

ISBN 970-27-1045-6

SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES (DNA) PARA EL COLOR DEL PELAJE NEGRO EN CABALLOS PURA RAZA ESPAÑOLA

Ayala-Valdovinos Miguel Angel¹, Anguiano-Estrella Rubén³, Plascencia-Botello Jorge², Galindo-García Jorge¹, de la Peña-Topete Javier⁴, Villagómez-Zavala, Daniel¹, Sánchez-Chiprés David¹, Schweminski-Benítez Sergio Luis¹, Taylor-Preciado Juan de Jesús¹, Guerrero-Quiroz Luis Alfonso¹, Merlos-Barajas Miguel¹, Topete-Uribe Ricardo³, Duifhuis-Rivera Theodor¹.

Resumen

Por medio del análisis molecular (PCR), utilizando oligonucleótidos iniciadores para el gen Extensión, fueron identificados los genotipos para este gen en caballos Pura Raza Española, (P.R.E.), los cuales fueron animales procedentes de España. El análisis de PCR fue desarrollado y verificado usando DNA genómico de animales de genotipo conocido (controles) y aplicado a nueve caballos P.R.E. El producto de PCR-RFLP fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio permitiendo identificar los tres genotipos para este gen, homocigótico dominante (E/E), heterocigótico (E/e), así como homocigótico recesivo (e/e). El presente trabajo demuestra la utilidad del análisis molecular para identificar el genotipo del gen Extensión, haciendo énfasis en su aplicación práctica para dirigir la selección a favor o en contra del fenotipo pelaje negro de los caballos P.R.E.

Introducción

Para algunos criadores el color del pelaje de los caballos ha sido algo más que un detalle estético e incluso en muchas culturas han atribuido características específicas a los caballos de ciertos colores, por ejemplo, en la época (S. XVI) en la que estaba en formación el caballo Pura Raza Española (P.R.E.), existía la creencia de que había una correlación entre la capa de los caballos y su carácter, atribuyéndose a la **capa torda** el **carácter noble**, a la **castaña** el carácter **fogoso y temperamental** y a la **alazana** el carácter **colérico**. Con lo que respecta a la capa negra en el caballo P.R.E., entre los factores que llevaron a su casi desaparición, debe de considerarse el hecho del uso de animales negros para tirar de los carruajes fúnebres, lo que determinó que esta capa fuera asociada y sólo buscada para estos actos.

¹Instituto de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, ² Departamento de Medicina Veterinaria, División de Ciencias Veterinarias, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km. 7.5 Carretera a San Isidro Mazatepec, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. ³ Centro Equino Los Alamitos, ⁴ Clínica para Equinos Las Piedras.
Tel y Fax: (33) 37-96-40-73. e-mail: manayala@cucba.udg.mx

La capa negra en el caballo P.R.E. fue relativamente frecuente en el pasado de la raza, Altamirano (1999), refiere que en el registro de la yeguada de la Cartuja de Jerez del año 1747, el 30% de los ejemplares eran de esta capa, y en el de sementales de este mismo municipio en el año 1799, la capa negra representaba el 16%. Con lo que respecta a la capa torda en el P.R.E. desde el origen de la raza y hasta la actualidad, ha sido una capa predominante, en el año 1567 las reales caballerizas de Córdoba del rey Felipe II, se estructuraron con animales de capa torda por su supuesta mayor nobleza, posteriormente, en el registro de caballos españoles de 1765 más del 72.7% eran ejemplares tordos (Altamirano, 2001).

En el censo del caballo P.R.E. para el periodo comprendido entre 1900 y 1991 se tiene registrado el color de la capa para 36,848 animales, en el siguiente orden: capa torda 27,014 (73.311%), castaña 8,747 (23.738%), negra 694 (1.883%), alazana 315 (0.854%), baya 28 (0.075%), blanca 19 (0.051%), ruana 15 (0.040%), overa 12 (0.032%), Isabela 4 (0.010%) y pía 0 (0.0%) (García Martínez *et al.* 1998).

En la actualidad y a pesar del fuerte incremento en el número de cuadras de caballos de capa castaña y negra, la torda, continua siendo la capa predominante en la raza P.R.E. representando entre el 60% y el 70%. Mas aun, es conocido que los ejemplares de capa torda han sido y continúan siendo de una calidad media superior al resto de las capas, desde el punto de vista de la genética su explicación radica en que se seleccionó al caballo P.R.E. pensando en un único pelaje, el tordo, lo que hace factible disponer de más animales base para la fuente de selección y cruzamiento, sin embargo, con una adecuada asesoría genética y con el uso de técnicas moleculares (DNA) para identificar las variantes alélicas de los genes que determinan el color del pelaje en los caballos, es posible obtener animales de capa negra de excelente calidad genética, pudiendo incluso obtener estos animales (negros) a partir del cruzamiento entre progenitores de capa torda.

Un principio fundamental para el entendimiento del color de las capas del caballo es que el color del pelaje es debido a la presencia del pigmento melanina en el pelo. Químicamente existen dos tipos básicos de melanina responsables de todos los colores en los mamíferos (incluidos los caballos). Uno de estos pigmentos es la eumelanina, la cual es responsable del pelaje negro. El otro pigmento es la phaeomelanina la cual produce pigmentos en el rango del rojo pardo al amarillo marrón. La bioquímica de la producción de pigmento en el caballo es homologa a la de otras especies (Klungland *et al.*, 1995; Valverde *et al.*, 1995 y Andersson, 2003).

Muchos caballos tienen áreas de ambos pigmentos (eumelanina y phaeomelanina) siendo así combinaciones de negro y rojo-amarillo. El pelo blanco resulta de una ausencia de gránulos de pigmento, siendo éste en esencia pelo sin color. En tanto que la piel que carece de gránulos de pigmento es característicamente rosa y obtiene este tono debido la presencia de la pequeña cantidad de sangre en sus vasos sanguíneos superficiales.

Los melanocitos pueden producir phaeomelanina o eumelanina. El pigmento que se producirá depende de la interacción entre los componentes del sistema regulador de síntesis de pigmentos conformado por: **a)** la hormona melanocortina u hormona estimulante de los

melanocitos (**MSH**, del inglés *melanocyte stimulating hormone*), la cual es elaborada por la hipófisis, glándula endocrina situada en la base del cerebro; **b**) el receptor de la MSH conocido como **MSH-R** (del inglés *melanocyte stimulating hormona receptor*) o **MC1R** y **c**) la **proteína Agutí**. La unión de la MSH al MC1R estimula a la enzima tirosinasa favoreciendo la ruta metabólica para la síntesis de eumelanina, mientras que la unión de la proteína Agutí actúa como antagonista inhibiendo la señal de transducción por bloqueo de la acción melanocortina del MC1R y es favorecida la ruta alternativa de síntesis de pheomelanina (Robbins *et al.*, 1993; Klungland *et al.*, 1995).

El receptor **MC1R** es una proteína de membrana determinada por el locus llamado “**Extensión**”. Algunas mutaciones en este locus han sido asociadas a cambios en el color del pelaje en el ratón, bovino y humano, en el caso del caballo la mutación conocida como “negro dominante”, produce una activación del receptor y el resultado es un fenotipo totalmente eumelánico (negro), otras mutaciones como la llamada “chestnut”, resultan en una total inactivación del receptor el cual resulta ser incapaz de responder a la MSH y el resultado será un fenotipo completamente pheomelánico (rojo) (Robbins *et al.*, 1993; Klungland *et al.*, 1995; Valverde *et al.*, 1995).

Una vez que el pigmento es sintetizado, este se localiza dentro de pequeños paquetes llamados melanosomas, los cuales luego son removidos desde los melanocitos hasta circundar las células del pelo y la piel. El empaquetamiento y distribución de los melanosomas están sujetos a cambios, los cuales pueden resultar en diferentes aspectos del color final. Estos cambios están bajo control genético en otros *loci* diferentes a el *locus* Extensión y a el *locus* Agutí.

Material y métodos

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología Animal del Departamento de Producción Animal de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Se analizaron nueve caballos Pura Raza Español (P.R.E.) color negro, procedentes de cuadras del estado de Jalisco, los cuales en su totalidad (100%) fueron animales importados de España. Se obtuvo DNA genómico a partir de muestras de sangre completa siguiendo protocolos estándares (Ayala-Valdovinos *et al.*, 2003).

De acuerdo a los datos de secuencia del DNA para el gen MC1R del caballo (*Equus caballus*), se seleccionaron dos oligonucleótidos iniciadores para seguir un protocolo estándar donde 100ng de DNA fueron amplificados en una reacción de 100 l, conteniendo 100 pmol de cada iniciador, 200 M de dNTPs, y 2.5 U de taq polimerasa. Los ciclos de amplificación se realizaron en un termociclador, con 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 50 segundos, alineación a 60°C por 50 segundos y polimerización a 72°C por 50 segundos.

Resultados y discusión

El análisis molecular (PCR-RFLP) permitió la amplificación de fragmentos de DNA genómico correspondiente al gen del MC1R de los equinos control y estudio. Del producto de PCR se obtuvieron los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (**RFLP**, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) donde se observaron patrones de bandeo específico para los genotipos del gen MC1R del caballo (E/E, homocigótico dominante; E/e, heterocigótico; y e/e, homocigótico recesivo).

El gen Extensión se encontró en el 100% de los animales P.R.E. genotipificados (**Figura 1**). Los nueve caballos P.R.E. analizados fueron homocigóticos dominantes para el gen Extensión (E/E). De manera consecuente fueron genotipificados estos mismos animales para el gen Agutí, del cual se conoce la asociación de la condición homocigótica recesiva (a/a) de este gen con el gen Extensión en condición dominante (E/E o E/e) para que se exprese el fenotipo de pelaje negro. El genotipo identificado tras el análisis del gen de Extensión y Agutí fue de E/E a/a en el 100% de los animales estudiados.

Dado que un caballo con pelaje negro puede poseer un genotipo homocigótico dominante (E/E) o heterocigótico (E/e). En las razas donde el pelaje negro es apreciado por algunos criadores, como en los caballos Pura Raza Española, a través de un sistema de selección y cruzamiento, **los animales que son puros (homocigóticos) para el alelo E (E/E) siempre transmitirán una copia del alelo E a sus potros y nunca producirán un potro alazán**. Así pues, esta prueba molecular resulta imprescindible para establecer un rancho especializado en caballos P.R.E. con pelaje negro en donde primeramente resulta obligado realizar las pruebas para el gen del pelaje negro (gen Extensión) en los animales con que cuente el criadero así como en los que se compren en el futuro, posteriormente es requerida la asesoría de un genetista que pueda realizar un sistema de selección y cruzamiento a favor del pelaje negro. Con lo anterior el genetista puede obtener nacimientos de potros con pelaje negro incluso a partir de pie de cría con pelaje castaño o con pelaje tordo.



Figura 1. Sementales Pura Raza Española con **valor agregado** respecto al gen del pelaje negro al resultar **puros (E/E homocigóticos) para el gen del pelaje negro (gen Extensión)**. Genotipo obtenido mediante prueba de DNA en el Instituto de Biotecnología Animal de la Universidad de Guadalajara.

Conclusiones

1. La técnica molecular PCR-RFLP permitió identificar el genotipo para el gen del MC1R en nueve caballos Pura Raza Española, importados a México y procedentes de yegadas de España.
2. El presente trabajo establece la utilidad del análisis molecular para el diagnóstico preciso y oportuno del gen Extensión en caballos negros, haciendo énfasis en la importancia del diagnóstico molecular (PCR) como una medida imprescindible para dirigir los cruzamientos a favor o en contra del fenotipo negro del pelaje de los caballos.

Literatura Citada

1. Altamirano JC. Historia de los caballos cartujanos. Autor Editor, 2 Ed. 1999.
2. Altamirano JC. Historia y origen del caballo español. Ed. Autor Editor, 3 Ed. 2001.
3. Andersson L. Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig, and chicken. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;994:313-8.
4. Ayala-Valdovinos MA, Villagómez, DAF, Galindo-García J, y Sánchez-Chiprés DR. Diagnóstico molecular (PCR-RFL) de parálisis periódica hipercaliémica equina. XXV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos, A. C. Octubre 8-11 de 2003:141-144. México.
5. García Martínez A, Varela Córdoba M, Molina Alcalá A y Rodero Franganillo A. Estudio genético de la capa dentro de la caracterización racial equina. *Arch. Zootec.* 1998;47:247-253.
6. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome.* 1995;6:636-9.

7. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 1993;72:827-34.
8. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 1993 26;72:827-34.
9. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*. 1995;11:328-30.