el pasado, pero que sirven para verificar si el método estadístico utilizado tiene la suficiente capacidad de asignación. Las muestras de estas poblaciones de referencia, así como los genotipos fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del Grupo de Investigación AGR218 en Córdoba. En el caso de este trabajo la dificultad surge como consecuencia de que es esperable que un elevado porcentaje de las muestras sean el fruto de cruzamientos recientes con otras razas, por lo que era de interés aplicar un procedimiento que pudiese estimar composiciones mezcladas de genomas provenientes de varias poblaciones. Se utilizó un método no supervisado (Pritchard et al., 2000) que asume situación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias de los alelos, estimando para cada individuo incluido en el análisis, la probabilidad de que pertenezca a

cada una de las poblaciones consideradas ancestrales. Esta probabilidad es en realidad la distribución posterior de cada porcentaje de genoma que proviene de las poblaciones ancestrales y es calculada aplicando un enfoque bayesiano utilizando técnicas MCMC (Monte Carlo Markov Chain). Este procedimiento presenta como ventajas más destacables el no requerir especificar las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales y la de permitir tener en cuenta situaciones genéticas complejas, incluyendo el caso de muestras que provienen de la mezcla entre varias poblaciones. En este caso, esta posibilidad es de gran importancia ya que es esperable que un elevado porcentaje de muestras de Caballos Marismeños provengan del cruzamiento entre los reproductores de alguna de las razas de referencia, de tal manera que el genoma de estas razas estará representado en las muestras de caballos en diferentes proporciones que resulta de interés detectar. Para aplicar este procedimiento se utilizó el software STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Se determinó el promedio de asignación individual ( $q$ ) definida como la proporción media de cada genotipo que se infiere y que procede de cada uno de los  $K$  grupos. Los coeficientes de las poblaciones muestreadas a la  $K$  ( $K = 2-K=9$ ) también fueron evaluados, según lo descrito por Pritchard *et al.* (2000) . Se tomó como valor umbral  $q \geq 0,70$ . Indicaría que los animales con  $q \geq 0,70$  podrían ser asignados como representantes de la raza correspondiente o que pueden ser utilizados como rescatables en programas de conservación. Los individuos con  $q < 0,70$  para cada grupo fueron considerados como cruzados. Del mismo modo, un grupo de la muestra fue asignado a otro grupo si su promedio  $q$  era más de 0,70, o conjuntamente, perteneciente a más de un grupo, si la  $q$  de cada grupo era inferior a 0,70.

### 3.3.3 Contribución a la diversidad

Para este estudio se ha incluido la raza equina Marismeña en un estudio más amplio que comprende 12 razas equinas, algunas autóctonas de España y algunas razas internacionales. De esta forma se ha determinado la contribución de la raza equina Marismeña a la diversidad genética equina global de la Península Ibérica. Se han utilizado tres métodos: el de Weitzman (1992), el de Petit et al. (1998) y el de Caballero y Toro (2002).

Mediante el método de Weitzman (1992) se han calculado las contribuciones parciales de cada raza al total de la diversidad genética utilizando la distancia genética de Reynolds (Reynolds et al., 1983).

Para realizar la cuantificación con los métodos de Pétit et al. (1998) y Caballero y Toro (2002) se ha utilizado el programa MOLKIN v.3.0 (Gutierrez et al., 2005).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Variabilidad intrarracial de la población Marismeña.

	NA	RA	He	Ho	PIC	F <sub>IS</sub>	P-value
AHT4	7	6,859	0,7901	0,7869	0,7511	0,044	0,1596
AHT5	6	5,861	0,7876	0,7500	0,7407	0,048	0,4454
ASB17	11	9,982	0,8820	0,7869	0,8619	0,004	0,0757
ASB2	12	9,000	0,8740	0,8036	0,8517	-0,071	0,9475
ASB23	7	5,969	0,8075	0,8596	0,7704	-0,046	0,9659
HMS3	8	7,000	0,8174	0,7500	0,7868	0,088	0,0418*
HMS6	6	5,969	0,7198	0,7193	0,6769	0,026	0,1906
HMS7	6	5,000	0,7407	0,7541	0,6977	-0,061	0,1353
HTG10	8	5,999	0,7230	0,7167	0,6779	-0,021	0,3122
HTG4	7	4,998	0,7420	0,6721	0,6925	0,077	0,0219*
LEX3#	9	8,998	-	-	-	-	-
LEX33	11	8,000	0,8536	0,8070	0,8279	-0,045	0,3195
VHL20	9	8,843	0,8658	0,8056	0,8363	0,071	0,1337
TKY287	8	7,905	0,7618	0,8136	0,7235	-0,095	0,3859
TKY294	8	6,987	0,7443	0,7167	0,7091	0,035	0,3068
TKY297	9	7,884	0,7908	0,7333	0,7555	0,141	0,1474
TKY301	7	6,980	0,8090	0,8361	0,7743	-0,038	0,4651
TKY312	10	8,843	0,8153	0,8852	0,7874	-0,043	0,1416
TKY321	9	7,873	0,7709	0,6833	0,7384	0,260***	0,0026***
TKY333	8	6,000	0,8302	0,9180	0,7988	-0,087	0,6079
TKY337	7	6,771	0,7255	0,6571	0,6798	0,095	0,0952
TKY341	7	6,874	0,7452	0,8333	0,7025	-0,159	0,4428
TKY343	10	9,943	0,7843	0,8033	0,7559	0,004	0,7333
TKY344	8	7,716	0,7513	0,7049	0,7090	0,076	0,0347*
TKY394	8	7,874	0,8066	0,7500	0,7740	0,115	0,0981
	8,24	7,365	0,7906	0,7444	0,7548	0,007	

---

Tabla 2- Microsatélites analizados, número de alelos por marcador (NA), Riqueza Alélica (RA), Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), Contenido de Información Polimórfica (PIC), Coeficiente de Consanguinidad ( $F_{IS}$ ) y p-value de las desviaciones del Equilibrio Hardy-Weinberg.

# Los valores ofrecidos son calculados como si fuese un marcador autosómico pero en realidad está ligado al cromosoma X.

---

En la tabla 2 se pueden ver los resultados para los 25 microsatélites utilizados. Todos los microsatélites son muy informativos y han resultado polimórficos, mostrando un mínimo de 6, para los microsatélites AHT5, HMS6 y HMS7, y un máximo de 12 alelos en el microsatélite ASB2.

La heterocigosidad esperada más alta se encuentra en el marcador ASB2 con un valor de 0,87 y la más baja para el HMS6 con un valor de 0,72 (tabla 2). Los valores de heterocigosidad observada oscilan entre un máximo de 0,92 para el marcador TKY333 y un mínimo de 0,68 para el microsatélite HMS6. Los valores medios de  $H_e$  y  $H_o$  son 0,79 y 0,74 respectivamente. Considerando que un valor de PIC superior a 0,50 indica que un marcador es muy informativo, podemos decir que todos los marcadores son muy informativos a la hora de detectar variabilidad genética en la raza equina Marismeña, pues todos se encuentran por encima del mencionado valor.

En la tabla 2 se recogen también los resultados del análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y el resultado es que solamente cinco de los 25 marcadores se desvían significativamente.

El coeficiente de consanguinidad ( $F_{IS}$ ) muestra que el marcador TKY321 posee un exceso significativo de homocigotos en la población. Sin embargo el valor medio de  $F_{IS}$  de la población es de 0,007, que no es significativamente diferente de 0, lo que nos indica que la muestra de la raza equina Marismeña es homogénea.

Respecto a los estadísticos F (Weir & Cockerham) para los 25 microsatélites, los valores promedio fueron:  $F_{IS}$ = 0,010,  $F_{IT}$ = 0,099 y  $F_{ST}$ = 0,089. El valor de  $F_{IS}$  próximo a 0 indica que las muestras de las diferentes poblaciones son homogéneas y que hay diferenciación genética entre poblaciones del 9%

#### *4.2 Comparación genética de la población Marismeña con otras razas.*

Población	Nº	He (SD)	Ho (SD)	No Alelos (SD)	Coefficiente de Consanguinidad $F_{IS}$
Árabe	60	0,6754 (0,0215)	0,6547 (0,0123)	6,32 (1,55)	0,0307
Berberisco	21	0,7598 (0,0176)	0,7657 (0,0185)	7,32 (1,63)	-0,0080
Hispanoarabe	40	0,7664 (0,0125)	0,7520 (0,0137)	7,24 (1,79)	0,0190
PRE	60	0,7388 (0,0189)	0,7138 (0,0117)	7,64 (1,52)	0,0341
Pura Sangre Inglés	60	0,7348 (0,0119)	0,7175 (0,0116)	5,72 (0,94)	0,0236
Retuertas	67	0,7137 (0,0172)	0,7359 (0,0108)	6,76 (1,13)	-0,0313*
Sorraia	23	0,6418 (0,0210)	0,6194 (0,0203)	4,48 (1,08)	0,0357
Marismeño	50	0,7938 (0,0107)	0,8016 (0,0113)	8,48 (2,06)	-0,0099

SD, desviación estándar; \*Valores significativos para exceso o defecto de heterocigotos ( $P < 0.05$ )

Tabla 3. Tamaño muestral, He, Ho, número de alelos y  $F_{IS}$  de las poblaciones estudiadas.

La Tabla 3 muestra los valores del tamaño muestral,  $He$ ,  $Ho$ , número de alelos y  $F_{IS}$  para cada población. El mayor número de alelos se encuentra en la población Marismeña derivado de la alta variabilidad genética que tiene, y el menor se encuentra en el Sorraia, una población de caballos muy reducida con altos niveles de consanguinidad. También los valores de  $He$  reflejan esta circunstancia con un valor mínimo en el Sorraia y un máximo en el Marismeño. La  $Ho$  obtuvo un valor mínimo de 0,62 (Sorraia) y un máximo de 0,80 (Marismeño).

Se obtuvieron valores de  $F_{IS} < 0,10$ , reflejando muestras homogéneas de las poblaciones. Los valores de  $Ho$  fueron mayores que  $He$  en las poblaciones de Berberisco, Retuertas y Marismeño, reflejando  $F_{IS}$  negativo en cada caso. Valores negativos de  $F_{IS}$  podrían indicar mayores niveles de heterocigosidad observada que los esperados bajo equilibrio, lo que puede ser consecuencia del denominado efecto *Wahlund* (presencia de subpoblaciones).

### 4.3 Estructura y distancias entre poblaciones:

#### 4.3.1 Distancias genéticas

Se emplean dos modelos de distancias para comprobar la robustez de los resultados obtenidos, y se utilizan razas de referencia (PSI, PRá, PRE...) para valorar la bondad del análisis estadístico efectuado y relativizar los resultados obtenidos.

	ARA	BER	HA	PRE	PSI	RET	SOR	MAR
Árabe	0	0,1869	0,0819	0,1728	0,1967	0,2118	0,3864	0,1344
Berberisco	0,0952	0	0,1398	0,1376	0,2631	0,2080	0,3332	0,1180

Hispanoarabe	0,0333	0,0470	0	0,06995	0,1753	0,1486	0,3392	0,0762
Pura Raza Española	0,1075	0,0543	0,0321	0	0,2035	0,1390	0,3106	<b>0,0661</b>
Pura Sangre Inglés	0,1235	0,1050	0,0787	0,0978	0	0,2772	<b>0,3984</b>	0,1535
Retuertas	0,1205	0,0811	0,0676	0,0748	0,1305	0	0,2805	0,1161
Sorraia	<b>0,2036</b>	0,1535	0,1525	0,1537	0,1801	0,1403	0	0,3005
Marismeño	0,0693	0,0278	0,0215	<b>0,0249</b>	0,0637	0,0497	0,1265	0

Tabla 4. Distancias genéticas de 8 poblaciones equinas basadas en la distancia  $D_A$  de Nei (1983) (diagonal superior) y los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) por pares de poblaciones (diagonal inferior).

En la diagonal superior de la tabla se muestran las distancias genéticas basadas en la  $D_A$  de Nei (1983) para las 8 poblaciones estudiadas, en la diagonal inferior se reflejan los índices de fijación para todos los pares de razas de caballos.

Las distancias de Nei ( $D_A$ ) más pequeñas se encuentran entre la población Marismeña y el PRE. Este dato no es sorprendente, debido a los cruces que se han producido tradicionalmente entre las yeguas Marismeñas y sementales PRE. La distancia más grande la encontramos entre el PSI y el Sorraia.

Los valores del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) en las razas estudiadas han ofrecido valores similares aunque el más alto se obtiene entre las poblaciones Sorraia y Árabe. El valor más bajo se ha hallado entre el caballo Marismeño y el PRE (0,0249).

En la fila inferior, se ven los resultados del índice de fijación del caballo Marismeño con el resto de razas. Los valores tan bajos de  $F_{ST}$  encontrados excepto con el Sorraia nos indican que se trata de una raza que ha sido sometida a muchos cruces recientes con diversas razas.

#### 4.3.2 Árbol de distancias $D_A$ de Nei utilizando el método Neighbor Joining.

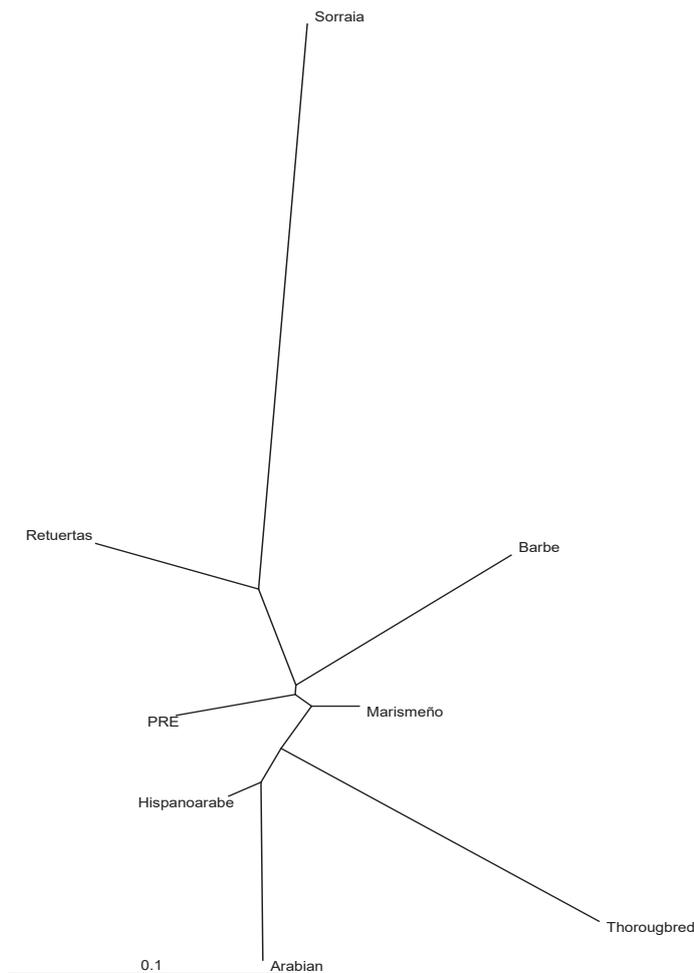


Figura 3. Árbol de distancias *Da* de Nei.

El árbol de distancias *Da* de Nei, se muestra en la figura 3. La raza Sorraia se encuentra claramente diferenciada y lejos del resto de razas representadas en el árbol. Hay que destacar que la población del caballo de las Retuertas no se ha agrupado con ninguna de las poblaciones europeas, igual que el Sorraia, probablemente debido a su aislamiento geográfico y origen común de ambas en la zona sur de la Península Ibérica. El caballo Hispano-Árabe, el Árabe y el PSI se agruparon juntos debido a que comparten origen, pues el caballo Árabe es ancestro de muchas razas actuales. El caballo Marismeño presenta una rama muy corta; este hecho es probable que se deba a su reciente proceso de definición como raza (que todavía está en curso). Se puede apreciar la influencia del PRE, el Árabe y el caballo Berberisco en su pool genético, y por ello lo encontramos en el centro del árbol de distancias *Da* de Nei.

#### 4.3.3 Análisis Factorial de Correspondencia.

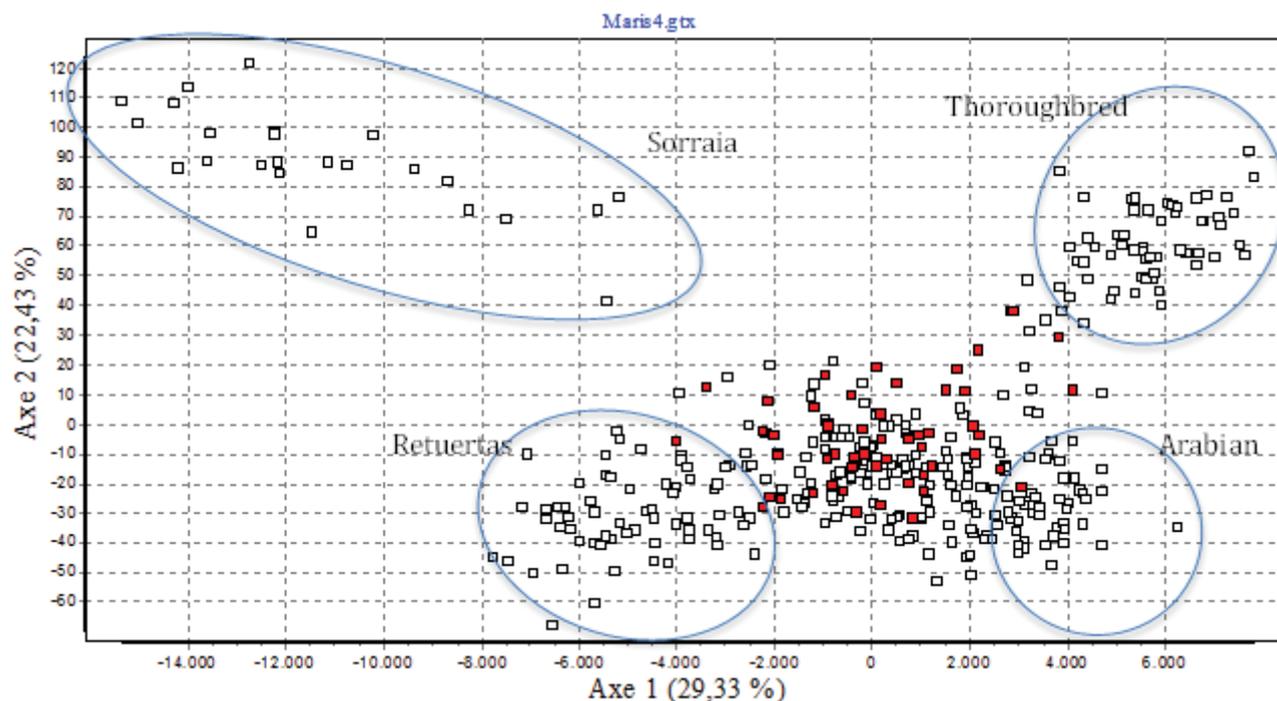


Figura 4. Análisis factorial de correspondencia.

El análisis factorial de correspondencias mostró 5 agrupamientos. El eje 1 explica el 29,33% y el eje 2 el 22,43%. En rojo, y en un lugar central, se puede ver el lugar que ocupa la población de caballo Marismeño, próximo al Hispano-Árabe y al PRE, resultando casi inapreciable la diferenciación genética entre las razas. El Sorraia, Retuertas y PSI sí se hallan muy diferenciados en este gráfico, lo cual es congruente con el resto de análisis realizados.

Se realizó un segundo análisis factorial de correspondencias, esta vez agrupando las 12 razas (ver figura 5). De nuevo con este análisis se obtiene como resultado que el caballo Marismeño se encuentra en una posición central, e independiente de las demás razas equinas. La coherencia del análisis se confirma con la distribución de las razas que comparten parte de su genoma, como el Árabe e Hispano-Árabe, las razas Mallorquina y Menorquina o los procedentes de los caballos antiguos centroeuropeos como el Potoka, el Losino y el Asturcón. Es evidente también que, aunque se diferencia de estas razas, existe una proximidad genética sobre todo entre el caballo Marismeño y el Pura Raza Español. Estos resultados se asemejan a los ya reportados por Vega-Pla et al. (2006).

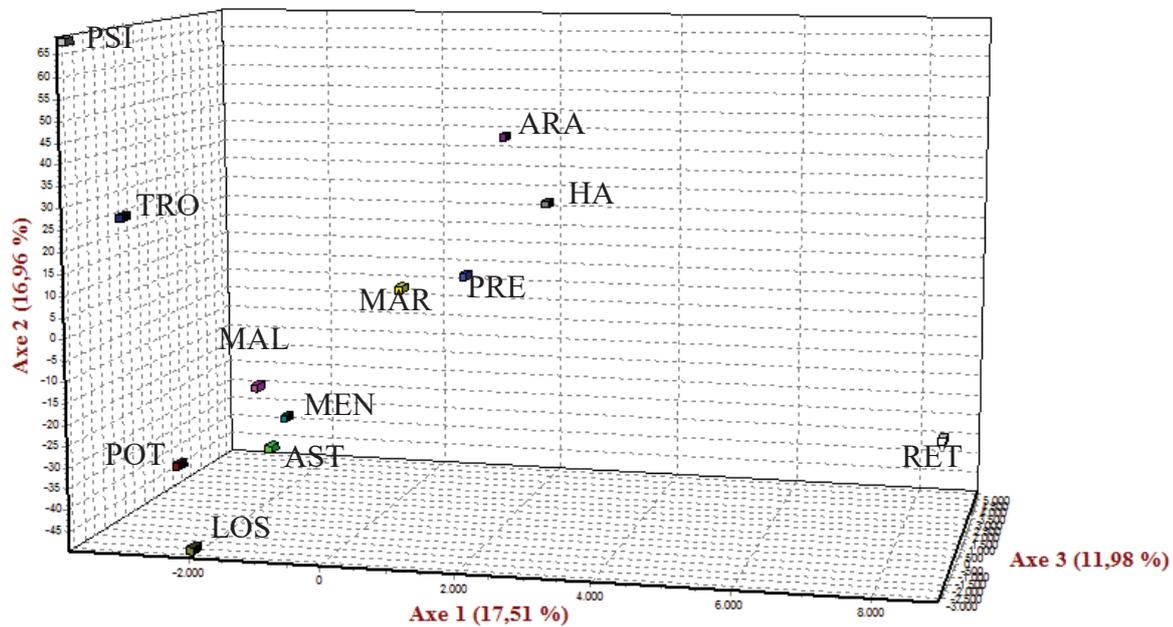
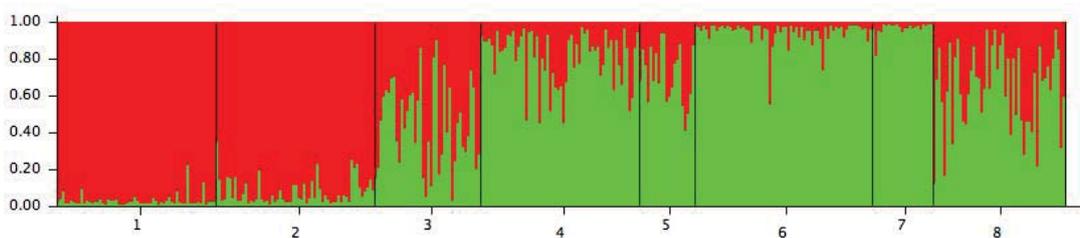
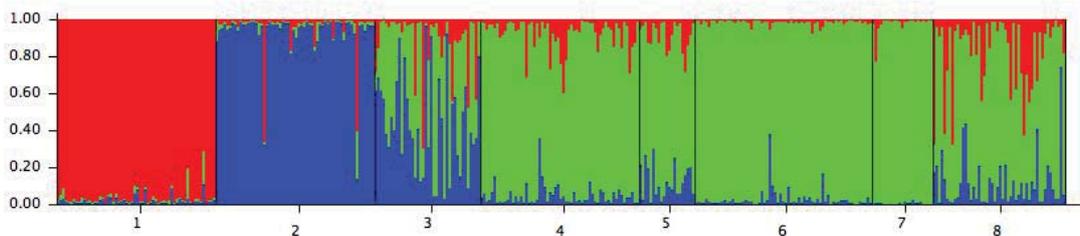


Figura. 5. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia de 12 poblaciones equinas  
 MAR: Caballo Marismeño; PRE: Pura Raza Español; RET: Caballo de Las Retuertas; HA: Hispano-Árabe;  
 MAL: Mallorquín; MEN: Menorquín; TRO: Trotador Español; POT: Pottoka; AST: Asturcón; LOS: Losino;  
 ARA: Pura Raza Árabe; PSI: Pura Sangre Inglés

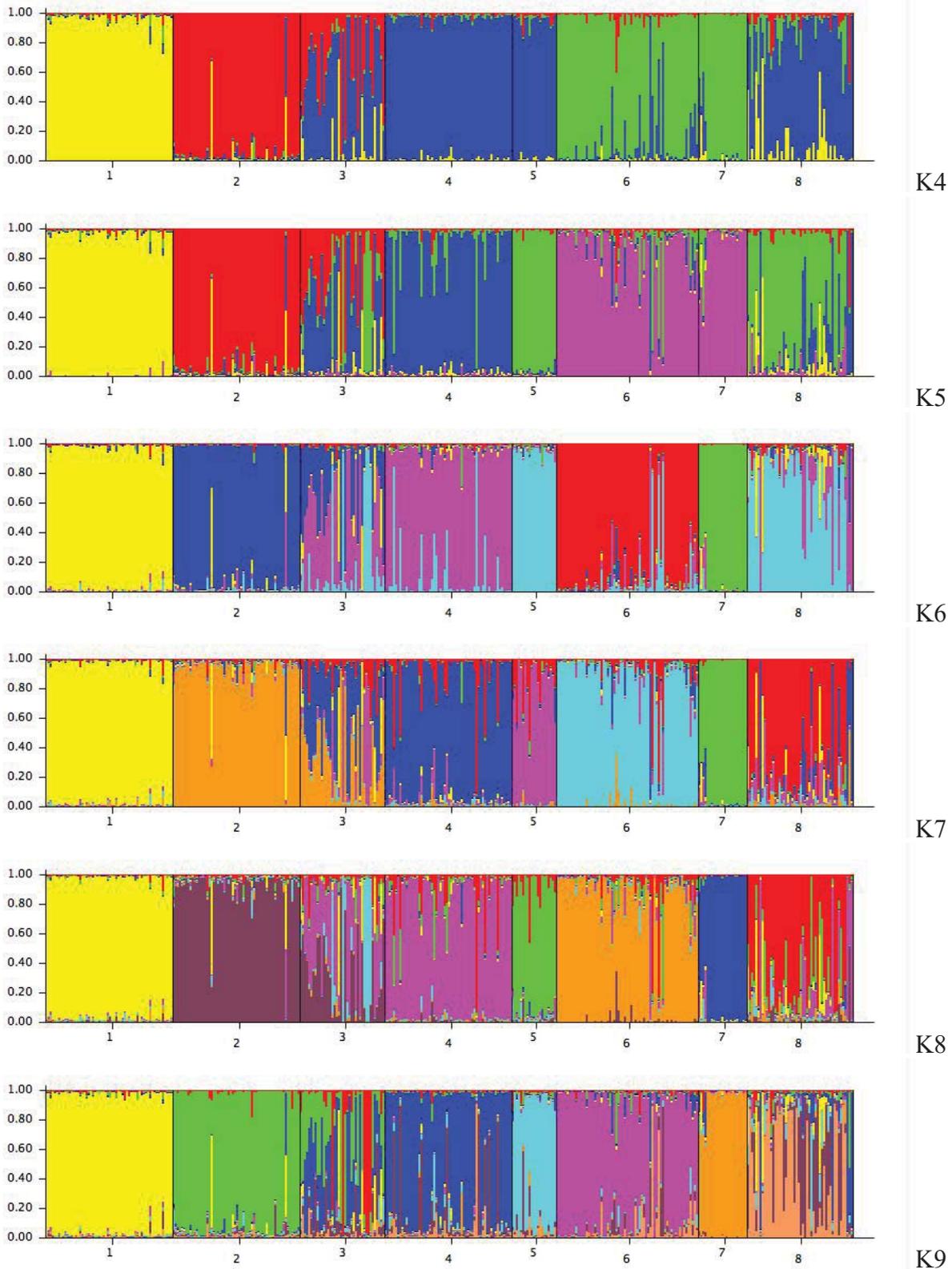
#### 4.3.4 Estructura genética de las poblaciones:



K2



K3



1.- PSI, 2.- Arabe, 3.- Hispanoárabe, 4.- PRE, 5.- Berberisco, 6.- Retuertas, 7.- Sorraia, 8.- Marismeño

Figura 6. Test de agrupamiento realizado con el programa STRUCTURE.

Los test de agrupamiento se realizaron en toda la base de datos con un número creciente de agrupamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Las ejecuciones independientes de K=2 hasta K=9 produjeron resultados consistentes. En K=2 se observa la presencia de 2 agrupamientos claramente distintos: uno que corresponde al Pura Sangre Inglés y al Árabe, y el otro que incluye el resto de razas analizadas. De los agrupamientos K=4 a K=9, los resultados reflejan la presencia de una estructura poblacional asociada con una diferenciación genética progresiva de las razas autóctonas de la Península Ibérica y las Norteafricanas. Los test de agrupación aislaron a las razas Sorraia y Retuertas del resto de las razas empezando en el agrupamiento K=5 y posteriores. El caballo Marismeño se halla claramente diferenciado de su vecino geográfico, el caballo de las Retuertas, desde el agrupamiento K=4, aunque ambos comparten un mismo origen.

La determinación de la distribución modal de  $\Delta K$  indica que el número de grupos genéticos que más se ajusta a la base de datos se halla en K=7, tal como se evidencia en la menor desviación estándar y la ubicación en la parte más alta de la gráfica, una vez alcanzado el valor real de K. Este hallazgo coincide con el número de razas utilizado, considerando que el Hispano-Árabe es una mezcla del PRE y el Pura Raza Árabe en su origen. Cabe destacar que algunas muestras de esta raza (Hispano-Árabe) formaron en K=7 un grupo propio. .

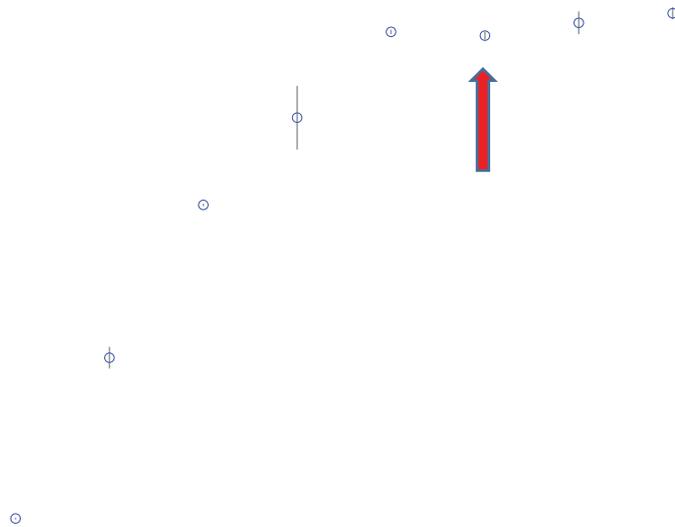


Figura 7. Determinación de la distribución modal de  $\Delta K$ .

#### 4.3.5 Test de asignación:

Es importante, a la hora de seleccionar los reproductores para futuras generaciones, tener en cuenta la mayor información posible, no sólo morfológica y funcional, sino también genética para que pasen a formar parte de la raza los individuos que más se ajusten a los criterios que establece la Asociación.

Hay diferentes estrategias para hacer un análisis individual de asignación de individuos a poblaciones tratando de incrementar el conocimiento de la diversidad genética de razas de diferentes especies, cuyos resultados proporcionen una información útil a la hora de considerar estrategias de conservación. Se ha seguido en este caso la propuesta por Pritchard (2000), utilizando el programa STRUCTURE.

Se seleccionó un número limitado de poblaciones que, por un lado, aportasen información sobre la posible mezcla de genomas presentes y, por otro, un número que no dificultase la interpretación de los resultados por exceso de poblaciones. Se emplearon todas las muestras disponibles del Caballo Marismeño.

Después de una serie de análisis previos para tratar de optimizar los valores de los parámetros de simulación de la aplicación informática (duración del período de “burn-in” y número de iteraciones) el número de poblaciones más verosímil resultó ser 5, siendo consecuencia de una diferenciación clara entre las poblaciones de referencia empleadas.

De esta forma, las muestras de las razas Retuertas, Árabe, Pura Raza Española y Pura Sangre Inglés, tenían un genoma que en un porcentaje superior al 70 por 100 provenía, en la mayoría de los análisis realizados, de una única población ancestral, mientras que en las muestras de Caballo Marismeño se identificaban cuatro poblaciones ancestrales claras, una quinta más heterogénea (Tabla 5).

Razas/Agrupamientos	1	2	3	4	5	Nº muestras
Marismeño	0,179	0,223	0,220	0,154	0,224	1387
Retuertas	0,046	0,114	0,701	0,081	0,058	67
Pura Raza Española	0,052	0,719	0,079	0,058	0,091	60
Árabe	0,073	0,059	0,042	0,767	0,059	60
Pura Sangre Inglés	0,861	0,026	0,023	0,050	0,041	60

Tabla 5.- Proporción de genoma que para cada población de referencia muestreada proviene de cada una de las hipotéticas poblaciones ancestrales consideradas.

Hay que señalar que en el procedimiento no supervisado las poblaciones de origen son objetos abstractos, que no tienen necesariamente que estar representados en los datos de campo. Además, hay que extremar la cautela cuando se utilizan estos procedimientos de análisis ya que con frecuencia la estimación de la proporción del genoma que proviene de cada una de las poblaciones de origen puede cambiar drásticamente de un análisis a otro cuando se utiliza un número de poblaciones ancestrales relativamente elevado. Es decir, a pesar de que el número de poblaciones ancestrales más verosímil pueda ser 5, la utilización de más grupos provocará inestabilidad en la asignación de las razas de origen a los diferentes agrupamientos o “clusters”.

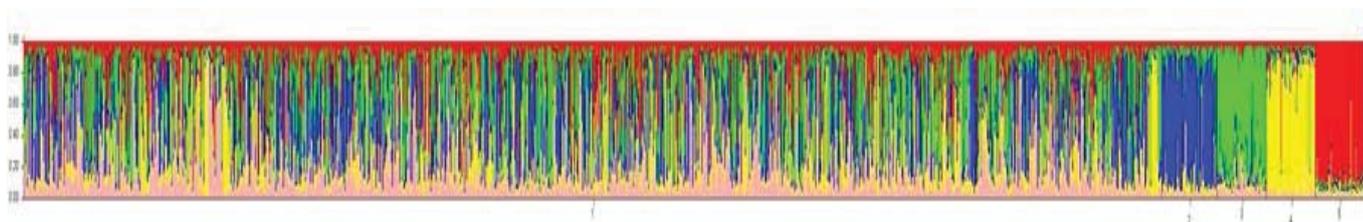


Figura 8. Representación gráfica del análisis. Cada línea vertical representa un individuo. La composición de colores equivale a la representación de los genomas correspondientes.

En la tabla 6, se muestran algunos ejemplos de muestras en las que se observa la proporción de genoma de las poblaciones ancestrales de cada una.

Id Animal	PSI	PRE	RET	ARA	OTROS
MM31465	0,040	0,036	0,763	0,080	0,081
MM31469	0,032	0,025	0,816	0,093	0,034
MM31475	0,041	0,038	0,769	0,020	0,133
MM31463	0,084	0,787	0,051	0,044	0,034
MM48155	0,029	0,800	0,103	0,023	0,045
MM31489	0,770	0,104	0,042	0,031	0,053
MM37399	0,857	0,022	0,034	0,061	0,026

Tabla 6. Proporción del genoma de las poblaciones ancestrales en algunas muestras de ejemplo.

#### 4.4 Contribución a la diversidad

Para completar el presente estudio, se han realizado una serie de test, utilizando diferentes metodologías, para estudiar y valorar la contribución que hace la raza Marismeña a la diversidad equina española.

##### 4.4.1 Método de Weitzman:

Los resultados de este estudio están recogidos en la tabla 7. Independientemente de la metodología utilizada, el mayor descenso en la diversidad se daría a partir de la hipotética pérdida de la población del Caballo de las Retuertas, pues en los tres cálculos el valor de pérdida marginal es el más elevado (POSA= 10,92%; Distancia de Reynolds=12,14%,  $F_{ST}$ =15,17%). El caballo Marismeño, en principio no produciría una pérdida de diversidad genética importante en un hipotético caso de desaparición. El método de Weitzman aquí usado ha sido criticado por algunos autores pues sólo tiene la diversidad genética inter-racial y no la intra-racial, y también por la complejidad de los cálculos a realizar, (Thaon d'Arnoldi et al., 1998; Goyache et al., 2006) pero en cualquier caso, cualquiera de los métodos empleados en la bibliografía no tienen en cuenta otros valores que deben tenerse en cuenta a la hora de tomar una decisión de si debe conservarse una raza o no como son su valor histórico, cultural, económico, etc.

	<i>POSA</i>		<i>Distancia de Reynolds</i>		<i>F<sub>ST</sub></i>	
Diversidad total	0,885		1,52		0,0815	
Raza	Diversidad	Pérdida marginal (%)	Diversidad	Pérdida marginal (%)	Diversidad	Pérdida marginal (%)
MAR	0,789	4,41	1,45	4,54	0,75	5,01
PRE	0,749	5,54	1,44	2,22	0,76	5,67
RET	0,682	<b>10,92</b>	1,24	<b>12,14</b>	0,68	<b>15,17</b>
HA	0,759	4,56	1,39	5,22	0,74	4,76
MAL	0,732	5,06	1,40	4,68	0,74	4,78
MEN	0,743	5,12	1,41	4,21	0,73	5,61
TRO	0,757	6,02	1,43	4,65	0,75	5,22
POT	0,776	4,98	1,39	5,18	0,74	6,11
AST	0,733	5,89	1,38	4,65	0,71	4,97
LOS	0,741	5,78	1,32	6,67	0,69	5,20
ARA	0,673	7,40	1,36	5,22	0,72	6,89
PSI	0,735	5,90	1,37	7,45	0,72	7,21

Tabla 7.- Calculo de la diversidad de Weitzman y pérdida de diversidad marginal (%)

#### 4.4.2 Método de Caballero y Toro y Pétit et al.:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8. Para realizar este test se han analizado 599 muestras de 12 razas de caballos. Ambos métodos han arrojado resultados bastante congruentes, aunque las contribuciones de las razas estudiadas han sido muy bajas: la desaparición de cualquiera de ellas, por sí sola, no produciría una pérdida de diversidad genética ni de riqueza alélica superior al 1%.

SUBPOP	N	He	Riqueza alélica (k)	GD <sub>T</sub>	GD <sub>W</sub> Internal_Diversity	GD <sub>B</sub> Mean Distance	Loss/Gain	C <sub>S</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>T</sub> Petit et al. (%)
MAR	61	0,782	8,571	0,797	-0,708	0,600	-0,108	0,996	-0,766	0,229
PRE	60	0,743	7,714	0,799	-0,170	0,302	0,132	0,181	-0,547	-0,366
RET	55	0,676	5,857	0,798	0,691	-0,674	0,017	-1,143	1,188	0,045
HA	60	0,752	7,286	0,798	-0,297	0,371	0,074	0,247	-0,498	-0,251
MAL	30	0,720	6,524	0,797	0,073	-0,178	-0,105	-0,047	0,358	0,312
MEN	69	0,731	7,381	0,797	-0,024	-0,068	-0,091	0,025	0,130	0,154
TRO	46	0,748	7,190	0,795	-0,180	-0,101	-0,280	0,372	0,186	0,558
POT	26	0,760	7,857	0,796	-0,175	-0,007	-0,182	1,008	-0,626	0,382
AST	39	0,724	7,048	0,797	0,065	-0,100	-0,035	-0,137	0,269	0,132
LOS	59	0,734	8,238	0,797	-0,042	-0,003	-0,045	0,045	0,242	0,287
ARA	48	0,666	5,952	0,800	0,715	-0,434	0,281	-1,213	0,615	-0,597
PSI	46	0,727	5,667	0,794	0,036	-0,530	-0,494	-0,334	1,054	0,720
Total	599	0,797	11,048							

Tabla 8. Análisis de la contribución a la diversidad de 12 razas de caballos según el método de Caballero y Toro y de Pétit et al.

La raza que mayor pérdida de diversidad produciría con su desaparición según el método de Caballero y Toro sería el PSI, y aun así, no llega al 1% (-0,494%). Según este método, el caso contrario, el que produciría aumento de la diversidad si desapareciera, sería la raza Árabe, con un valor de 0,281%, muy bajo.

Según el método de Petit et al., la raza que mayor riqueza alélica aporta a la base de datos sería el PSI con un valor de 0,720%, y la que menos, con un valor negativo, sería la raza Árabe, con un valor de -0,597%.

Se hizo además un análisis teniendo en cuenta las 2 razas que históricamente han tenido influencia sobre la raza Marismeña en el Entorno de Doñana (PRE y Caballo de las Retuertas), y estos fueron los resultados obtenidos (tabla 9):

<b>SUBPOP</b>	<b>GD<sub>T</sub></b>	<b>GD<sub>w</sub></b>	<b>GD<sub>B</sub></b>	<b>Loss/Gain</b>
<b>Pop: MAR</b>	0,781	6,247	-8,346	-2,100
<b>Pop: RET</b>	0,677	-6,837	-8,346	-15,183
<b>Pop: PRE</b>	0,743	1,528	-8,346	-6,818
<b>Pop: MAR PRE</b>	0,775	3,907	-6,705	-2,798

Tabla 9. Análisis de la contribución a la diversidad, según el método de Pétit et al., para las razas Marismeña, PRE y Caballo de las Retuertas.

Como puede verse en la tabla, la raza que significaría una mayor pérdida si desapareciera, con el método de Caballero y Toro (2002), teniendo en cuenta las tres razas (la que hace mayor aportación genética de las tres) sería el Caballo de las Retuertas con un valor de -15,183% de pérdida en caso de desaparición.

## **5.DISCUSIÓN**

La población equina Marismeña se encuentra ubicada dentro de las razas autóctonas en peligro de extinción, según el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (Anexo I del Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre). Tras el reconocimiento de la raza, no hubo un control eficiente de la misma hasta el establecimiento del Libro Genealógico en el año 2012, que marcó el inicio de su gestión para el mantenimiento y mejora de la misma. Los datos históricos, unidos a los estudios de caracterización genética, ofrecen la oportunidad de poner en valor la raza equina Marismeña y su entorno privilegiado en el área del Coto de Doñana, tan importante cinegética, histórica, ecológica, tradicional y económicamente.

### *5.1 Variabilidad intrarracial de la población equina Marismeña.*

Es muy destacable la variabilidad genética que presenta la población Marismeña. Esta característica ha permitido a los animales de esta raza adaptarse y sobrevivir a la climatología del Entorno de Doñana, superando condiciones duras de sequía, y también de inundaciones. Hay que resaltar su adaptación a la falta de alimento, condicionada por la climatología, y a las condiciones de los humedales, por los que transitan de forma habitual.

La elevada variabilidad alélica que presentan los microsatélites en la raza equina Marismeña, con un número medio de alelos de 8,24 puede achacarse perfectamente a la actividad reciente de numerosos sementales de diferentes razas antes de constituirse el Libro Genealógico (Fernandez Rodriguez et al., 2010). Estos resultados muy similares a los encontrados para el caballo Pantaneiro (Serenio et al., 2008) aunque en este caso es debido a la rotación continua de sementales que se realiza en Brasil con esta raza tan particular. Esta alta diversidad queda confirmada por el alto valor de riqueza alélica (7,365). Este dato está por encima del valor de riqueza alélica de 24 razas equinas autóctonas europeas (Warmuth et al., 2011), y también en razas asnales americanas (Jordana et al., 2016), aunque se asemeja al valor encontrado en 27 razas equinas chinas (Ling et al., 2010) 6 razas mediterráneas (Marletta et al., 2006) y algunas razas italianas (Zuccaro et al., 2008; Criscione et al., 2015) y se halla por debajo de los valores encontrados en 6 razas autóctonas indias (Gupta et al., 2014).

Los niveles de heterocigosidad han permanecido similares a los observados en otras razas españolas (Vega-Pla et al., 2006), chinas (Ling et al., 2010), indias (Gupta et al., 2014) y americanas (Conant et al., 2012), y es también similar a los niveles observados en razas asnales (Jordana et al., 2016), caballos mediterráneos (Marletta et al., 2006), el caballo Hispano-Bretón (Pérez-Gutiérrez et al., 2008) y caballos italianos (Zuccaro et al., 2008).

Los niveles de diferenciación observados entre razas equinas en este estudio se pueden considerar bajos si se comparan con otras razas domésticas (Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2006; Delgado et al., 2012), pero similares a los obtenidos en otros estudios realizados en caballos (Cañon et al., 2000; Aberle et al., 2004; Glowatzki-Mullis et al., 2006; Felicetti et al., 2010; Warmuth et al., 2011). Aun así, estos niveles fueron mayores a los encontrados en burros por Aranguren-Mendez et al. (2001) y Jordana et al. (2016).

El coeficiente de consanguinidad por marcadores ( $F_{IS}$ ) hallado para la raza Marismeña fue de 0,007. Se podría considerar que la población tiene un nivel de endogamia muy bajo lo que es coherente con la dinámica de la raza de las últimas décadas.

## *5.2 Comparación genética de la población Marismeña con otras razas.*

El número de alelos más elevado lo encontramos en la raza Marismeña, con un valor de 8,48, similar al reportado por Vega-Pla et al. (2006) y el menor lo encontramos en el Sorraia, con un valor de 4,48 alelos.

Se hallaron valores negativos significativos de  $F_{IS}$  en el Caballo de las Retuertas que sugerían un posible efecto Wahlund, es decir, la existencia de subpoblaciones dentro de la raza.

## *5.3 Estructura y distancias entre poblaciones.*

### *5.3.1 Distancias genéticas. Árbol de distancias $D_A$ de Nei. (método NJ).*

El análisis de distancias entre poblaciones, proporcionó los resultados esperados. Se han estado utilizando sementales de PRE para cruzarlos con los caballos de la Marisma hasta hace muy pocos años, antes del establecimiento de los Libros Genealógicos en el año 2012. Como consecuencia, se esperaba que hubiera una relación genética muy próxima entre ambas razas.

Los valores mayores para estos parámetros los encontramos, en el caso de la distancia  $D_A$ , entre el PSI y el Sorraia (0,3984), y para el parámetro  $F_{ST}$ , el valor más elevado se halla entre el PrÁ y el Sorraia. Aun no tratándose de las mismas razas estos resultados pueden ser coherentes si tenemos en cuenta que el PrÁ es un antepasado aunque muy lejano e indirecto, del PSI (De Andrés Cara, 1986).

El árbol de distancias realizado con el método Neighbour Joining y los resultados del agrupamiento realizado con el programa STRUCTURE reflejan las prácticas reproductivas que se han venido realizando en los resultados que arrojan.

La rama en la que se encuentra el Marismeño tiene una longitud muy corta si la comparamos con el resto de las razas estudiadas, teniendo en cuenta el valor de  $F_{ST}$  obtenido, que ha sido bajo, se confirma que se trata de una raza que a pesar de encontrarse en el lugar hace muchos años aún se encuentra en un proceso de definición. Parece ser que este afán por cruzar las yeguas con sementales de otras razas es el resultado de la costumbre de los criadores locales de evitar sistemáticamente los cruces de las yeguas con los sementales locales por un afán de mejorar los productos obtenidos.

Cabe destacar también la relación observada entre el caballo Marismeño y el Berberisco, debida probablemente a que comparten muchos ancestros comunes como el Árabe y el antiguo Pura Raza Español. Además hubo una introducción en Andalucía de caballos Berberiscos durante la invasión árabe (que duró casi un milenio) (Muñoz-Bort, 2004).

No se ha establecido con claridad el lugar donde se desarrolló el caballo Berberisco; algunos autores piensan que la raza pudo originarse en el Norte de África (Aparicio, 1944). Parece que en tiempos prehistóricos y antes de la existencia de colonias griegas y fenicias, los caballos que habitaban el sur de la Península Ibérica y el Norte de África tenían una estrecha relación, y que hubo un intercambio significativo de equinos entre el Norte de África y la Península Ibérica, por lo menos desde los tiempos del Imperio Romano hasta la invasión musulmana (Aparicio, 1944).

Posteriormente, los caballos que habitaban la Península Ibérica fueron cruzados con otras razas europeas para mejorarlos y de ahí surgió el moderno PRE (Nissen, 1963). Sin embargo, el caballo Marismeño parece conservar algunas trazas genéticas de los cruces con los antiguos caballos norteafricanos.

Curiosamente, el resultado esperado del fenograma del caballo Marismeño era que estuviera relacionado con el caballo de las Retuertas debido al conocido y ancestral origen común. Es sabido que el caballo de las Retuertas hace aproximadamente 30-40 años

sufrió un aislamiento reproductivo (no se cruzó recientemente con ninguna otra raza) seguido de un intenso cuello de botella, lo que podría, en un principio, explicar el porqué de la gran distancia genética encontrada entre el caballo de las Retuertas y el caballo Marismeño.

Otra línea de evidencias para los anteriores argumentos la proporciona el análisis individual obtenido utilizando métodos Bayesianos, que indica que los resultados de las razas que encajan en su agrupamiento fueron similares a los encontrados para los Árabes y PSI (Glowaltzki-Mullis et al., 2006).

Actualmente, sería muy improbable que se produjera un cruce entre el Marismeño y el caballo de las Retuertas, ya que la población del caballo de las Retuertas se encuentra confinada en la Reserva Biológica de Doñana, un área aislada de unas 10.000 Ha, localizada dentro del Parque Nacional.

De todas formas, hay que considerar la posibilidad de incorporar animales de la población de caballo de las Retuertas en un futuro programa de conservación de la raza Marismeña tras un trabajo arduo y extenso de caracterización morfológica y genética.

Extrañamente, el caballo de las Retuertas está en una misma rama con el Sorraia, probablemente debido a su origen geográfico común antes de su aislamiento reproductivo, aunque el Sorraia está marcadamente separado del resto de razas por su reducida variabilidad genética, que ya ha sido observada en estudios previos (Morais et al., 2005). Aun así, de acuerdo con los datos históricos y moleculares, se cree que el Sorraia es el ancestro más probable de las razas ibéricas del sur de la Península Ibérica (Pinheiro et al., 2013).

### 5.3.2 Análisis Factorial de Correspondencia.

El análisis factorial de correspondencias arroja cinco grupos bien diferenciados. El caballo Marismeño se encuentra en el centro del gráfico, junto con el Hispano-Árabe y el PRE, resultando casi inapreciable la diferenciación genética entre ellos. Teniendo en cuenta la historia reciente de la raza, y los cruces a los que ha sido sometida, los resultados no son nada sorprendentes. El resto de razas del gráfico sí se encuentran separadas y diferenciadas.

En el segundo análisis factorial de correspondencias realizado, se puede observar la proximidad genética del Marismeño con el PRE, de la que ya hay indicios por el resto de

resultados obtenidos, aunque en este caso sí se diferencia del resto de razas analizadas. Estos resultados se asemejan mucho a los ya reportados por Vega-Pla (2006).

### 5.3.3 Estructura genética de las poblaciones (STRUCTURE)

La aplicación de los microsatélites y el uso del valor de  $q$  para determinar la proporción de mezclas de los animales, además del uso de otras metodologías, como caracterizaciones zoométricas y morfométricas, pueden ser de gran utilidad para la gestión de la población Marismeña.

Los resultados obtenidos han sido congruentes con el resto de análisis realizados y han arrojado algunos datos curiosos, que reflejan las relaciones históricas de los caballos de la Marisma con otras razas de caballos que han pasado por la zona a lo largo de los siglos, como el caballo Berberisco, por ejemplo. En este caso, resulta llamativo ver en la gráfica del agrupamiento que el caballo Marismeño aparece unido al Berberisco hasta el  $K=7$ , lo que refleja que ambas razas tienen orígenes comunes basados en los mismos ancestros, caballos árabes y antiguos PRE y los lazos históricos como el largo período en el que los Musulmanes estuvieron en la Península Ibérica, trayendo y llevando ganado, en gran parte caballar, pues en la época musulmana, y hasta hace apenas un siglo, las guerras se disputaban a caballo y el transporte de mercancías se realizaba a lomo. En el caballo Hispano-Árabe, a su vez, también se observan perfiles de Berberisco, probablemente debido también a que el Berberisco se formó con este tipo de cruzamientos.

### 5.4 *Contribución a la diversidad.*

La cuestión de qué razas son dignas o valederas de ser conservadas viene siendo debatida desde que Weitzman planteó su concepto de contribución a la biodiversidad (Weitzman, 1993). La aproximación de Weitzman tenía en cuenta criterios genéticos, económicos, de escala (regional, nacional o global) y era especialmente atractiva porque su cálculo era rigurosamente matemático. Se han desarrollado varios métodos además de las aproximaciones filogenéticas de Weitzman (1992) y de Thaon d'Arnoldi et al. (1998), como las que se centran en la maximización de la diversidad genética (Eding and Mewisen, 2001; Ollivier and Foulley, 2005 y 2008) o el número medio de alelos por locus (Petit et al., 1998; Foulley and Ollivier, 2006). El método basado en la coancestría, se

puede adaptar fácilmente a la información genealógica (Caballero y Toro, 2002). La aproximación de Weitzman fue muy criticada por la comunidad científica, pues se consideraba que abordaba la problemática de forma parcial, y es que es un asunto muy complejo y difícil de abordar matemáticamente de forma “completa”, pues hay aspectos de una raza que no son valorables numéricamente. Para intentar “paliar” la parcialidad de uno u otro método, en este estudio se han realizado tres aproximaciones a la mencionada contribución. Ya se ha mencionado con anterioridad la cautela extrema con la que hay que tomar los resultados obtenidos, aunque no está de más insistir en que una raza, tiene valor en el contexto en el que se engloba, no solo genético, como reservorio de recursos, sino en otros muchos contextos, como el cultural o el económico. En el caso que nos ocupa, la tradición y la cultura tienen una importancia muy grande, pues el caballo Marismeño tiene una tradición muy arraigada (500 años) en la zona de Almonte y aledaños que no se debe despreciar a la ligera y que sigue muy viva hoy en día.

Los resultados encontrados en el presente estudio son muy similares a los hallados para la raza equina Mallorquina (Álvarez et al., 2010), para el árbol de argán de Marruecos (Pétit et al., 1998) o para la raza ovina Xisqueta (Ferrando et al., 2010). Aun así, hay que añadir que el Marismeño produciría una pérdida de diversidad genética si desapareciera (-0,108%) y aporta un 0,23% a la riqueza alélica comparándolo con las 12 razas estudiadas. Hay que tomar estos resultados con extrema cautela. Primero porque los valores obtenidos en todos los métodos son extremadamente bajos, ninguno sobrepasa el 1% en su aporte a la diversidad, y después porque solo se tienen en cuenta algunos aspectos de la misma, en el caso del método de Caballero y Toro se tiene en cuenta los coeficientes de parentesco para calcular la diversidad genética (GD), y en el de Pétit et al., se utiliza la riqueza alélica intrapoblacional y un cálculo de la riqueza alélica debido a su divergencia de la totalidad de la población (de todas las razas en estudio). Tratándose de razas de caballos, en las que la diferenciación genética no es demasiado acusada (las  $F_{ST}$  no suelen sobrepasar el 10%), no hay, por lo tanto, una divergencia acusada entre ellas, tal como se puede ver en los estudios realizados con el caballo de las Retuertas (Vega-Pla et al., 2006), en razas indias (Gupta et al., 2014), en el Lipizzan (Barcaccia et al., 2013), o en el Maremmano (Felicetti et al., 2010) por ejemplo, parece que debemos ser muy cautelosos a la hora de valorar estos resultados, y no basar en ellos ninguna consideración sobre el peso o valor de una raza sobre otra.

En conclusión, el caballo Marismeño deriva de los antiguos caballos que habitaban las marismas del Guadalquivir, igual que los caballos de las Retuertas. A pesar de la introducción, en períodos más recientes, de sementales de otras razas, los resultados de este estudio indican la singularidad de esta población tan adaptada a su extremo entorno. La gestión del Libro Genealógico del caballo Marismeño fue establecida oficialmente el año 2012, evitando la introducción de sementales de otras razas, y el control de filiación se tiene en cuenta para el programa de conservación. Si esto es suficiente para garantizar la supervivencia futura de la raza, aún queda por verse, pero indica claramente que, debido a que estos caballos viven con la mínima intervención humana, el hábitat de esta población debe protegerse pues tiene un gran impacto en su supervivencia.

## 6. CONCLUSIONES

1. Caracterizar genéticamente la población equina de raza Marismeña utilizando microsatélites.  
→Se ha caracterizado la Raza Marismeña con un panel de microsatélites habiéndose detectado una alta variabilidad genética y niveles de endogamia muy bajos.
2. Determinar si existe relación genética entre las poblaciones equinas Marismeña y el caballo de las Retuertas, que se hallan en el mismo entorno (el Espacio Natural de Doñana).  
→Si bien está claro que las dos razas tienen el mismo ancestro, los antiguos caballos que poblaban la Marisma, el aislamiento reproductivo de los Caballos de la Retuertas, un reciente cuello de botella y esto unido al afán de los ganaderos de evitar usar sementales de la Marisma para mejorar la población, han conducido a una diferenciación genética entre ambas razas.
3. Determinar la posible singularidad genética de las Raza Marismeña y Retuertas comparándolas con algunas razas autóctonas españolas, americanas y europeas.  
→La Raza equina Marismeña se manifiesta como una población singular circunscrita a un entorno como el de Doñana que, debido quizás a las condiciones tan extremas del entorno donde se encuentran los caballos si recibir ningún tipo de apoyo, ha hecho, que a pesar del afán de los ganaderos durante las últimas década del siglo XX por mejorar la población con sementales de otras razas, la selección natural sólo ha permitido la supervivencia de aquellos caballos que mantienen características fenotípicas de los antiguos caballos adaptados al medio. Esta circunstancia ofrece una oportunidad de mantener una raza en el entorno usando sementales propios ya que está dotada de una gran variabilidad genética.
4. Análisis de la estructura genética de la población y asignación individual a la raza.  
→ El conjunto de la información molecular que se ha utilizado es capaz de discriminar entre las poblaciones de referencia que han sido muestreadas para llevar a cabo este trabajo, las razas Retuertas, Pura Raza Española, Árabe y Pura Sangre Inglés. Los valores de asignación obtenidos para las razas de referencia son superiores al 70%, que si bien no son concluyentes para cada muestra, si lo son para ayudar a seleccionar aquellos ejemplares de Caballo Marismeño más adecuados según los criterios de la Asociación y que podrían actuar como padres

de las siguientes generaciones.

## 7. 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. *Animal Genetics* **35**, 270-7.
- Angers B. & Bernatchez L. (1998) Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 143-59.
- Aranguren-Méndez J., Jordana J. & Gomez M. (2001) Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetic Selection Evolution* **33**, 433-42.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Goudet J. & Bonhomme F. (2000) GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- 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.
- Bjørnstad G. & Røed K.H. (2002) Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Animal Genetics* **33**, 264-70.
- Bjørnstad G., Gunby E. & Røed K.H. (2000) Genetic structure of Norwegian horse breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **117**, 307-17.
- Caballero, A., Toro, M.A., 2002, *Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conservation Genetics* **3**, 289-299.
- CABADA CASTRO, M. 1992. *A Rapa das Bestas de Sabucedo. Historia e Antropoloxta dunha tradición. Vigo: Ir Indo Edicións.*
- 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. *Animal Genetics* **31**, 39-48.
- Castroviejo, J. (1993) *Memoria. Mapa del Parque Nacional de Doñana*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Agencia de Medio Ambiente (AMA) de la Junta de Andalucía. Madrid.

Cavalli-Sforza L.L. & Edwards A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**, 233-57.

Ceccobelli, S., Di Lorenzo, P., Lancioni, H., Monteagudo Ibáñez, L.V., Tejedor, M.T., Castellini, C., Landi, V., Martínez Martínez, A., Delgado Bermejo, J.V., Vega-Pla, J.L., Leon Jurado, J.M., García, N., Attard, G., Grimal, A., Stojanovic, S., Kume, K., Panella, F., Weigend, S., Lasagna, E., 2015. Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. *Livest. Sci.* 175, 27–36. doi:10.1016/j.livsci.2015.03.003

Conant, E.K., Juras, R., Cothran, E.G., 2011, A microsatellite analysis of five Colonial Spanish horse populations of the southeastern United States. *Animal Genetics*, doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02210.x.

Cortés, O., Martínez, A.M., Cañon, J., Sevane, N., Gama, L.T., Ginja, C., Landi, V., Zaragoza, P., Carolino, N., Vicente, A., Sponenberg, P., Delgado, J.V., 2016. Conservation priorities of Iberoamerican pig breeds and their ancestors based on microsatellite information. *Heredity*. doi:10.1038/hdy.2016.21

Criscione A, Moltisanti V, Chies L, Marletta D, Bordonaro S. 2015. A genetic analysis of the Italian Salernitano horse. *Animal*. 9:1610–1616.

Delgado JV, Martínez AM, Acosta A, Álvarez LA, Armstrong E, Camacho E, Canon J, Cortes O, Dunner S, Landi V, et al. 2012. Genetic characterisation of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Anim Genet*. 43:2–10. Druml T, Salajpal K, Dikic M, Urosevic M, Grilz-Seger G, Baumung R. 2012. Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programmes. *Genet Select Evol. [Internet]*. 44:5. Available from: <http://doi.org/10.1186/1297-9686-44-5>.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Ellegren, H., Johansson, M., Sandberg, K., Andersson, L., 1992, Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Animal Genetics* 23, 133-142.

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.

Excoffier L., Smouse P.E. & Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-91.

Falconer, D.S., 1990, Introduction to quantitative genetics. Compañía Editorial Continental, S.A. México.

- FAO 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity (Roma, FAO).
- FAO. 2011. Molecular genetic characterisation of animal genetic resources. Roma. Available from <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.htm>
- Felicetti M, Lopes MS, Verini-Supplizi A, da C^amara Machado A, Silvestrelli M, Mendonca D, Distl O. 2010. Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds. *Anim Genet.* 41:53–55
- Fernández, J.A. (1982) *Guía de Campo del Parque Nacional de Doñana*. Ed. Omega. Barcelona.
- Fernandez Rodriguez C. 2010. Zooarqueología: recuperacion, muestreo y analisis. In: Lopez Diaz A, Ramil Rego E, eds. *Arqueología: ciencia e restauracion*. Vilalba, Lugo, Spain: Museo de Prehistoria e Arqueología de Vilalba.
- Franklin IR (1980) *Evolutionary change in small populations*. In: *Conservation Biology, an evolutionary-ecological perspective*. (ed By M.E. Soule and B.A. Wilcox) Sinauer Associates, Sunderland.
- García, D., Cañón, J., 2007, Diversidad de las especies de animales domésticos: importancia y conservación de la variabilidad genética. *FEAGAS* 31, 61-66.
- García, D., Checa, M.L., García-Atance, P., Dunner, S., Cañón, J. 2001. Medidas de diversidad genética en poblaciones de caballos celtas españoles. Resultados Preliminares. Comunicación a Congreso.
- Glowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J., Pfister W., Marti E., Rieder S. Poncet P.A. & Gaillard C. (2005) Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed. *Animal Genetics* **37**, 33-9
- Goldstein D.B., Linares A.R., Cavalli-Sforza L.L. & Feldman M.W. (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**, 463-71.
- Goodman S.J. (1997) Rst Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and a determining their significance. *Molecular Ecology* **6**, 881-5.
- Goudet J. (1995) FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 178-9.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a programme to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [Updated from Goudet (1995)]. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Granevitze Z, Hillel J, Chen GH, Cuc NTK, Feldman M, Eding H, Weigend S. 2007. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Anim Genet.* 38:576–583.

- GONZÁLEZ FARACO, J. C. & MURPHY, M. D. (1999) La saca de las yeguas en las Marismas de Doñana. *Narria. Estudios de Artes y Costumbres Populares*, 81/84, 33-43. Universidad Autónoma de Madrid.
- Goyache, F.; Carús, J.L.; Álvarez, I.; Gutiérrez, J.P.; Fernández, I.; Royo, L.J. Diversidad filogenética como método de utilidad en programas de conservación de recursos genéticos ganaderos. ITEA. 2006; 102 (2): 133-138.
- Guérin G., Bertand M. & Amigues Y. (1994) Characterisation of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HMS8. *Animal Genetics* **25**, 62.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992, Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- Hanslik S., Harr B., Brem G. & Scholötterer C. (2000) Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Animal Genetics* **31**, 31-8.
- JORDAN, T. G. 1989. «An Iberian Lowland/Highland Model for Latin American Cattle Ranching». *Journal of Historical Geography* 15 (2): 111-125. —. 1993. *North American Cattle-Ranching Frontiers: Origins, Diffusion, and Differentiation*. Albuquerque: University of New México Press.
- Jordana J, Ferrando A, Miro J, Goyache F, Loarca A, Martinez Lopez OR, Canelon JL, Stemmer A, Aguirre L, Lara MAC et al. 2016. Genetic relationships among American donkey populations: insights into the process of colonisation. *J Anim Breed Genet*. 133:155–164.
- Kelly L., Postiglioni A., De Andres D.F., Gagliardi R., Biagetti R. & Franco J. (2002) Genetic Characterisation of the Uruguayan Creole Horse and analysis of relationships among horse breeds. *Research in Veterinary Science* **72**, 69-73.
- Laloe D., Moazami-Goudarzi K. & Chessel D. (2002) Contribution of individual markers to the analysis of the relationships among breeds by correspondence analysis. *Communication N° 26-06 of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23, Montpellier, France*.
- Lande R. & Barrowclough G.F. (1987) Effective population size, genetic variation and their use in population management. In: *Viable populations for conservation* (ed. By M.E. Soulé), pp. 87-123. Cambridge University Press, Cambridge.
- Langella, O. 1999. Populations 1.2.28 CNRS UPR9034 <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>.

- 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. (1984) *Multivariate descriptive statistical analysis*. John Wiley and Sons, New York.
- Ling, Y.H., Ma, Y.H., Guan, W.J., Cheng, Y.J., Wang, Y.P., Han, J.L., Mang, I., Zhao, Q.J., He, X.H., Pu, Y.B., Fu, B.L., 2010, Evaluation of the genetic diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. *Animal Genetics* **42**, 56-65.
- Luis C, Bastos-Silveira C, Cothran EG, Oom Mdo M. 2006. Iberian origins of new world horse breeds. *J Hered.* **97**:107–113.
- MacHugh D.E., Shriver L.D., Loftus R.T., Cunningham P. & Bradley D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle. *Genetics* **146**, 1071-86.
- MAGRAMA. 2016. Catalogo oficial de razas de ganado de España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; [cited 2016 Jan 26]. Available from: <http://origin.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razasganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/equino-caballar/marismena/default.aspx>.
- Marletta D, Tupac-Yupanqui I, Bordonaro S, Garcia D, Guastella AM, Criscione A, Canon J, Dunner S. 2006. Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *J Anim Breed Genet.* **123**:315–325.
- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K. & Andersson L. (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, **25**, 19-23.
- Martinez A, Acosta J, Vega-Pla J, Delgado J. 2006. Analysis of the genetic structure of the canary goat populations using microsatellites. *Livestock Sci.* **102**:140–145.
- Martínez A.M., Delgado J.V., Rodero A. & Vega-Pla J.L. (2000) Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics* **31**, 295-301.
- Minch E. (1998) MICROSAT Version 1.5b (Macintosh). University of Stanford. Stanford.
- Morais J, Oom MM, Malta-Vacas J, Luis C 2005. Genetic structure of an endangered Portuguese semiferal pony breed, the Garrano. *Biochem Genet.* **43**:347–364.
- Muñoz-Bort D. (2004) *La Ganadería Caballar en la Villa de Almonte* (ed. By Ayuntamiento de Almonte) Artes Gráficas Impresol. Almonte.

- MURPHY, M. D. y GONZÁLEZ FARACO, J. C. (2002) (Eds.) *El Rocío: análisis culturales e históricos*. Huelva, Diputación Provincial. Colección Investigación, Serie Antropología, 38.
- MURPHY, M. D. & GONZÁLEZ FARACO, J. C. (2002) "Las yeguas marismeñas de Doñana: naturaleza, tradición e identidades sociales en un espacio protegido". *Revista de Dialectología y Tradiciones Populares*, 57 (2): 5-40.
- MURPHY, M. D. & GONZÁLEZ FARACO, J. C. (1999) "La saca de las yeguas en las Marismas"
- MURPHY, M. D. & GONZÁLEZ FARACO, J. C. (1988) Fiesta in Almonte. *The World and I*, 3 (7), 480-491.
- Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 3321-3.
- Nei, M., 1995, Genetic support for the out-of-Africa theory of human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6720-6722.
- Nei, M., Roychoudhury, A.K., 1974, Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* **76**, 379-390.
- Nei M. (1983) Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In: *Evolution of genes and proteins* (ed. Nei M, Khoen R), pp. 165-190, Sunderland.
- Nissen J. 1963. *The young specialist looks at horses*. London: Burke Publishing Co. Ltd.
- Nomura K, Ishii K, Dadi H, Takahashi Y, Minezawa M, Cho CY, Fauque MO, Nyamsamba D, Amano T. 2012. Microsatellite DNA markers indicate three genetic lineages in East Asian indigenous goat populations. *Anim Genet.* **43**:760–767.
- Page, R.D., 1996, TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences* **12**, 357-358.
- Park S.D.E. (2001) *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic. Effects of Selection*. Ph.D. thesis, University of Dublin.
- Perez-Gutierrez LM, De La Peña A, Arena P. 2008. Genetic analysis of the Hispano-Breton heavy horse. *Anim Genet.* **39**:506–514.

- PÉREZ MARTÍNEZ, J. M. 1992. Experiencia en Doñana. Homenaje a nuestros abuelos. Huelva: Ayuntamiento de Almonte.
- Peter C, Bruford M, Perez T, Dalamitra S, Hewitt G, Erhardt G. ECONOGENE Consortium. 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim Genet.* 38:37–44.
- Polziehn R.O., Hamr J., Mallory .FF. & Strobeck C. (2000) Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervus elaphus*) populations. *Molecular Ecology* **9**, 1561-76.
- 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 tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-9.
- Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1983, Estimation of the coancestry coefficient basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105, 767-779.
- Rosenberg N. A. (2002). Distruct: a program for the graphical display of structure results. <http://www.cmb.usc.edu/~noahr/distruct.html>.
- Royo LJ, Alvarez I, Beja-Pereira A, Molina A, Fernandez I, Jordana J, Gomez E, Gutierrez JP, Goyache F. 2005. The origins of iberian horses assessed via mitochondrial DNA. *J Hered.* 96:663–669.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Ecology* **4**, 406-25.
- Sandberg K. & Cothran E.G. (2000) Biochemical Genetics and Blood Groups. In: The genetics of the horse (ed. Bowling AT, Ruvinsky A). CABI Publishing. New York.
- Shiue Y.L., Bickel L.A., Caetano A.R., Millon, L.V., Clark, R.S., Eggleston, M.L., Michelmore, R., Bailey, E., Guérin, G., Godard, S., Mickelson, J.R., Valberg, S.J., Murray, J.D., Bowling, A.T. A. (1999) A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics* **30**, 1-9.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457–62.
- Schneider S., Kueffer J.M., Roessli D. & Excoffier L. (1997) Arlequin version 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneve, Switzerland.
- Sotillo J, Serrano V. 1985. Produccion animal I. Etnologia zootecnica. Madrid: Ediciones Tebar Flores.

- Takezaki N. & Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* **144**, 389-99.
- Tozaky T., Kakoi H., Mashima S. Hirota K., Hasgawa 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.
- Van Haeringen, H., Bowling, A.T., Stott, M.L., Lenstra, J.A., Zwaagstra, K.A., 1994, A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Anim Genet.* 25, 207.
- Vega-Pla, J.L., Calderón, J., Rodríguez-Gallardo, P.P., Martínez, A.M., Rico, C., 2006, Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics* 37, 571-578.
- Vila C., Leonard J.A., Gotherstrom A., Marklund S., Sandberg K., Liden K., Wayne R.K. & Ellegren H (2001) Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* **291**, 474–77.
- Villalobos-Cortés, A., Martínez, A., Vega-Pla, J.L., Landi, V., Quiroz, J., Marques, J.R., Delgado, J.V., 2015. Genetic relationships among five zebu breeds naturalized in America accessed with molecular markers. *Ital. J. Anim. Sci.* 14. doi:10.4081/ijas.2015.3280
- Walters J.R. (1991) Application of ecological principles to the management of endangered species: the case of the Red-cockaded Woodpecker. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**, 505-23.
- Warmuth V, Eriksson A, Bower MA, Cañon J, Cothran G, Distl O, Glowatzki-Mullis ML, Hunt H, Luis C, do Mar Oom M, et al. 2011. European domestic horses originated in two holocene refugia. *PLoS One*. [Internet]. 6:e18194. Available from: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018194>.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-70.
- Wright S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-54.
- Wright, S., 1969, The Theory of gene frecuencies, In: *Evolution and genetics of populations*. pp. 291-293.
- Zuccaro A, Bordonaro S, Criscione A, Guastella AM, Perrotta G, Blasi M, D'Urso G, Marletta D. 2008. Genetic diversity and admixture analysis of Sanfratellano and three other Italian horse breeds assessed by microsatellite markers. *Animal*. 2:991–998.



## Red CONBIAND-Proyecto Biohorse:

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA RAZA EQUINA MARISMEÑA

Pablo Gómez, Montserrat<sup>1\*</sup>; Martínez Martínez, Amparo<sup>1</sup>; Nogales Baena, Sergio<sup>1</sup>; Landi, Vincenzo<sup>1</sup>; Delgado Bermejo, Juan Vicente<sup>1</sup>; Vega-Pla, José Luis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA); <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)

\*[z12pagom@gmail.com](mailto:z12pagom@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

En la Península Ibérica existe una gran proporción de razas que se encuentran en peligro de extinción cuyas perspectivas de futuro dependen del establecimiento de programas de conservación que deben estar apoyados, entre otros, en estudios de diversidad genética.

El caballo Marismeño forma parte de nuestro patrimonio natural y cultural, y es justo y necesario tratar de perpetuarlo para conocimiento de las generaciones futuras.

En este sentido, la raza Marismeña presenta un enraizamiento profundo en las costumbres y tradiciones de la zona donde se asienta, el Espacio Natural de Doñana, y su desaparición, sin duda, causaría una gran pérdida a la identidad del pueblo que la acoge.

Este trabajo estudia el estado genético de la raza equina Marismeña, que está en peligro de extinción, mediante el uso de 25 microsatélites.

Se han realizado análisis estadísticos de los datos con distintas herramientas para valorar la diversidad intra-racial y la estructura genética de la raza.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394.

Software utilizado: GENEPOP v1.2 (Raymond M., Rousset F., 1995); STRUCTURE v.2.1 software (Pritchard *et al.*, 2000) DISTRUCT (<http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/distruct.html>)



Yegua Marismeña con su potro.  
Fotos: Sergio Nogales y Jesús Alcalá

### RESULTADOS

- \* Todos los microsatélites son muy informativos y han resultado polimórficos, mostrando entre un mínimo de 6, para los microsatélites AHT5, HMS6 y HMS7, y un máximo de 12 alelos en el microsatélite ASB2.
- \* El valor medio de FIS de la población es de 0,007, lo que indica que la raza equina Marismeña no muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg.
- \* Elevada variabilidad alélica: número medio de alelos de 8,24.

NA	RA	He	Ho	PIC	FIS
8,24	7,365	0,7906	0,7444	0,7548	0,007

Tabla 1. Número medio de alelos por marcador (NA), Riqueza Alélica (RA), Heterocigosis esperada (He), Heterocigosis observada (Ho), Contenido de Información Polimórfica (PIC), Coeficiente de Consanguinidad (FIS).

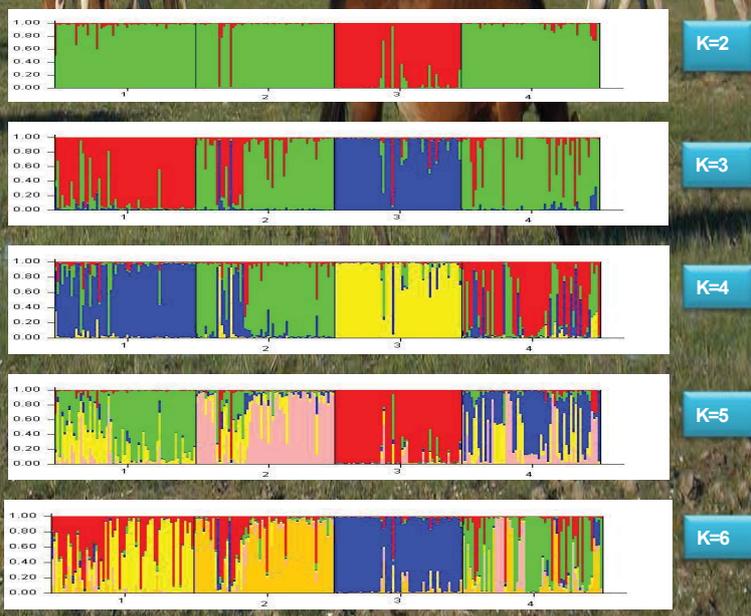


Figura 1. Representación gráfica de los resultados del análisis de la estructura genética de 4 poblaciones equinas españolas. 1: Caballo Marismeño; 2: Pura Raza Español; 3: Caballo de Las Retuertás; 4: Hispano-Árabe

### CONCLUSIONES

La conclusión es que se están obteniendo los primeros frutos derivados de un gran esfuerzo de los criadores de Caballo Marismeño para fijar las características de su raza sin que haya una pérdida significativa de variabilidad genética.

### REFERENCIAS

Falconer, D.S., 1990, Introduction to quantitative genetics. Compañía Editorial Continental, S.A. México.  
 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. *Journal of Heredity* 86(3), 248-249.  
 Vega-Pla, J.L., Calderón, J., Rodríguez-Gallardo, P.P., Martínez, A.M., Rico, C., 2006, Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics* 37, 571-578.

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA RAZA EQUINA MARISMEÑA

## GENETIC DIVERSITY OF THE MARISMEÑO EQUINE BREED

Pablo M.<sup>1\*</sup>, Landi V.<sup>1</sup>, Nogales S.<sup>1</sup>, Martínez A.<sup>1</sup>, Delgado J.V.<sup>1</sup>, Vega-Pla J.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA). \*z12pagom@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)

**Keywords:** Biodiversity; Local breeds; Molecular markers.

**Palabras clave:** Biodiversidad; Razas autóctonas; Marcadores moleculares.

### Abstract

Marismeño horse, is a Spanish equine breed threatened with extinction located almost exclusively at the Espacio Natural de Doñana, a protected area (Natural and National Park), at the Southwest of the Iberian Peninsula. 25 microsatellites recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG) were typed to define the genetic profile of the breed (AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394). The microsatellites were amplified by PCR (Polimerase Chain Reaction). The obtained fragments were separated by electrophoresis in an automatic sequencer ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The fragment analysis and genotyping was made using the programmes Genescan Analisis 3.1.2 and Genotyper 2.5, using Genescan® 400HD ROX as size standard. Heterozygosity analysis, Fis, multivariate analysis and assignation and genetic structure analysis were performed. All the microsatellites analyzed were informative and polymorphic, with a minimum of 6 alleles for the microsatellites AHT5, HMS6 and HMS7, and a maximum of 12 for the microsatellite ASB2. The Marismeño breed shows a high variability, with an average of 8.24 alleles per locus. The FIS value for the population was 0.007. This means that the population is homogeneous and not significantly deviated from HWE. The genetic structure analysis confirms the analysed individuals group together. The conclusion is that the first results of a great effort done by the Marismeño horse breeders are being collected, to settle the breed characteristics without significant loss of genetic variability.

### Resumen

El caballo Marismeño, es una raza equina española que se halla en peligro de extinción y que se localiza casi exclusivamente en el Espacio Natural de Doñana, entorno protegido (Parque Natural y Parque Nacional), situado entre las provincias de Sevilla, Huelva y Cádiz, al Suroeste de la Península Ibérica. Para realizar una caracterización genética de la raza y definir su perfil genético se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394. Se amplificaron los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos obtenidos en la PCR se separaron mediante una electroforesis en un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realizó mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños. Se realizaron análisis de heterocigosidad, Fis, análisis multivariable y test de estructura genética y asignación. Todos los microsatélites analizados resultaron muy informativos y polimórficos mostrando entre un mínimo de 6 alelos, para los microsatélites AHT5, HMS6 y HMS7, y un máximo de 12 en el microsatélite ASB2. La raza equina Marismeña muestra una alta variabilidad, con un número medio de 8,24 alelos por locus. El valor medio de FIS de la población es de 0,007, lo que indica que la población Marismeña es homogénea y además no muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. El análisis de la estructura genética confirma que los individuos analizados se agrupan juntos. La conclusión es que se están obteniendo los primeros frutos derivados de un gran esfuerzo de los criadores de

Caballo Marismeño para fijar las características de su raza sin que haya una pérdida significativa de variabilidad genética.

### **Introducción**

En la Península Ibérica existe una gran proporción de razas que se encuentran en peligro de extinción cuyas perspectivas de futuro dependen del establecimiento de programas de conservación que deben estar apoyados, entre otros, en estudios de diversidad genética. La raza equina Marismeña se encuentra ubicada dentro de las razas autóctonas en peligro de extinción, según el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (Anexo I del Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre). Su censo global se sitúa alrededor de las 1500 cabezas que, casi en su totalidad, se encuentran integradas en el Libro Genealógico gestionado por la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Marismeño. En el caso del caballo, es difícil desligar la memoria de los movimientos migratorios humanos asociados a los caballos como medio de transporte. En este sentido, la raza Marismeña que está en peligro de extinción, representa al caballo que se encuentra en el Entorno Natural de Doñana con un enraizamiento profundo en las costumbres y tradiciones de la zona. Este trabajo estudia la estructura genética de la raza equina Marismeña, mediante la tipificación de 25 secuencias microsatélites del ADN. Se han realizado análisis estadísticos de los datos con distintas herramientas para valorar la diversidad intra-racial y la estructura genética de la raza.

### **Material y métodos**

Para realizar una caracterización genética de la raza y definir su perfil genético, se han obtenido 100 muestras de animales de Caballo Marismeño obtenidas aleatoriamente. Se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394. Se amplificaron los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos obtenidos en la PCR se separaron mediante una electroforesis en un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realizó mediante los programas informáticos Genescan Analysis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños. Se realizaron análisis de heterocigosidad, Fis, análisis multivariable para lo que se ha utilizado el programa GENEPOP 1.2 (Raymond M., Rousset F., 1995) y test de estructura genética y asignación con el programa Structure v.2.0 (Pritchard et al., 2000).

### **Resultados y discusión**

Todos los microsatélites analizados resultaron muy informativos y polimórficos mostrando entre un mínimo de 6 alelos, para los microsatélites AHT5, HMS6 y HMS7, y un máximo de 12 en el microsatélite ASB2. La raza equina Marismeña muestra una alta variabilidad, con un número medio de 8,24 alelos por locus. El valor medio de FIS de la población es de 0,007, lo que indica que la población Marismeña es homogénea y además no muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Se ha determinado la posible estructura genética de la población Marismeña comparándola con tres razas: Pura Raza Español, Caballo de las Retuertas e Hispano-Árabe, que se explotan en la misma zona y que a priori podría pensarse que han ejercido alguna influencia en el Caballo Marismeño. El análisis de la estructura genética confirma que los individuos analizados se agrupan juntos y se diferencian de las otras razas estudiadas, aunque hay algunos individuos que comparten su genoma con el PRE (Pura Raza Español).

### **Discusión**

Los caballos que constituyen en la actualidad la Raza Marismeña surgen de un esfuerzo muy grande de la asociación para homogeneizar lo que hace pocos años era una población de caballos sin control reproductivo alguno. Los frutos de este esfuerzo se aprecian por un gran avance en la uniformidad genética de la raza y, a la vez, el mantenimiento de su diversidad con un nº alto de alelos y un FIS muy contenido realizado en la última década. En un estudio previo llevado a cabo con una muestra cogida al azar entre caballos pobladores de la Marisma del Guadalquivir y anterior a la declaración oficial de la Raza Marismeña (Vega-Pla 2006), se observa cómo las diferencias entre individuos y la presencia en su genoma de influencias de razas muy diversas pedía

una intervención inmediata en la gestión de esta población de caballos. El cruzamiento con el PRE ha sido una práctica habitual hasta hace unos años y es lógico que forme parte del acervo genético de la Raza Marismeña, sin embargo ésta mantiene también sus características propias derivadas de los antiguos caballos que poblaban la zona y que hoy prácticamente han desaparecido, exceptuando un pequeño grupo de ejemplares que se conservan en la Reserva Biológica de Doñana denominados Caballos de las Retuertas.

**Tabla I.** Número de muestras analizadas, número de alelos por marcador (NA), riqueza alélica (RA), heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He), contenido de información polimórfica (PIC), coeficiente de consanguinidad (FIS). [*Sample size, number of alleles per marker (NA), allelic richness (RA) observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphism information content (PIC), inbreeding coefficient (FIS)*]

Nº de muestras analizadas	NA	RA	He	Ho	PIC	F <sub>IS</sub>
100	8,24	7,36	0,79	0,74	0,75	0,007

### Conclusiones

En un periodo de tiempo de apenas 10 años se ha podido comenzar a fijar las características genéticas de los caballos de Raza Marismeña sin que haya una pérdida significativa de variabilidad genética.

### Bibliografía

- Falconer, D.S., 1990, Introduction to quantitative genetics. Compañía Editorial Continental, S.A. México.
- 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. *Journal of Heredity* 86(3), 248-249.
- Vega-Pla, J.L., Calderón, J., Rodríguez-Gallardo, P.P., Martínez, A.M., Rico, C., 2006, Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics* 37, 571-578.



## ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA CONTRIBUCIÓN A LA BIODIVERSIDAD DE LA RAZA EQUINA MARISMEÑA

Pablo Gómez, Montserrat<sup>1\*</sup>; Landi, Vincenzo<sup>1</sup>; Martínez Martínez, Amparo<sup>1</sup>; Gómez Carpio, Mayra<sup>1</sup>; Nogales Baena, Sergio<sup>1</sup>; Delgado Bermejo, Juan Vicente<sup>1</sup>; Vega-Pla, José Luis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA);

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)

\*z12panon@gmail.com



### INTRODUCCIÓN

La cuestión de qué razas merecen ser conservadas viene siendo debatida desde que Weitzman planteó su concepto de contribución a la biodiversidad (Weitzman, 1993). La aproximación de Weitzman tenía en cuenta criterios genéticos, económicos, de escala (regional, nacional o global) y era especialmente atractiva porque su cálculo era rigurosamente matemático y objetivo. En el presente estudio se pretende hacer una aproximación, también matemática, pero con un enfoque algo distinto, utilizando dos métodos: el de Caballero y Toro (2002) y el de Pétit et al. (1998). El objetivo de este estudio es hacer una comparación entre ambos métodos para valorar y cuantificar la contribución de la raza Marismeña con su diversidad intra-racial al conjunto de razas estudiadas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del estudio se han tomado 599 muestras de pelo de las razas Marismeña, PRE, Retuertas, Hispano-Árabe, Mallorquina, Menorquina, Trotador, Pottoka, Asturcón, Losino, Árabe y PSI. Se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG). Para la cuantificación de la contribución a la biodiversidad se utilizó el programa Molkin v.2.0 (Gutiérrez et al, 2005).



### RESULTADOS

SUBPOP	N	Riqueza alélica (k)	GD <sub>T</sub>	Loss/Gain	C <sub>S</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>T</sub> Petit et al. (%)
MAR	61	8,571	0,797	-0,108	0,996	-0,766	0,229
PRE	60	7,714	0,799	0,132	0,181	-0,547	-0,366
RET	55	5,857	0,798	0,017	-1,143	1,188	0,045
HA	60	7,286	0,798	0,074	0,247	-0,498	-0,251
MAL	30	6,524	0,797	-0,105	-0,047	0,358	0,312
MEN	69	7,381	0,797	-0,091	0,025	0,130	0,154
TRO	46	7,190	0,795	-0,280	0,372	0,186	0,558
POT	26	7,857	0,796	-0,182	1,008	-0,626	0,382
AST	39	7,048	0,797	-0,035	-0,137	0,269	0,132
LOS	59	8,238	0,797	-0,045	0,045	0,242	0,287
ARA	48	5,952	0,800	0,281	-1,213	0,615	-0,597
PSI	46	5,667	0,794	-0,494	-0,334	1,054	0,720
Total	599	11,048					

Tabla 1. N, número de individuos/población; GD<sub>T</sub>, diversidad genética total; C<sub>S</sub>, contribución de la población debida a la riqueza alélica propia de la misma; C<sub>D</sub>, contribución de la población debida a su divergencia con el resto; C<sub>T</sub>, contribución total. Los signos indican, por un lado, una pérdida (-) o ganancia (+) de diversidad génica si desapareciera la subpoblación, y por otro, una contribución positiva (+) o negativa (-) de dicha subpoblación a la riqueza alélica de la raza. MAR: Marismeño, PRE: Pura Raza Español; RET: Retuertas; HA: Hispano-Árabe; MAL: Mallorquín; MEN: Menorquín; TRO: Trotador; POT: Pottoka; AST: Asturcón; LOS: Losino; ARA: Árabe; PSI: Pura Sangre Inglés.

Los resultados obtenidos en ambos métodos son bastante congruentes, aunque las contribuciones de las razas estudiadas han sido muy bajas: la desaparición de cualquiera de ellas, por sí sola, no produciría una pérdida de diversidad genética ni de riqueza alélica superior al 1%. Aun así, hay que añadir que el Marismeño produciría una pérdida de diversidad genética si desapareciera (-0,108%) y aporta un 0,23% a la riqueza alélica comparándolo con las 12 razas estudiadas.

### CONCLUSIONES

Este análisis tiene un enfoque eminentemente genético y teórico por lo que habría que tener en cuenta otros criterios (culturales, económicos, sociales, etc) antes de tomar ninguna decisión acerca de su valor para ser conservada.

### BIBLIOGRAFÍA

I. Álvarez, L.J. Royo, L. Pérez-Pardal, I. Fernández, L. Payeras, F. Goyache. Assessing losses of genetic variability in the endangered Mallorquí horse. Czech J. Anim. Sci., 55, 2010 (10): 456-462.  
 E. Bartolomé, F. Goyache, A. Molina, I. Cervantes, M. Valera and J. P. Gutiérrez. Pedigree estimation of the (sub)population contribution to the total gene diversity: the horse coat colour case. Animal (2010), 4:6, pp 867-875 & The Animal Consortium 2010. doi:10.1017/S1751731110000182  
 Caballero A., Toro MA. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conserv Gen 3: 289-299.  
 Ferrando A., Avellanet R., Casas M. y Jordana J. COASCENDENCIA MOLECULAR PARA LA PROGRAMACIÓN DE APAREAMIENTOS Y PÉRDIDAS DE DIVERSIDAD EN OVINO XISQUETA. XI SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS. João Pessoa-Parabíba, 2010.  
 Gutiérrez, J.P., Royo, L.J., Álvarez, L., Goyache, F., (2005) Molkin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. Journal of Heredity, 96: 718-721.  
 REMY J. PETIT, ABDELHAMID EL MOUSADIK, ODILE PONS. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. Conservation Biology, Pages 844-855 Volume 12, No. 4, August 1998  
 FOTOGRAFÍAS: Sergio Nogales Baena.

## ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA CONTRIBUCIÓN A LA BIODIVERSIDAD DE LA RAZA EQUINA MARISMEÑA

Pablo Gómez, Montserrat<sup>1\*</sup>; Martínez Martínez, Amparo<sup>1</sup>; Nogales Baena, Sergio<sup>1</sup>; Landi, Vincenzo<sup>1</sup>;  
Delgado Bermejo, Juan Vicente<sup>1</sup>; Vega-Pla, José Luis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA);*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)*

[\\*z12pagom@gmail.com](mailto:*z12pagom@gmail.com)

La cuestión de qué razas son dignas o valederas de ser conservadas viene siendo debatida desde que Weitzman planteó su concepto de *contribución a la biodiversidad* (Weitzman, 1993). La aproximación de Weitzman tenía en cuenta criterios genéticos, económicos, de escala (regional, nacional o global) y era especialmente atractiva porque su cálculo era rigurosamente matemático. En el presente estudio se pretende hacer una aproximación, también matemática, pero con un enfoque algo distinto, utilizando dos métodos: el de Caballero y Toro (2002) y el de Pétit et al. (1998). Para la realización del estudio se han tomado 599 muestras de pelo de las razas Marismeña, PRE, Retuertas, Hispano-Árabe, Mallorquina, Menorquina, Trotador, Pottoka, Asturcón, Losino, Árabe y PSI. Se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394. Se amplificaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos obtenidos en la PCR se separaron mediante una electroforesis en un secuenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realizó mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños. Para la cuantificación de la contribución a la biodiversidad se utilizó el programa Molkin v.2.0 (Gutierrez et al, 2005). El objetivo de este estudio es hacer una comparación entre ambos métodos para valorar e intentar cuantificar si la raza Marismeña contribuye o no con su diversidad intra-racial al pool genético. Este análisis es preliminar y habría que tener en cuenta otros criterios (culturales, económicos, sociales y también, por qué no, la singularidad de esta raza, que es seña de identidad del pueblo que la acoge) antes de tomar ninguna decisión acerca de su valor para ser conservada.

**Palabras clave:** diversidad genética, conservación, coancestría, riqueza alélica.

## Red CONBIAND-Proyecto Biohorse:

# RELACIONES GENÉTICAS del CABALLO MARISMEÑO CON OTRAS RAZAS EQUINAS

Pablo Gómez, Montserrat<sup>1\*</sup>; Martínez Martínez, Amparo<sup>1</sup>; Nogales Baena, Sergio<sup>1</sup>; Gómez Carpio, Mayra<sup>1</sup>; Oom, María do Mar<sup>2</sup>; Luis, Cristina<sup>2</sup>; Landi, Vincenzo<sup>1</sup>; Delgado Bermejo, Juan Vicente<sup>1</sup>; Vega-Pla, José Luis<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA); <sup>2</sup>Centro de Biología Ambiental, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016. Lisboa, (PORTUGAL). <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)

\*z12pagom@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La presencia de caballos en la Marisma del Guadalquivir forma parte del patrimonio natural y cultural español, y debe de tratar de perpetuarlo para conocimiento de las generaciones futuras.

En este sentido, la raza equina Marismeña presenta un enraizamiento profundo en las costumbres y tradiciones de la zona donde se asienta, el Espacio Natural de Doñana. Esta población equina ha sido cruzada, hasta hace muy pocos años, con otras razas de caballos hasta que se constituyó recientemente como la raza de Caballo Marismeño, lo que va a permitir su supervivencia de forma ordenada y con claros objetivos de conservación.

En el presente estudio se han examinado las relaciones que mantiene la raza Marismeña con otras razas de la Península Ibérica e internacionales, se han añadido el Sorraia y el Berberisco dada la relación histórica y geográfica de estas razas con la Marisma.

\*El caballo Marismeño aparece en una rama corta, lo que indica que está poco diferenciado y que comparte su composición genética con otras razas. Las influencias del PRE, Prá y el Berberisco lo sitúan en el centro del árbol de distancias.

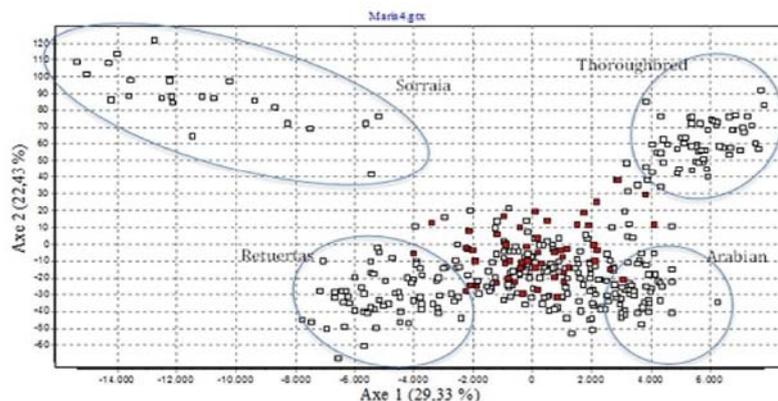
\*El Sorraia y el Retuertas muestran un efecto isla probablemente debido a su aislamiento geográfico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, LEX3, LEX33, VHL20, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY394.

Software utilizado: Populations, Fstat, Genetix; Treeview.

## RESULTADOS



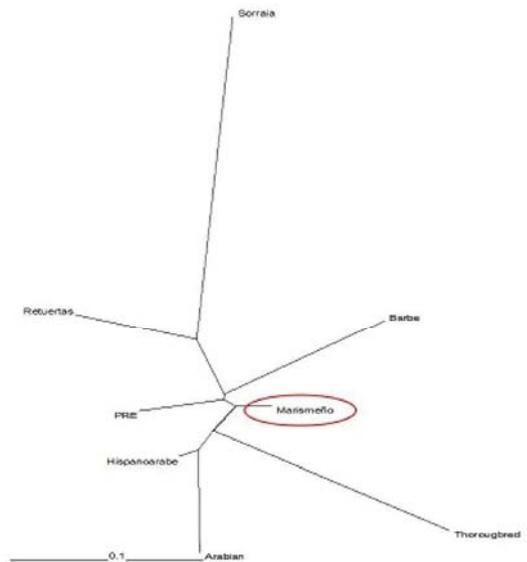
Análisis de correspondencia realizado con Genetix. En rojo la raza Marismeña  
Arabian: Pura Raza Árabe, Thoroughbred: Pura Sangre Inglés.

\*El caballo Marismeño ocupa un lugar central junto con otras razas como el caballo Hispano-Árabe y el Pura Raza Español, siendo casi inapreciable la diferenciación genética entre las razas.

\*Se aprecia una clara diferenciación del Sorraia, Retuertas y el Pura Sangre Inglés.

$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
0,01042	0,09895	0,08946

\*Los valores medios de los F-statistics indican que las muestras son homogéneas y que hay bastante diferenciación genética, tratándose de razas de caballos.



Árbol de distancias  $D_A$  de Nei, construido con el método Neighbor joining.  
Arabian: Pura Raza Árabe, Thoroughbred: Pura Sangre Inglés, PRE: Pura Raza Español, Barbe: Berberisco.

	Árabe	Berberisco	Hispano-Árabe	Pura Raza Español	Pura Sangre Inglés	Retuertas	Sorraia	Marismeño
Árabe	0	0.1869	0.0819	0.1728	0.1967	0.2118	0.3864	0.1344
Berberisco	0.0952	0	0.1398	0.1376	0.2631	0.2080	0.3332	0.1180
Hispano-Árabe	0.0333	0.0470	0	0.06995	0.1753	0.1486	0.3392	0.0762
Pura Raza Español	0.1075	0.0543	0.0321	0	0.2035	0.1390	0.3106	0.0661
Pura Sangre Inglés	0.1235	0.1050	0.0787	0.0978	0	0.2772	0.3984	0.1535
Retuertas	0.1205	0.0811	0.0676	0.0748	0.1305	0	0.2805	0.1161
Sorraia	0.2036	0.1535	0.1525	0.1537	0.1801	0.1403	0	0.3005
Marismeño	0.0693	0.0278	0.0215	0.0249	0.0637	0.0497	0.1265	0

Distancias genéticas de 8 poblaciones basadas en la  $D_A$  de Nei (1983) (diagonal superior) e índices de fijación para todos los pares de razas estudiadas (diagonal inferior)

\*Se emplean 2 modelos de distancias para comprobar la robustez de los resultados obtenidos, y se usan razas de referencia para valorar la bondad del análisis estadístico efectuado y relativizar los resultados.

\*Los valores que arroja la raza Marismeña indican que nos encontramos ante una raza que ha sido recientemente cruzada con otras.

## CONCLUSIONES

El caballo Marismeño es una raza equina española cuyo proceso de recuperación y conservación comenzó hace muy pocos años por lo que presenta reminiscencias de cruzamiento indiscriminado con otras razas como el Pura Raza Español o el Hispano Árabe, sin embargo es una raza por la que merece la pena luchar dada su singularidad y contribución al entorno tan especial en el que se desenvuelve

## REFERENCIAS

- Falconer, D.S., 1990, Introduction to quantitative genetics. Compañía Editorial Continental, S.A. México.  
Goudet J. (1995) FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity 86, 178-9.  
Langella, O. 1999. Populations 1.2.28 CNRS UPR9034 <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>  
Page, R.D., 1996, TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer applications in the biosciences 12, 357-358.  
Vega-Pla, J.L., Calderón, J., Rodríguez-Gallardo, P.P., Martínez, A.M., Rico, C., 2006, Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. Animal Genetics 37, 571-578

**Área temática:** Genética de razas locales

## **RELACIONES GENÉTICAS DEL CABALLO MARISMEÑO CON OTRAS RAZAS EQUINAS**

Pablo Gómez, Montserrat<sup>1\*</sup>; Martínez Martínez, Amparo<sup>1</sup>; Nogales Baena, Sergio<sup>1</sup>; Landi, Vincenzo<sup>1</sup>; Gómez Carpio, Mayra<sup>1</sup>; Oom, María do Mar<sup>2</sup>; Luis, Cristina<sup>2</sup>; Delgado Bermejo; Juan Vicente<sup>1</sup>; Vega-Pla, José Luis<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (ESPAÑA);  
<sup>2</sup>Centro de Biología Ambiental, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016. Lisboa, (PORTUGAL). <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa (ESPAÑA)

[\\*z12pagom@gmail.com](mailto:*z12pagom@gmail.com)

### **RESUMEN**

El caballo Marismeño, es una raza equina española que se halla en peligro de extinción y que se localiza casi exclusivamente en el Espacio Natural de Doñana, entorno protegido (Parque Natural y Parque Nacional), situado entre las provincias de Sevilla, Huelva y Cádiz, al Suroeste de la Península Ibérica. Para realizar un análisis de las relaciones genéticas del caballo Marismeño con distintas razas se tipificaron 25 marcadores microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG). Se realizaron análisis de distancias genéticas basados en la  $D_A$  de Nei, índices de fijación, análisis de correspondencia, y se realizó un árbol de distancias, utilizando la  $D_A$  de Nei. El análisis realizado indica que la raza Marismeña se origina a partir de los antiguos caballos de la Marisma y que tras años de evolución se halla próxima a caballos de silla como el Hispano-Árabe y al Pura Raza Español, y sugiere que también podría haber habido influencias del caballo Berberisco del norte de África. Los valores hallados en los índices de fijación de la raza Marismeña indican que es una raza aún “joven”, que ha estado sometida a cruces recientes con otras razas, aunque aparece diferenciada de las demás en el árbol de distancias. La conclusión es que se trata de una raza equina más de España por la que merece la pena luchar dada su peculiaridad y su contribución al entorno tan especial en el que se desarrolla.

**Palabras clave:** distancias genéticas, árbol de distancias, equino, microsatélites.

# **Marcadores genéticos como apoyo a la selección de reproductores de Caballo Marismeño**

**Pablo Gómez, Montserrat; Landi, Vincenzo; Vega-Pla, José Luis**

*Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Genética. E-mail: [z12pagom@gmail.com](mailto:z12pagom@gmail.com)*

**Summary** The selection of animals to be bred, is an important and very complex concern, because there are many issues that have to be taken in account, not only morphological or functional but also genetic factors, because stallions are the first step for conservation, maintenance and improvement of a breed. In this paper, a microsatellite assisted stallion selection method is described. This method will help the Association of Marismeño Breeders to take the optimal decision at the moment of the selection of the stallions, and will ease maintaining the features of the Marismeño breed as they've been established by the Association criteria.

**Resumen** La selección de los animales que se van a utilizar como reproductores es un asunto importante y de gran complejidad, pues hay que tener en cuenta muchos factores, no sólo morfológicos y funcionales, sino también genéticos, pues los sementales son el primer paso para la conservación, mantenimiento y mejora de una raza. En este trabajo se describe un método de selección de sementales asistido por marcadores microsatélites, que ayudará a la Asociación de Criadores de Ganado Marismeño, a tomar de manera óptima una decisión acerca de qué animales seleccionar como sementales para mantener las características de la raza Marismeña tal como las establecen los criterios de la Asociación.

## **Introducción**

El caballo marismeño es una raza que vive en semi-libertad en las marismas del Entorno de Doñana y zonas circundantes, y que tradicionalmente ha sido manejada por ganaderos locales. Tiene una gran importancia socio-cultural en la zona, debido a las tradiciones ancestrales relacionadas con el caballo, que son típicas de las marismas [1], la más conocida de las cuales es la Saca de las Yeguas, que se realiza en Doñana el 26 de Junio todos los años, desde hace alrededor de medio milenio. Su existencia es parte de la tradición cultural local. Ha sido sometido a cruces con distintas razas, tales como el Bretón, el Pura Raza Español, el caballo Árabe, el Anglo-Árabe y el Pura Sangre Inglés, fundamentalmente [2]. Hay muchos trabajos basados en el uso de distintas técnicas, tratando de incrementar el conocimiento de la diversidad genética de razas de diferentes especies, cuyos resultados proporcionan información muy valiosa a la hora de considerar estrategias de conservación. Es importante, a la hora de seleccionar los reproductores, tener en cuenta la mayor información posible, no sólo morfológica y funcional, sino también genética para que pasen a formar parte de la raza los individuos que más se ajusten a los criterios que establece la Asociación.

Actualmente, las herramientas de genética molecular proporcionan un número prácticamente ilimitado de marcadores de ADN que permiten la identificación individual y por lo tanto, la asignación de muestras anónimas a determinadas poblaciones. El problema del análisis del origen genético de muestras anónimas, como en el caso que se plantea con el Caballo Marismeño, es asignar un ejemplar a una determinada población. La muestra problema se asignará a la población cuya composición genética proporcione una mayor probabilidad, no se excluye la asignación de un ejemplar a otras poblaciones, aunque con probabilidades más bajas.

Los microsatélites, también conocidos como SSR (simple sequence repeats) o STR (short tandem repeats), son repeticiones en tándem de unidades que van de 2 a 6 pares de bases, y que se distribuyen por todo el genoma nuclear de los eucariotas (Bhargava y Fuentes, 2010)[3]. Debido a su alto polimorfismo se han utilizado como marcadores genéticos para fingerprinting, controles de paternidad, mapeado genético, conservación y genética de poblaciones [4,5,6].

## **Metodología**

### *Tipificación alélica*

La extracción del ADN se realizó a partir de muestras de raíz de pelo utilizando métodos convencionales. Tras la resuspensión del ADN y verificación en gel de agarosa, las distintas alícuotas se mantuvieron para su conservación a -20°C. Se analizaron 25 marcadores genéticos del tipo denominado secuencia microsatélite seleccionados y recomendados por la FAO/ISAG (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ International Society of Animal Genetics) para estudios de diversidad genética. Los microsatélites se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un equipo GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Para realizar la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos mediante PCR se sometieron éstos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador automático ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se realizó mediante los programas informáticos Genescan Analisis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente.

### *Análisis estadístico*

Los métodos aplicados consideran que existen una serie de poblaciones de referencia o razas de caballos con las que los Caballos Marismeños pueden o no haber tenido relación en el pasado, pero que sirven para verificar si el método estadístico utilizado tiene la suficiente capacidad de asignación. Las muestras de estas poblaciones de referencia, así como los genotipos fueron proporcionados por el Laboratorio de Investigación Aplicada que tiene el Ministerio de Defensa en Córdoba. En el caso de este trabajo la dificultad surge como consecuencia de que es esperable que un elevado porcentaje de las muestras sean el fruto de cruzamientos recientes con estas razas, por lo que será de interés aplicar un procedimiento que pueda estimar composiciones mezcladas de genomas provenientes de varias poblaciones.

Utilizamos un método no supervisado [7] que asume situación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias de los alelos, estimando para cada individuo incluido en el análisis, la probabilidad de que pertenezca a cada una de las poblaciones consideradas ancestrales. Esta probabilidad es en realidad la distribución posterior de cada porcentaje de genoma que proviene de las poblaciones ancestrales y es calculada aplicando un enfoque bayesiano utilizando técnicas MCMC (Monte Carlo Markov Chain). Este procedimiento presenta como ventajas más destacables el no requerir especificar las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales, y la de permitir tener en cuenta situaciones genéticas complejas, incluyendo el caso de muestras que provienen de mezcla entre varias poblaciones. En nuestro caso, esta posibilidad es de gran importancia ya que es esperable que un elevado porcentaje de muestras de Caballos Marismeños provengan del cruzamiento entre los reproductores de alguna de las razas de referencia, de tal manera que el genoma de estas razas estará representado en las muestras de caballos en diferentes proporciones que resulta de interés detectar. Para aplicar este procedimiento se utilizó el software Structure [7].

## Resultados

Después de una serie de análisis previos para tratar de optimizar los valores de los parámetros de simulación de la aplicación informática (duración del período de “burn-in” y número de iteraciones) el número de poblaciones más verosímil resultó ser 5, siendo consecuencia de una diferenciación clara entre las poblaciones de referencia empleadas. De esta forma, las muestras de las razas Retuertas, Árabe, Pura Raza Española y Pura Sangre Inglés, tenían un genoma que en un porcentaje superior al 70 por 100 provenía, en la mayoría de los análisis realizados, de una única población ancestral, mientras que en las muestras de Caballo Marismeño se identificaban cuatro poblaciones ancestrales claras, una quinta más heterogénea (Tabla 1).

*Tabla 1.- Proporción de genoma que para cada población de referencia muestreada proviene de cada una de las hipotéticas poblaciones ancestrales consideradas.*

Razas/Agrupamientos	1	2	3	4	5	Nº muestras
Marismeño	0.179	0.223	0.220	0.154	0.224	1387
Retuertas	0.046	0.114	0.701	0.081	0.058	67
Pura Raza Española	0.052	0.719	0.079	0.058	0.091	60
Árabe	0.073	0.059	0.042	0.767	0.059	60
Pura Sangre Inglés	0.861	0.026	0.023	0.050	0.041	60

Hay que señalar que en el procedimiento no supervisado las poblaciones de origen son objetos abstractos, que no tienen necesariamente que estar representados en los datos de campo. Además, hay que extremar la cautela cuando se utilizan estos procedimientos de análisis ya que con frecuencia la estimación de la proporción del genoma que proviene de cada una de las poblaciones de origen puede cambiar drásticamente de un análisis a otro cuando se utiliza un número de poblaciones ancestrales relativamente elevado. Es decir, a pesar de que el número

de poblaciones ancestrales más verosímil pueda ser 5, la utilización de más grupos provocará inestabilidad en la asignación de las razas de origen a los diferentes agrupamientos o “clusters”.



Figura 1. Representación gráfica del análisis. Cada línea vertical representa un individuo. La composición de colores equivale a la representación de los genomas correspondientes.

En la tabla 2, se muestran algunos ejemplos de muestras en las que se observa la proporción de genoma de las poblaciones ancestrales de cada una..

Id Animal	PSI	PRE	RET	ARA	OTROS
MM31465	0.040	0.036	0.763	0.080	0.081
MM31469	0.032	0.025	0.816	0.093	0.034
MM31475	0.041	0.038	0.769	0.020	0.133
MM31463	0.084	0.787	0.051	0.044	0.034
MM48155	0.029	0.800	0.103	0.023	0.045
MM31489	0.770	0.104	0.042	0.031	0.053
MM37399	0.857	0.022	0.034	0.061	0.026

Tabla 2. Proporción del genoma de las poblaciones ancestrales en algunas muestras de ejemplo.

## Conclusiones

El conjunto de la información molecular que se ha utilizado es capaz de discriminar entre las poblaciones de referencia que han sido muestreadas para llevar a cabo este trabajo, las razas Retuertas, Pura Raza Española, Árabe y Pura Sangre Inglés. Los valores de asignación obtenidos para las razas de referencia son superiores al 70%, que si bien no son concluyentes para cada muestra, si lo son para ayudar a seleccionar aquellos ejemplares de Caballo Marismeño más adecuados según los criterios de la Asociación y que podrían actuar como padres de las siguientes generaciones.

## Bibliografía:

- [1] Muñoz-Bort D. (2004) La Ganadería Caballar en la Villa de Almonte (ed. By Ayuntamiento de Almonte) Artes Gráficas Impresol. Almonte.
- [2] Fernández Rodríguez M., Gómez Fernández M., Delgado Bermejo J.V., Adán Belmonte S. & Jiménez Cabras M. (2010) GUÍA DE CAMPO DE LAS RAZAS AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid – España.
- [3] (Bhargava y Fuentes, 2010)

[4, 5, 6] (Buschiazzo y Gemmell, 2006; Chistiakov et al., 2006; Bhargava y Fuentes, 2010; Guichoux et al., 2011)

[7] Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/155/2/945>



## Genetic diversity of the semi-feral Marismeño horse breed assessed with microsatellites

Montserrat Pablo Gómez, Vincenzo Landi, Amparo Martínez Martínez, Mayra Gómez Carpio, Sergio Nogales Baena, Juan Vicente Delgado Bermejo, María do Mar Oom, Cristina Luis, Lahoussine Ouragh & José Luis Vega-Pla

To cite this article: Montserrat Pablo Gómez, Vincenzo Landi, Amparo Martínez Martínez, Mayra Gómez Carpio, Sergio Nogales Baena, Juan Vicente Delgado Bermejo, María do Mar Oom, Cristina Luis, Lahoussine Ouragh & José Luis Vega-Pla (2016): Genetic diversity of the semi-feral Marismeño horse breed assessed with microsatellites, Italian Journal of Animal Science, DOI: [10.1080/1828051X.2016.1241132](https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1241132)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2016.1241132>



© 2016 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 08 Nov 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 140



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Genetic diversity of the semi-feral Marismeno horse breed assessed with microsatellites

Montserrat Pablo Gómez<sup>a</sup>, Vincenzo Landi<sup>a</sup>, Amparo Martínez Martínez<sup>a</sup> , Mayra Gómez Carpio<sup>a</sup>, Sergio Nogales Baena<sup>a</sup>, Juan Vicente Delgado Bermejo<sup>a</sup>, María do Mar Oom<sup>b</sup> , Cristina Luis<sup>c,d,\*</sup> , Lahoussine Ouragh<sup>e</sup> and José Luis Vega-Pla<sup>f</sup> 

<sup>a</sup>Departamento de Genética, University of Cordoba, Córdoba, Spain; <sup>b</sup>Centro de Biología Ambiental, University of Lisboa, Lisboa, Portugal; <sup>c</sup>Centro Interuniversitário de História das Ciências e da Tecnologia, University of Lisboa, Lisboa, Portugal; <sup>d</sup>Museu Nacional de História Natural e da Ciência, University of Lisboa, Lisboa, Portugal; <sup>e</sup>Agricultural and Veterinary Institute Hassan II, Rabat, Morocco; <sup>f</sup>Laboratorio de Investigación Aplicada, Ministerio de Defensa, Cordoba, Spain

### ABSTRACT

Marismeno horses originated from primitive horses living around the marshes of the Guadalquivir River in Southern Spain. Throughout their evolution, they have experienced crosses with other breeds, first with horses from North Africa and thereafter with other horses. However, they have not lost their ability to adapt to the demanding marsh environment. Recently, a studbook of the breed was established, and the Breeders Association started a conservation programme. To study the relationship of the Marismeno with other breeds, a microsatellite analysis was developed, which included other ancient Southern Iberian horse populations, such as the Sorraia and Retuertas breeds. Candidates of recent crossbreeding with Marismeno horses, such as the Hispano-Arabian and the Spanish Purebred, were studied, and the Thoroughbred and the Arabian breed were used as international references. The results indicated that the Marismeno horse population maintains a great genetic diversity. Despite recent crossbreeding, the fixation index and the Hardy-Weinberg equilibrium analysis disclosed a certain homogeneity degree. A dendrogram was built using the obtained genetic distances, and clustering was performed with the software STRUCTURE, and the results reflected the genetic differentiation of the Marismeno horse from the other autochthonous Iberian breeds, although the Marismeno population has maintained a tight relationship with the Spanish Purebred. Remarkably, some relatedness between the Marismeno and the Barb horse breeds could be observed and was most likely derived from an ancient gene flow between the horses of the Iberian Peninsula and North Africa.

### ARTICLE HISTORY

Received 1 March 2016  
Revised 19 July 2016  
Accepted 4 August 2016

### KEYWORDS

Microsatellites; genetic distances; population structure; conservation genetics;

### Introduction

The biodiversity conservation of livestock remains an important concern. Despite worldwide efforts following the Convention on Biological Diversity (CBD) held in 1992, approximately one-third of all breeds continue to be threatened with extinction. Even after the approval by the Spanish Government of the Marismeno horse breed in 2008, this breed continued to be chaotically managed until 2012, which was the year the Studbook was created. According to the Association's data, the breed, using an open nucleus breeding scheme, includes less than 1000 dams and only 20 sires. These data place the breed in the Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO

2000) endangered populations list (<http://dad.fao.org>). The Marismeno horse is also classified by the Spanish government as an endangered breed because of its low census (Real Decreto 2129/2008); only 1226 individuals are registered in the studbook (MAGRAMA 2016).

Ancient Southern Iberian horses developed into the Sorraia, Retuertas and Marismeno equine breeds. It has historically been assumed that these horse populations share a common origin with Barb horses subsisting on the other side of the Gibraltar Strait (Sotillo & Serrano 1985), although this fact has not been absolutely confirmed by previous molecular marker studies (Royo et al. 2005; Luís et al. 2006).

**CONTACT** Dr. José Luis Vega-Pla  jvegpla@gmail.com  Laboratorio de Investigación Aplicada Ministerio de Defensa, Apartado de correos, 2087, 14080-Cordoba, Spain

\*Instituto Universitário de Lisboa (ISCTE-IUL), CIES-IUL, Lisboa, Portugal.

© 2016 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The horses that dwell in the Guadalquivir marshes, including the Doñana National Park, have traditionally been handled by local farmers. These horses hold great sociocultural importance for the area, and in view of the ancestral and typical horse traditions related to cattle handling, they are considered a true ancestor of the American cowboy herd management (Muñoz-Bort 2004). Overall, the existence of the Marismeño horse is a deep-seated part of the local culture and traditions.

The Marismeño horse is an equine with a typical withers height ranging from 140 to 148 cm, a subconvex profile, a broad chest and fine members (Figure 1). It is especially appreciated for its ability to work and its characteristics of adaptation, rusticity, disease resistance and courage; hence, it is very useful for traditional fieldwork. It is also important that the Marismeño horses that live in the Doñana National Park are sustained on food from the environment and that they do not receive any additional food, such as additional forage feed or fodder, or veterinary treatment (e.g., antiparasitary preventive treatments) because it is not allowed by the National Park guidelines. The distribution area of the Marismeño horse is very narrow and limited to the marshes of the Guadalquivir and mainly around the villages of Almonte and Hinojos located in the province of Huelva.

For decades, stallions of different breeds, mainly the Spanish Purebred and occasionally the Thoroughbred, were used to improve the height of the horses that live in the Guadalquivir marsh area (before the establishment of the Studbook in 2008) (Fernández

Rodríguez 2010) to make them more appropriate for riding. Nonetheless, the severe marsh conditions prevented the survival of the non-native breeds, such as the Thoroughbred living in semi-feral conditions, and it was necessary to conduct crosses with well-adapted individuals to this harsh environment. This fact led to the production of a horse breed retaining many features of the first horses that populated this region combined with other characteristics, which make it more appropriate to take on current farming and riding actions.

DNA technology-based parentage control and breed assignments are very valuable tools for the control of a breed and its conservation. Microsatellite typing has been widely used in assorted domesticated animal diversity studies, including large international projects concerning goats (Nomura et al. 2012), chickens (Granevitze et al. 2007), sheep (Peter et al. 2007), pigs (Druml et al. 2012), horses (Vega-Pla et al. 2006; Conant et al. 2012) and cattle (Delgado et al. 2012).

The aim of this study was to analyse the diversity and population structure of the Marismeño breed using microsatellite markers. An additional seven horse breeds derived from the southern part of the Iberian Peninsula were included in the study to draw comparisons.

## Materials and methods

Hair or blood samples were collected from randomly selected horses respective to each studied breed



**Figure 1.** Marismeño stallion in Guadalquivir Marshes.

(Table 1). Marismeños were obtained from 10 herds (one male and nine females per herd), and the rest of the breeds were randomly selected from our blood or hair sample bank. All of the Marismeño samples belonged to animals registered in the Foundational Studbook.

The DNA from hair samples was extracted by incubating 8–10 roots at 60° in 100 µl of 5% Chelex resin solution followed by 10 minutes of boiling, and the DNA from the blood samples was extracted following the method of Martínez et al. (2000).

Twenty-three microsatellite markers (Table 2) were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) technique in a GeneAmp 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) by performing three multiplex reactions; 12 of them recommended for genetic characterisation by the FAO (2011) and 11 proposed by Tozaki et al. (2001). Sizing of PCR products was accomplished using

**Table 1.** Sample size and herds (N/Herds), average number of alleles per population (ANA), observed average heterozygosity (Ho), expected average heterozygosity (He) and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ).

Breed	N/Herds	ANA	Ho	He	$F_{IS}$
Arabian	60/60	6.32	0.6547	0.6754	0.0307
Barb	21/4	7.32	0.7657	0.7598	-0.0080
Hispano-Arabian	40/15	7.24	0.7520	0.7664	0.0190
Spanish Purebred	60/60	7.64	0.7138	0.7388	0.0341
Thoroughbred	60/60	5.72	0.7175	0.7348	0.0236
Retuertas	67/1	6.76	0.7359	0.7137	-0.0313*
Sorraia	23/1	4.48	0.6194	0.6418	0.0357
Marismeño	50/10	8.48	0.8016	0.7938	-0.0099

\*Significance level ( $p < .05$ ).

an internal size standard and a reference sample on each gel. The fragment analysis and allelic typing were performed using the software packages GeneScan Analysis 3.1.2 and Genotyper 2.5, respectively.

The average number of alleles per locus and the allelic richness index, corresponding to the minimum number of alleles based on the smallest sample size ( $n = 21$ ), were estimated using the program FSTAT (Goudet 2001).

Allele frequencies, together with the observed (Ho) and expected (He) heterozygosities and the polymorphic information content (PIC), were calculated by the means of the Microsatellite TOOLKIT Add-In for Excel (Park 2001).

The  $F_{IS}$  values (the heterozygote-deficient coefficient as an estimation of the inbreeding coefficient across populations) with 95% confidence intervals were calculated with the GENETIX v. 4.04 software (Belkhir et al. 2004), whereas the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested using the programme GENEPOP v. 3.1c (Raymond & Rousset 1995), which applies Fisher's exact test through the Markov chain Monte Carlo method (Guo & Thompson 1992).

The  $D_A$  genetic distance (Nei et al. 1983) was calculated using the software POPULATIONS 1.2.28 (Langella 1999). A neighbour-joining tree with the  $D_A$  genetic distances was built and then graphically represented with the software TreeView (Page 1996) to highlight the differentiation and potential associations among the diverse breeds.

**Table 2.** Microsatellites analysed, multiplex PCR conditions, number of alleles per marker (NA), allelic richness (RA), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) and  $p$ -value for the deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium.

Microsatellite	Multiplex	NA	RA	Ho	He	PIC	$F_{IS}$	$p$ -Value
AHT4	M1	7	6.859	0.7869	0.7901	0.7511	0.044	0.1596
AHT5	M1	6	5.861	0.7500	0.7876	0.7407	0.048	0.4454
ASB17	M1	11	9.982	0.7869	0.8820	0.8619	0.004	0.0757
ASB2	M2	12	9.000	0.8036	0.8740	0.8517	-0.071	0.9475
ASB23	M1	7	5.969	0.8596	0.8075	0.7704	-0.046	0.9659
HMS3	M2	8	7.000	0.7500	0.8174	0.7868	0.088	0.0418*
HMS6	M1	6	5.969	0.7193	0.7198	0.6769	0.026	0.1906
HMS7	M1	6	5.000	0.7541	0.7407	0.6977	-0.061	0.1353
HTG10	M2	8	5.999	0.7167	0.7230	0.6779	-0.021	0.3122
HTG4	M1	7	4.998	0.6721	0.7420	0.6925	0.077	0.0219*
LEX33	M2	11	8.000	0.8070	0.8536	0.8279	-0.045	0.3195
VHL20	M1	9	8.843	0.8056	0.8658	0.8363	0.071	0.1337
TKY287	M3	8	7.905	0.8136	0.7618	0.7235	-0.095	0.3859
TKY294	M3	8	6.987	0.7167	0.7443	0.7091	0.035	0.3068
TKY297	M3	9	7.884	0.7333	0.7908	0.7555	0.141	0.1474
TKY301	M3	7	6.980	0.8361	0.8090	0.7743	-0.038	0.4651
TKY312	M3	10	8.843	0.8852	0.8153	0.7874	-0.043	0.1416
TKY333	M3	8	6.000	0.9180	0.8302	0.7988	-0.087	0.6079
TKY337	M3	7	6.771	0.6571	0.7255	0.6798	0.095	0.0952
TKY341	M3	7	6.874	0.8333	0.7452	0.7025	-0.159	0.4428
TKY343	M3	10	9.943	0.8033	0.7843	0.7559	0.004	0.7333
TKY344	M3	8	7.716	0.7049	0.7513	0.7090	0.076	0.0347*
TKY394	M3	8	7.874	0.7500	0.8066	0.7740	0.115	0.0981
Average		8.24	7.272	0.7767	0.7899	0.7540	0.007	

\*Significance level ( $p < .05$ ).

The genetic structure of the breeds was analysed with the software STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), which identifies clusters of related individuals from multilocus genotypes and assigns individuals to identified clusters using a Bayesian algorithm based on the Markov chain Monte Carlo method. The analysis involved an admixture model with correlated allele frequencies. Eight independent runs were conducted with 300,000 iterations during the burn-in phase and 1,000,000 iterations for sampling from  $K=2$  to  $K=9$  ( $K$ =number of clusters) to estimate the most likely number of clusters present in the dataset. The STRUCTURE results in graphic representations were obtained with the programme DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004). Eight independent simulations from  $K=2$  to  $K=9$  were performed to identify the most likely  $K$  through  $\Delta K$  modal's distribution determination (Evanno et al. 2005) using the program STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012). This test is used to detect the ability of the algorithm used by the program STRUCTURE to assign individuals to its previously known cluster of origin when there are more than 2 populations. This analysis is used to detect the number of genetic groups that fit better in the dataset using the  $\Delta K$  modal's distribution determination. The outcome depends on the marker used, the number of loci analysed, the number of sampled populations and the number of individuals per sample. The genetic structure is not always a reflection of the geographical distance between the populations.

## Results

All microsatellite markers showed high levels of polymorphism with an average of 8.24 alleles per locus (Table 2), evidencing a minimum of 6 alleles (AHT5, HMS6 and HMS7) and a maximum of up to 12 alleles (ASB2). This high-allelic diversity was also confirmed by the high allelic richness (7.36) value observed, which provides an idea of a breed's allelic diversity regardless of the number of samples analysed.

The highest expected heterozygosity was found for the ASB2 (0.87) marker, whereas the lowest was detected for the HMS6 (0.72) microsatellite.

The observed heterozygosity values ranged from 0.66 to 0.92. All of the markers showed PIC values higher than 0.50; therefore, all of the microsatellite markers screened were informative and detected genetic variability in all of the studied populations.

Table 2 shows that only three markers significantly deviated from the Hardy–Weinberg equilibrium. The observed average  $F_{IS}$  value of 0.007 indicated that no clear heterozygosity deficiencies or other excesses were observed.

The mean values of  $H_e$  and  $H_o$  are 0.79 and 0.74, respectively. A mean of 6.75 alleles per population was detected; the Sorraia and Thoroughbred populations showed the lowest number of alleles (4.48 and 5.72, respectively), and Marismeño showed the highest (8.48). The observed and expected heterozygosities in each breed are shown in Table 1. The Retuertas (RET) population showed a significant excess of heterozygosity and a low  $F_{IS}$  value. Negative  $F_{IS}$  values were also found in other breeds, but observed differences were not significant. Furthermore, only 13 significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were detected among the 184 population-locus combinations, which is precisely the number expected by chance at the 5% level. No population showed more than three markers deviating from the Hardy–Weinberg equilibrium (data not shown).

The average  $F$ -statistics and their 95% confidence intervals were obtained after bootstraps of 10,000 iterations over loci comprised of  $F_{IS}=0.0104$ ,  $F_{IT}=0.0989$  and  $F_{ST}=0.0895$ .

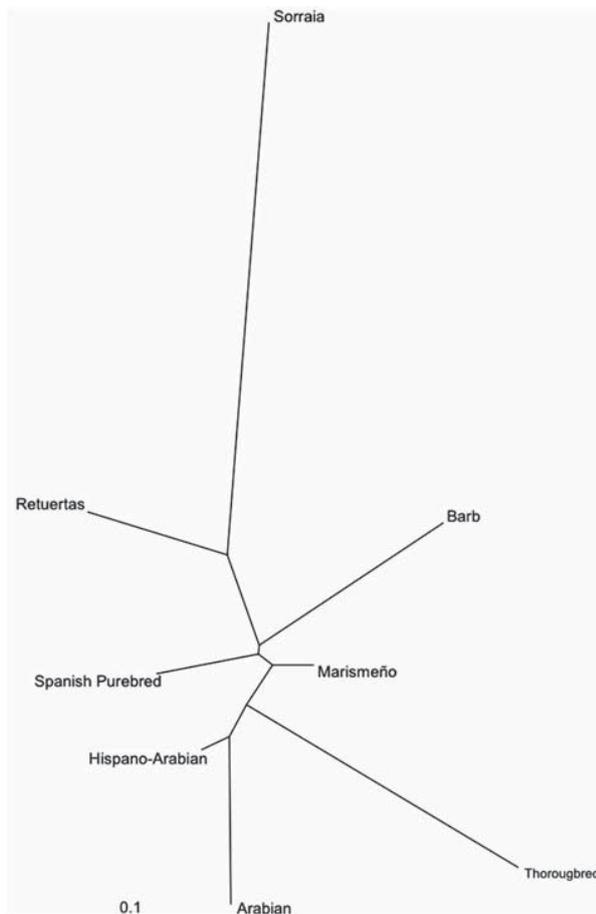
The smallest Nei's ( $D_a$ ) genetic distances were between the Marismeño population and the Spanish Pure Breed (Table 3). This is not surprising because the horses from the Guadalquivir marshes have traditionally been crossbred with Spanish Pure breed stallions. The neighbour-joining tree is shown in Figure 2. The Sorraia breed is clearly differentiated and far from the rest of the breeds represented in the tree. Interestingly, the Retuertas population did not cluster with any of the European breeds and was in contrast to the Sorraia, which was probably due to its geographic isolation and common origin in the South of the Iberian Peninsula. One cluster grouped the

**Table 3.** Genetic distances among the eight populations studied based on  $D_a$  distances of Nei et al. (1983).

BREED	Arabian	Barb	Hispano Arabian	Spanish Purebred	Thoroughbred	Retuertas	Sorraia	Marismeño
Arabian	0							
Barb	0.1869	0						
Hispano-Arabian	0.0819	0.1398	0					
Spanish Purebred	0.1728	0.1376	0.0695	0				
Thoroughbred	0.1967	0.2631	0.1753	0.2035	0			
Retuertas	0.2118	0.2080	0.1486	0.1390	0.2772	0		
Sorraia	0.3864	0.3332	0.3392	0.3106	0.3984	0.2805	0	
Marismeño	0.1344	0.1180	0.0762	0.0661	0.1535	0.1161	0.3005	0

Hispano-Arabian and Arabian horse with the Thoroughbred, with a shared origin, the Arabian horse is an ancestor of many present breeds. The Marismeño horse has a very short branch; this is likely due to its recent definition process (which is actually ongoing) and has stopped the introduction of stallions from other breeds. We can see the influence of the Spanish Pure Breed, Arabic and Barb horses on its gene pool. This is the reason why the Marismeño horse is found in the centre of the  $D_A$  distance tree.

Clustering and assignment tests were performed on the entire data set with an increasing number of inferred clusters. The cluster results showing a plot of the sample individuals is depicted in Figure 3. Independent runs from  $K=2$  to  $K=9$  produced consistent results.  $K=2$  indicated the presence of the following two very distinct clusters: one corresponded to the Thoroughbred and the Arabian horses, whereas the other included the remaining analysed equine breeds. From clusters  $K=4$  to  $K=9$ , the grouping tests reflected the presence of a population structure associated with a progressive genetic differentiation of the



**Figure 2.** Neighbour-joining tree built from Nei's  $D_A$  distance among the eight horse breeds.

autochthonous Iberian and North African breeds. Assignment tests isolated the Retuertas and Sorraia horses from the other breeds as early as  $K=5$  and maintained their integrity thereafter. The Marismeño horse was clearly differentiated from its geographic neighbour, the Retuertas horse, starting from  $K=4$ , although both share the same origin.

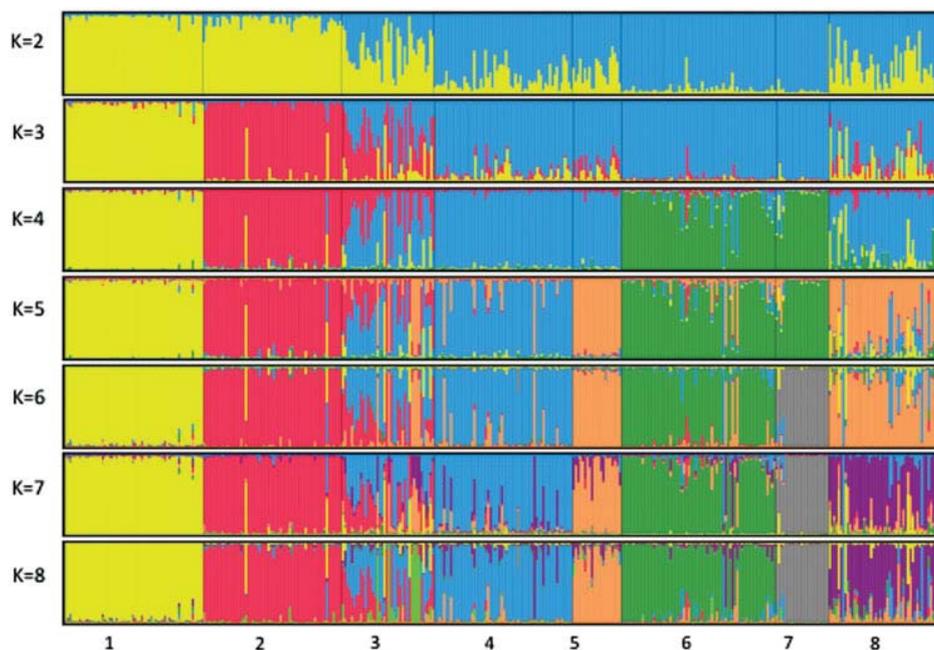
The  $\Delta K$  modal's distribution determination indicates that the soundest number of genetic groups fitting our data comprised  $K=7$  as was evidenced in the lowest standard deviation and the location on top of the plateau once the real  $K$  value was reached. This finding completely coincides with the number of breeds typed considering that the Hispano-Arabian is a mixture of the Spanish Purebred with the Arabian in its origin. Remarkably, some samples of this breed were grouped in the same genetic cluster as the Barb horse.

## Discussion

The observed genetic diversity of the Marismeño horse indicates that the heterozygosity levels have remained similar to those observed for other Spanish horses or worldwide breeds (Vega-Pla et al. 2006), including Chinese (Ling et al. 2010) or American breeds (Conant et al. 2012), and it is also similar to the levels observed for donkeys (Jordana et al. 2016), Mediterranean horses (Marletta et al. 2006), Hispano-Breton (Pérez-Gutiérrez et al. 2008) and Italian horses (Zuccaro et al. 2008).

The allelic richness value exceeded the values obtained for 24 European native horse breeds (Warmuth et al. 2011) and for American donkeys (Jordana et al. 2016), in spite of being very similar to that found for 27 Chinese equine breeds (Ling et al. 2010), six Mediterranean horse breeds (Marletta et al. 2006) and some Italian horses (Zuccaro et al. 2008; Criscione et al. 2015). The observed differentiation levels among the horse breeds of this study can be considered low when compared with other domestic species (Martinez et al. 2000; Martínez et al. 2006; Delgado et al. 2012), but were similar to those obtained in relation to other horse studies (Cañon et al. 2000; Aberle et al. 2004; Glowatzki-Mullis et al. 2006; Felicetti et al. 2010; Warmuth et al. 2011). However, these levels were higher than those found by Aranguren-Méndez et al. (2001) and Jordana et al. (2016) with respect to donkeys.

The relationship analysis provided the expected results. Spanish Pure Breed stallions have been used to breed horses from the Guadalquivir marshes until a few years ago, before the establishment of the Studbook of the Marismeño breed in 2012. As a



**Figure 3.** Graphs of the individual Q-matrices obtained with the software STRUCTURE for  $K=2$  up to  $K=9$ . Individuals ordered by breeds. Breed codes: 1.- Thoroughbred; 2.- Arabian; 3.- Hispano-Arabian; 4.- Spanish Purebred; 5.- Barb; 6.- Retuertas; 7.- Sorraia; 8.- Marismeno

consequence, a close genetic relationship between these breeds would be expected. The resulting neighbour-joining tree and the Structure clustering both supported this crossbreeding practise.

It was also noteworthy to observe some relatedness between the Marismeno and the Barb horses, which was probably due to the introduction in Andalusia of Barb horses during the Arabian invasion (which lasted for almost a millennium) (Muñoz-Bort 2004). It has not been well established where the Barb horse developed; some authors believe the breed could have originated in Northern Africa (Aparicio 1944). It seems that in pre-historic times and before the Greek and the Phoenician colonies, horses existing south of the Iberian Peninsula and the North African horses were very related, and a significant horse exchange existed between North Africa and the Iberian Peninsula, at least since Roman times and up to the Muslim period (Aparicio 1944). Subsequently, Iberian horses were crossbred with other European breeds to improve them and became what is currently the modern Spanish Purebred horse (Nissen 1963). Nevertheless, the Marismeno breed could have kept some genetic traces of the ancient crosses with the North African horses.

Interestingly, the expected outcome of the Marismeno phenogram was that the Marismeno horse would be closely related to the Retuertas breed because they are known to share a common ancestral origin. However, the Retuertas horse suffered from a

strong bottleneck 30 years ago, which could in principle explain the high genetic distance found with the Marismeno horse. Moreover, the separation of the breeds seems to be the result of local horse breeders having systematically avoided for years crossing their mares with the local stallions, showing a morphology that fits with the ancient horse model resembling that of the Retuertas horses. A further line of evidence for the above arguments is the individual clustering obtained using a Bayesian approach, which indicates that the results of horse breeds that are not outbred (i.e. fits well in its own cluster) was similar to a report for the Arabians and Thoroughbreds (Glowatzki-Mullis et al. 2006).

Currently, a crossbreeding between the Marismeno and the Retuertas horses would not be easy given that the Retuertas horse is confined to the Doñana Biological Reserve, an isolated area of 10,000 ha located within the Doñana National Park. Nevertheless, the possibility of incorporating horses from the Retuertas population in a future Marismeno conservation programme after an extensive morphological and genetic characterisation could be considered. Oddly, the Retuertas horse is in contrast with the Sorraia, probably due to a common geographic origin before the current reproductive isolation, although the Sorraia is markedly separated from the remaining breeds due to its reduced variability, which has already been observed in previous studies (e.g. Morais et al. 2005).

In conclusion, the Marismeño horse derives from the ancient horses, inhabiting the Guadalquivir marshes such as the Retuertas horses. In spite of the fact that some other breeds may have been introduced in more recent years, the results of this study indicate the uniqueness of this population adapted to this extreme environment. The management of the Marismeño horse studbook was officially established in 2012 avoiding new horse breeds influences, also the individual assignment of the foals to the population based on the genetic formula is considered in the conservation programme. Whether this is sufficient to ensure its future survival remains to be seen, but it clearly indicates that because these horses live with a minima human intervention, protecting the natural habitat of this population plays a major impact in its survival.

### Acknowledgements

This work was performed as a part of the collaborative effort between the Horse Breeding Service of the Spanish Army and the Diputación de Córdoba.

### Disclosure statement

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

### ORCID

Amparo Martínez Martínez  <http://orcid.org/0000-0002-6944-0501>

María do Mar Oom  <http://orcid.org/0000-0002-1715-4108>

Cristina Luis  <http://orcid.org/0000-0001-8005-9624>

José Luis Vega-Pla  <http://orcid.org/0000-0003-0916-9876>

### References

- Aberle KS, 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.
- Aparicio G. 1944. *Zootecnia especial: etnología compendiada*. 3th ed. Córdoba: Imprenta Moderna.
- Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gomez M. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet Select Evol.* 33:433–442.
- 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, University of Montpellier II, Montpellier (France); [cited 2011 Nov 5]. Available from: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>.
- Cañon J, Checa ML, Carleos C, Vega-Pla JL, Vallejo M, Dunner S. 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim Genet.* 31:39–48.
- Conant EK, Juras R, Cothran EG. 2012. A microsatellite analysis of five Colonial Spanish horse populations of the southeastern United States. *Anim Genet.* 43:53–62.
- Criscione A, Moltisanti V, Chies L, Marletta D, Bordonaro S. 2015. A genetic analysis of the Italian Salernitano horse. *Animal.* 9:1610–1616.
- Delgado JV, Martínez AM, Acosta A, Álvarez LA, Armstrong E, Camacho E, Canon J, Cortes O, Dunner S, Landi V, et al. 2012. Genetic characterisation of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Anim Genet.* 43:2–10.
- Druml T, Salajpal K, Dikic M, Urosevic M, Grilz-Seger G, Baumung R. 2012. Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programmes. *Genet Select Evol.* [Internet]. 44:5. Available from: <http://doi.org/10.1186/1297-9686-44-5>.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and programme for visualising STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resource.* 4:359–361.
- 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. 2000. *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. Roma: FAO.
- FAO. 2011. *Molecular genetic characterisation of animal genetic resources*. Roma. Available from <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.htm>
- Felicetti M, Lopes MS, Verini-Supplizi A, da Câmara Machado A, Silvestrelli M, Mendonca D, Distl O. 2010. Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds. *Anim Genet.* 41:53–55.
- Fernández Rodríguez C. 2010. *Zoarqueología: recuperación, muestreo y análisis*. In: López Díaz A, Ramil Rego E, eds. *Arqueología: ciencia e restauración*. Vilalba, Lugo, Spain: Museo de Prehistoria e Arqueología de Vilalba.
- Glowatzki-Mullis ML, Muntwyler J, Pfister W, Marti E, Rieder S, Poncet PA, Gaillard C. 2006. Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed. *Anim Genet.* 37:33–39.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a programme to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [Updated from Goudet (1995)]. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Granevitze Z, Hillel J, Chen GH, Cuc NTK, Feldman M, Eding H, Weigend S. 2007. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Anim Genet.* 38:576–583.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48:361–372.
- Jordana J, Ferrando A, Miró J, Goyache F, Loarca A, Martínez López OR, Canelon JL, Stemmer A, Aguirre L, Lara MAC et al. 2016. Genetic relationships among American donkey populations: insights into the process of colonisation. *J Anim Breed Genet.* 133:155–164.

- Langella O. 1999. Populations 1.2.31: a population genetic software. CNRS UPR9034; [cited 2012 Nov 10]. Available from <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Ling Y, Ma Y, Guan W, Cheng Y, Wang Y, Han J, Jin D, Mang L, Mahmut H. 2010. Identification of Y chromosome genetic variations in Chinese indigenous horse breeds. *J Hered.* 101:639–643.
- Luis C, Bastos-Silveira C, Cothran EG, Oom Mdo M. 2006. Iberian origins of new world horse breeds. *J Hered.* 97:107–113.
- MAGRAMA. 2016. Catálogo oficial de razas de ganado de España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; [cited 2016 Jan 26]. Available from: <http://origin.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/equino-caballar/marismena/default.aspx>.
- Marletta D, Tupac-Yupanqui I, Bordonaro S, Garcia D, Guastella AM, Criscione A, Canon J, Dunner S. 2006. Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *J Anim Breed Genet.* 123:315–325.
- Martínez A, Acosta J, Vega-Pla J, Delgado J. 2006. Analysis of the genetic structure of the canary goat populations using microsatellites. *Livestock Sci.* 102:140–145.
- Martínez AM, Delgado JV, Rodero A, Vega-Pla JL. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Anim Genet.* 31:295–301.
- Morais J, Oom MM, Malta-Vacas J, Luis C. 2005. Genetic structure of an endangered Portuguese semiferale pony breed, the Garrano. *Biochem Genet.* 43:347–364.
- Muñoz-Bort D. 2004. La Ganadería Caballar en la Villa de Almonte. Introducción Histórica. Almonte, Spain: Ayuntamiento de Almonte.
- Nei M, Tajima F, Tatenno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol.* 19:153–170.
- Nissen J. 1963. The young specialist looks at horses. London: Burke Publishing Co. Ltd.
- Nomura K, Ishii K, Dadi H, Takahashi Y, Minezawa M, Cho CY, Fauque MO, Nyamsamba D, Amano T. 2012. Microsatellite DNA markers indicate three genetic lineages in East Asian indigenous goat populations. *Anim Genet.* 43:760–767.
- Page RD. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12:357–358.
- Park SDE. 2001. The excel microsatellite toolkit. Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection [Ph.D. thesis]. Dublin, Ireland: University of Dublin; [cited 2011 Nov 5]. Available from: <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>.
- Pérez-Gutiérrez LM, De La Peña A, Arena P. 2008. Genetic analysis of the Hispano-Breton heavy horse. *Anim Genet.* 39:506–514.
- Peter C, Bruford M, Perez T, Dalamitra S, Hewitt G, Erhardt G. ECONOGENE Consortium. 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim Genet.* 38:37–44.
- Pritchard JK, 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 tests and ecumenicism. *J Hered.* 86:248–249.
- Rosenberg NA. 2004. DISTRUCT: a programme for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes.* 4:137–138.
- Royo LJ, Álvarez I, Beja-Pereira A, Molina A, Fernández I, Jordana J, Gómez E, Gutiérrez JP, Goyache F. 2005. The origins of Iberian horses assessed via mitochondrial DNA. *J Hered.* 96:663–669.
- Sotillo J, Serrano V. 1985. Producción animal I. Etnología zootécnica. Madrid: Ediciones Tebar Flores.
- Tozaki T, Mashima S, Hirota K, Miura N, Choi-Miura NH, Tomita M. 2001. Characterisation of equine microsatellites and microsatellite-linked repetitive elements (eMLREs) by efficient cloning and genotyping methods. *DNA Res.* 8:33–45.
- Vega-Pla JL, Calderón J, Rodríguez-Gallardo PP, Martínez AM, Rico C. 2006. Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Anim Genet.* 37:571–578.
- Warmuth V, Eriksson A, Bower MA, Cañon J, Cothran G, Distl O, Glowatzki-Mullis ML, Hunt H, Luis C, do Mar Oom M, et al. 2011. European domestic horses originated in two holocene refugia. *PLoS One.* [Internet]. 6:e18194. Available from: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018194>.
- Zuccaro A, Bordonaro S, Criscione A, Guastella AM, Perrotta G, Blasi M, D'Urso G, Marletta D. 2008. Genetic diversity and admixture analysis of Sanfratellano and three other Italian horse breeds assessed by microsatellite markers. *Animal.* 2:991–998.