

POSTER

ANÁLISIS DE MARCADORES GENÉTICOS EN UNA MUESTRA DE CABALLOS CRIOLLOS DEL URUGUAY

ANALYSIS OF GENETIC MARKERS IN A SAMPLE OF URUGUAYAN CRIOLLO HORSES

Kelly, L.¹, R. Gagliardi¹, R. Biagetti¹, A. Postiglioni¹ y D.F. De Andrés²

¹Área Genética. Departamento de Biología celular y molecular. Facultad de Veterinaria. Lasplaces 1550. CP 11600. Montevideo. Uruguay.

²Unidad Mixta CSIC-UCO *Marcadores Genéticos Moleculares*. Facultad de Veterinaria. Av. Medina Azahara, 9. 14005 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Grupos sanguíneos. Polimorfismos bioquímicos. Variabilidad genética de los caballos Criollos.

ADDITIONAL KEYWORDS

Blood groups. Biochemical Polymorphisms. Genetic Variability of the Criollo horses.

RESUMEN

En esta comunicación preliminar, presentamos la evaluación de las frecuencias alélicas obtenidas en 7 sistemas de grupos sanguíneos (A, C, D, K, P, Q y U) y 6 polimorfismos bioquímicos (A1B, Al, Es alcalina, Tf, PGD y PGM) en una muestra de 99 Caballos Criollos del Uruguay (CCU). Los sistemas más polimórficos fueron el sistema D, con 13 alelos siendo los más frecuentes: D^{deio}, D^{adi} y D^{dki}, y el *locus* Tf con 7 alelos siendo los más frecuentes: D y F₂.

Todos los sistemas electroforéticos se encontraron en equilibrio génico. La variabilidad genética de la muestra estudiada se estimó mediante el Índice de Heterocigosidad esperada, el cual presentó un valor de 0,435.

En la muestra analizada se destaca la presencia de la variante Tf^j y del alelo D^{dfgk}, marcadores característicos de la Pura Raza Española (PRE).

Se puede concluir que estos datos proporcionan información de que los Caballos Criollos Uruguayos conservan parte del potencial genético de sus ancestros, manteniendo carac-

terísticas propias y diferentes a la de los otros Caballos Criollos.

En cuanto a la variabilidad genética, a pesar de ser una muestra pequeña, presentó un índice de heterocigosidad bastante alto.

SUMMARY

The aim of this work is to characterize at least tentatively the Criollo Horses of Uruguay through blood genetic markers. This breed, whose origin goes back to horses brought to Rio de la Plata in 1538 from Spain, nowadays, after more than four centuries in its environment, owns unique zootechnical traits and well developed rusticity.

We have studied 7 systems of blood groups (A, C, D, K, P, Q and U) and 6 of biochemical polymorphisms (A1B, Al, Tf, alk-Es, PGD, PGM) in a sample of 99 Criollo Horses of Uruguay. The most polymorphic *loci* were the D blood group system with 13 alleles, D^{deio}, D^{adi} and D^{dki} being the 3 most frequent ones, and the Tf *locus*, that

displayed 7 alleles, D and F₂ having the highest frequency. The genetic variability of the sample was estimated through the average heterozygosity that reached a value of 0.435.

Concerning the origin of the breed, we have to stress the presence in our sample of Tf^J and D^{ofgk}, breed allele markers of the Spanish Pure Breed Horse.

We conclude from these results that the present days Criollo Horses of Uruguay have preserved some blood genetic traits of its ancestors that differentiate them from the other Criollo Horses, displaying at the same time an important amount of genetic variability as shown by the high value of average heterozygosity.

INTRODUCCIÓN

La determinación y el análisis de marcadores genéticos, como los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos, han permitido caracterizar la estructura, y la variabilidad genética intra e interpoblacional de las diferentes razas equinas. (De Andrés Cara, 1982; Rodríguez-Gallardo *et al.*, 1992; Ouragh *et al.*, 1994; Bowling, 1994).

El origen del caballo Criollo en América se remonta al año 1493 en el que llegan los caballos españoles a Santo Domingo. Específicamente los caballos Criollos del Uruguay y la Pampa argentina serían descendientes de los introducidos por Don Pedro de Mendoza en el Río de la Plata en 1538. (Dowdall, 1985). Esta raza de caballos de trabajo presenta cualidades zootécnicas únicas en América, debido a la incorporación en su caudal genético de la rusticidad producida por un proceso de 400 años de selección natural a la que se suman 100 años de cría dirigida por criadores organizados con normas

fundamentadas, registrándose desde el año 1929 en la Asociación Rural del Uruguay (ARU). Ese amplio caudal genético que le ha permitido adaptarse a diferentes ambientes se ve reflejado en su gran variabilidad de capas (28 variedades) (Dowdall, 1985). Por lo tanto es de gran importancia conocer y conservar su diversidad genética como patrimonio genético del país.

Los estudios poblacionales realizados hasta la fecha en Caballos Criollos americanos han considerado sólo algunos marcadores sanguíneos como los polimorfismos bioquímicos Al, Tf, Pi, A1B y Es (Peral García *et al.*, 1996), o el sistema D de grupos sanguíneos (Bowling y Williams, 1991).

El objetivo del presente trabajo es, aunque sea de forma preliminar, caracterizar genéticamente los caballos Criollos del Uruguay mediante 13 marcadores genéticos, analizar su similitud con posibles razas ancestrales y estimar su variabilidad genética, lo cual constituye un aporte al conocimiento de la raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la tipificación sanguínea de una muestra de 99 Caballos Criollos del Uruguay de pedigrí, inscritos desde 1929 en la Asociación Rural del Uruguay (ARU), pertenecientes a establecimientos de los Departamentos de Tacuarembó y Rocha. El número total de la población de Caballos Criollos en el Uruguay se estima que es aproximadamente 16.000 y la cantidad de crías inscritas el presente año es de 2500 (Stud book de la ARU).

Se testaron 7 sistemas de grupos

sanguíneos con una batería de 27 reactivos (Aa, b, c, g; Ca; Da, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l, n, o; Ka, Pa, b, c, d; Qa, b, c; Ua) contrastados internacionalmente (ISAG, 1995/96). La tipificación sanguínea se realizó mediante las técnicas estándar de hemaglutinación y de hemólisis mediada por complemento. Para la determinación de los sistemas proteicos A1B glicoproteína (AQ1B), albúmina (Al), esterasa (Es) alcalina y transferrina (Tf) se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida descrita por Juneja *et al.* (1978) y para las enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) y fosfoglucomutasa (PGM) la técnica de Bengtsson y Sandberg (1973).

La caracterización genética de la raza se hizo mediante la determinación de los fenogrupos específicos de la raza por análisis de segregación de factores sanguíneos en familias y el cálculo de las frecuencias génicas en los 13 sistemas. Éstas se estimaron con los siguientes métodos: recuento de genes para los sistemas bioquímicos, método de alocación de Neimann-Sorensen (1956) para los grupos sanguíneos complejos y el método de la raíz cuadrada para los sistemas simples.

La diversidad intrapoblacional se estimó a través del índice de Heterocigosis media esperada (Guérin y Mériaux, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se muestran las frecuencias génicas de los 13 sistemas tipificados junto con la de los marcado-

res genéticos descritos en otras razas relacionadas históricamente con el Criollo del Uruguay, como el Pura Raza Española (PRE) y el Berberisco (Be), y otras razas americanas como Paso Fino (PF), Paso Peruano (PP), Criollo Argentino (CCA) y Criollo Chileno (CCH), con el fin de discutir las similitudes presentadas.

Los alelos más frecuentes en la población estudiada: PGD^F, PGM^S, Es^I, A1B^K, K⁻, U⁻, P⁻ y Q⁻, también lo fueron para las razas PRE, PP, PF y Be. Se observó una distribución diferente de las frecuencias en el sistema albúmina siendo levemente más frecuente el alelo Al^A en CCU (0,522), CCA (0,515) y PRE (0,517). En cambio el alelo Al^B es más frecuente en las razas PP (0,725), PF (0,598) y Be (0,7).

En el sistema C de grupos sanguíneos el alelo más frecuente en nuestra muestra fue el C^a (**tabla I**: 0,611) al igual que lo observado en las razas PP (0,735) y Be (0,62).

Con respecto a aquellos sistemas polimórficos que presentan alelos marcadores de raza y que aportan información en cuanto al posible origen de los CCU, podemos resaltar:

a) En el sistema D se observaron 13 alelos diferentes siendo los más frecuentes: D^{de10} (0,339), D^{ad1} (0,211) y D^{dk1} (0,149). En el estudio realizado por Bowling y Williams (1991) del sistema D se describen 6 fenogrupos que están presentes en las 26 razas estudiadas. Los 3 alelos tan frecuentes en el CCU se encuentran entre esos 6 fenogrupos por lo tanto no se pueden considerar una característica específica de la raza, pero quizás su distribución aporta datos interesantes, como lo es la alta frecuencia del alelo D^{de10}.

Tabla I. Frecuencias génicas de los grupos sanguíneos pertenecientes a las siguientes razas equinas: Criollo Uruguayo, Criollo Argentino (CCA), Criollo Chileno (CCH) (Peral et al., 1996; Bowling y Williams, 1991), Paso Fino (PF), Paso Peruano (PP) (Bowling y Clark, 1985), Pura Raza Española (PRE) (Rodríguez-Gallardo et al., 1992) y Berberisco (Be) (Ouragh et al., 1994). (Gene frequencies of blood groups for the following equine breeds: Criollo Uruguayo, Criollo Argentino (CCA), Criollo Chileno (CCH) (Peral et al., 1996; Bowling y Williams, 1991), Paso Fino (PF), Paso Peruano (PP) (Bowling y Clark, 1985), Pura Raza Española (PRE) (Rodríguez-Gallardo et al., 1992) and Berberisco (Be) (Ouragh et al., 1994)).

Sistemas y alelos	CCU	CCA	CCH	FP	PF	PRE	Be
A a	0,338	NT*	NT	0,321	0,263	0,126	0,33
ag	0,214			0,214	0,233	0,208	0,20
abg	0,016			-	-	-	-
bc	0,021			0	0,014	0,007	-
b	0,126			0,065	0,144	0,128	0,09
c	0,017			0,004	0,042	0,039	0,09
-	0,269			0,396	0,304	0,492	0,29
C a	0,611	NT	NT	0,735	0,369	0,433	0,62
-	0,389			0,265	0,631	0,567	0,38
D adl	0,211	0,04	0,04	0,14	0,08	0,038(adl+	0,01
adln	0,032	0,07	0	+	+	adln)	0,02
bc	0,025	0,03	0,14	0,15	0,20	0,054	0,15
cegin	0,010	0	0,06	+	0,02	0,007	0,19
cefg	0	0	+	0,12	0,04	0,046	0
cfgk	0,005	0	0	0	+	0,053	0,01
cg	0,081	0,07	0,08	0,08	0,12	0,074	0,11
dekl	0,005	0,03	0,03	0	0,01	0	0,01
delo	0,339	0,59	0,07	0,04	0,12	0,296(delo+	0,20
del	0,019	0	0,05	0,06	0,01	del)	0,04
dl	0,023	0	0,01	0,03	0,03	0	0
dln	0	0	0	0	0	0	0,04
dfkl	0,005	0,02	0,09	0,08	0,08	0,252	0,01
dgh	0,096	0,06	0,08	0,01	0,08	0,044	0,05
dki	0,149	0,09	0,35	0,29	0,20	0,137	0,17
K a	0,036	NT	NT	0,025	0,001	0,002	0,02
-	0,964			0,975	0,999	0,998	0,93
P a	0	NT	NT	0,20(a+	0,307(a+	0,018	0,028(a+ac
ac	0,126			ac+acd+	ac+acd+	0,037	+acd+ad)
acd	0,006			ad)	ad)	0,017	
ad	0,012					0,421	
b	0,035			0,02(b+	0,069(b+	0,020	0,04(b+bd)
bd	0,006			bd)	bd)	0	
d	0,094			0,78(d+-)	0,624(d +	0,002	0,068 (d+-)
-	0,722			-)	0,486		
Q abc	0,013	NT	NT	0,02	0,076	0,112	0,07
ac	0,101			0	0	0,007	0
b	0,290			0,219	0,082	0,104	0,09
c	0,192			0,250	0,210	0,258	0,22
-	0,403			0,510	0,632	0,519	0,62
U a	0,424	NT	NT	0,329	0,347	0,441	0,31
-	0,576			0,671	0,653	0,559	0,69

MARCADORES GENÉTICOS EN CABALLOS CRIOLLOS DEL URUGUAY

Tabla I. (continuación). Frecuencias génicas de los polimorfismos proteicos. (Gene frequencies of protein polymorphisms).

Sistemas y Alelos	CCU	CCA	CCH	PP	PF	PRE	Be
AIB			NT				
F	0,934 (F+	-		0,005	0,017	0,031	-
K	K)	0,845		0,780	0,896	0,919	0,91
S	0,066	0,155		0,215	0,087	0,050	0,09
Al			NT				
A	0,522	0,515		0,275	0,402	0,517	0,30
B	0,478	0,485		0,725	0,598	0,483	0,70
Es			NT				
F	0,144 (F+	0,020		0,125	0,056	0,027	0,07
G	G)	0,335		0,240	0,178	0,267	0,15
H	0,839 (H	0,017		0	0,023	0,021	0,02
I	+))	0,628 (1+		0,465	0,701	0,675	0,71
S	0,017	S)		0,170	037	0,009	0,03
L							0,01
N							0,01
O					0,005		
PGD		NT	NT				
F	0,947			0,725	0,867	0,884	0,87
S	0,053			0,275	0,127	0,116	0,13
D	0			0	0,006	0,001	0
PGM		NT	NT	0,136	0,133	0,080	0,09
F	0,148			0,864	0,867	0,920	0,91
S	0,852			0	0		
V	0						
Tf			NT				
D(D+D2+ E+A)	0,494	0,335		0,295	0,271	0,375	0,32
Fl	0,073	0		0	0	0,003	0,02
F2+F3	0,298	0,343		0,225	0,242	0,316	0,36
H	0,047	0,164		0,155	0,210	0,185	0,11
J	0,012	0,021		0	0,011	0,017	0
M	0	0		0	0	0	0,01
O	0,041	0,095		0,195	0,154	0,051	0,13
R	0,035	0,033		0,110	0,112	0,053	0,07

NT: Sin testar.

+ Frecuencia menor a 0,005.

- Sin determinar en la muestra

Este alelo se encuentra también con alta frecuencia en: PRE, 0,296 (Rodríguez-Gallardo *et al.*, 1992), en CCA, 0,59 (Bowling y Williams, 1991) y en Be, 0,20 (Ouragh *et al.*, 1994). En cambio el alelo D^{adi} presentó una fre-

cuencia alta solamente en PP (0,14). Es de resaltar la presencia del alelo D^{cf^{gk}} (0,005) en nuestra muestra siendo específico del PRE, del Be y de razas derivadas de ellas como el PF. En las demás razas americanas como

CCA y CCH está ausente. Otro alelo de interés en el CCU es D^{dekl} el cual se encuentra, según Ouragh *et al.* (1994), en razas que han estado históricamente ligadas al Be. Con respecto a la presencia este alelo en el PRE, Rodríguez-Gallardo *et al.* (1992) no lo observa en una muestra de 1028 individuos, sin embargo en el trabajo realizado por Bowling y Williams (1991) en 185 individuos está presente con una frecuencia muy baja (<0,005). Podría explicarse la casi ausencia en el actual PRE y la presencia en el CCU teniendo en cuenta que probablemente aquél sea diferente al caballo español que llegó a América durante la conquista y que a partir de ese momento se habría producido una divergencia entre las dos poblaciones. De acuerdo a Prado (1940) el Be tuvo gran influencia en la formación del caballo español de la época de la conquista y Cabrera (1945) considera que ese caballo antiguo fue desapareciendo por cruzamientos. De esta manera es posible que el alelo D^{dekl} desapareciera al encontrarse con baja frecuencia en el PRE, como en el actual Be (0,01) (Ouragh *et al.*, 1994), aunque se transmitiera a la población Criolla durante su introducción a América. Esto coincidiría con el trabajo realizado en el CCA por Peral *et al.* (1996) en el cual encontró una correlación mayor con los Be, concluyendo que existe una mayor relación de los Be en el Criollo Argentino que el actual PRE.

Comparando el sistema D con el del CCH (único sistema en el que se pudo comparar) observamos una distribución bastante diferente de los alelos sobre todo del D^{delo} (0,07; Bowling y Williams, 1991) y la ausencia de: D^{adln},

D^{efgk} lo cual estaría de acuerdo con la historia de aislamiento geográfico de la población, la llegada al continente por otra vía (Centroamérica y Perú) así como el de encontrarse sus libros genealógicos cerrados a la inscripción de los otros Caballos Criollos Americanos (Director Registros Genealógicos ARU, comunicación personal).

b) El *locus* Tf presentó 7 alelos, siendo los más frecuentes: D (0,494) y F₂ (0,298) al igual que en las otras razas con las que se hizo la comparación. Se destaca la presencia de la variante J (0,012), marcador genético propio del PRE (Kaminski y de Andrés, 1986), y de las razas que derivan de ella como el PF y el CCA. Es de destacar que esa variante no se encuentra en la muestra de Be analizada por Ouragh *et al.* (1994) ni por Kaminski (1982).

Los sistemas electroforéticos se encontraron en equilibrio génico, según se puede ver en la **tabla II**. Los análisis estadísticos de las frecuencias génicas nos permiten aceptar la hipótesis nula de equilibrio génico en los 6 sistemas proteicos.

Tabla II. Test de equilibrio génico para los sistemas electroforéticos. (Test of gene equilibrium for the electrophoretic systems).

Sistemas	χ^2	Probabilidad*
AI	0,037	>0,85
PGD	0,297	>0,50
PGM	1,158	>0,25
Es	4,44	>0,20
A1B	0,188	>0,65
Tf	5,286	>0,99

*Nivel de significación 0,05.

MARCADORES GENÉTICOS EN CABALLOS CRIOLLOS DEL URUGUAY

Tabla III. Índice de Heterocigosidad para: CCA, PP, PF (Bowling, 1994), PRE (Rodríguez-Gallardo et al., 1992) y Be (Ouragh et al., 1994). (Average heterozygosity for: CCA, PP, PF (Bowling, 1994), PRE (Rodríguez-Gallardo et al., 1992) y Be (Ouragh et al., 1994)).

	CCU	CCA	PP	PF	PRE	Be
Nº loci	13	19	19	19	16	16
I.H.M	0,435	0,410	0,437	0,433	0,457	0,414

Se determinó la variabilidad genética de la población estudiada mediante el cálculo del Índice de Heterocigosidad esperada (IH), siendo su valor de 0.435 (**tabla III**). De acuerdo con Bowling (1994) el rango de heterocigosidad presentado para razas equinas domésticas va de 0,295 a 0,443. El valor presentado en nuestra muestra es bastante elevado, acorde con el de las demás razas con las que se está haciendo la comparación, el cual va de 0,410 para el CCA (Bowling, 1994) a 0,457 para PRE (Rodríguez-Gallardo et al., 1992).

El menor IH en el CCA asociado a la ausencia de los alelos D^{cegin} , D^{cfigk} , D^{del} y D^{dl} , indica que existe menor variabilidad genética en dicha población que en el Criollo Uruguayo. Esto estaría de acuerdo con la historia de la raza. Con respecto a ello Dowdall

(1985) narra que después de la decadencia de la raza Criolla se conservaron puras unas pocas *castas*, comenzándose una nueva cría, realizada por E. Solanet, que se impuso sobre la mayoría de las cabañas, hasta tal punto que al CCA se le pasó a llamar *Los Criollos de Solanet*. Desde el punto de vista poblacional esto puede ser considerado *un cuello de botella*.

Resumiendo, la presencia en el CCU de marcadores específicos de la raza Andaluza (Tf^j y D^{cfigk}) y con una frecuencia apreciable, mostraría la influencia de esta raza en la formación del Criollo Uruguayo. Trabajos adicionales considerando un mayor número de individuos y de sistemas genéticos permitirán confirmar la validez de estos resultados, así como establecer cálculos fiables de distancias genéticas con sus raza parental, con los demás Criollos americanos y con las otras razas descendientes del español.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr.M.V.Fernando Vila por el asesoramiento prestado, a la Sociedad de Caballos Criollos del Uruguay, al establecimiento *Los Apamates* y al Servicio de Veterinaria y Remonta (Los Cerrillos) por su colaboración.

Financiación: PEDECIBA, C.S.I.C. y P022 BID/CONICYT.

BIBLIOGRAFÍA

Bengtsson, S. and K. Sandberg. 1973. A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. *Anim. Blood*

Grps. Biochem. Genetics, 4: 83-87.

Bowling, A.T. and R.S. Clark. 1985. Blood group

- and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in the United States. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genetics*, 16: 93-108.
- Bowling, A.T. and M.J. Williams. 1991. Expansion of D system of horse red cell alloantigens. *Anim. Genetics*, 22: 361-367.
- Bowling, A.T. 1994. Population genetics of Basin feral horses. *Anim. Genetics*, 25: 67-74.
- Cabrera, A. 1945. Caballos de América. Ed. Sudamericana. Buenos Aires.
- De Andrés Cara, D.F. 1982. Pura Raza Española de caballos: Comparación con otras razas mediante sus polimorfismos enzimáticos sanguíneos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. pp 236.
- Dowdall, R.C. 1985. Criando Criollos. Ed. Hemisferio Sur. S.A. Buenos Aires pp 409.
- Guérin, G. and J.C. Mériaux. 1986. La distribution des marqueurs sanguins dans les races equines. Analyse sur un échantillon de Pur-sang, Trotteur Français et Selle Français. 12ème Journée d'Étude du Cheval. CEREOPA. pp 13.
- Juneja A.K., B. Ghane and K. Sandberg. 1978. Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genetics*, 9: 29-36.
- Kaminski, M. and D.F. de Andrés Cara. 1986. Electrophoretic markers of Andalusian Horses: Comparison of Spanish and Lusitanian lineages. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83: 575-578.
- Kaminski, M. 1982. Genetic Structure of populations of horses based on distribution of Hemotypes. *Bioch. System. Ecol.*, 10: 377-385.
- Neiman-Sorensen, A. 1956. Blood groups and breed structure as exemplified by three Danish breeds. *Acta. Agr. Scand.*, 6: 115.
- Ouragh, L., J-C. Mériaux and J-P. Braun. 1994. Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Morocco. *Anim. Genetics*, 25: 45-47.
- Peral Garcia, P., M.E. Kineast, E.E. Villegas, S. Diaz y F.N. Dulout. 1996. Estudio de relaciones genéticas entre razas equinas mediante el análisis multivariado. *Agro Sur*, 24: 39-47.
- Prado, U. 1940. El caballo chileno. Santiago de Chile.
- Rodríguez-Gallardo, P.P., P. Aguilar Sánchez, J.L. Vega Pla y D.F. de Andrés Cara. 1992. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for the Andalusian horse breed. A comparison with four American horse breeds. *Arch. Zootec.*, 41: 433-442.