

DIVERSIDAD GENÉTICA DE 12 *LOC*/MICROSATELITALES UTILIZADOS EN PRUEBAS DE PATERNIDAD EQUINA EN CHILE

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN 12 MICROSATELLITE *LOC*I, USED IN EQUINE PATERNITY TEST IN CHILE

Paredes, M.^{1*}, M.C. Norambuena² y B. Molina¹

¹Departamento de Ciencias Básicas. Universidad de La Frontera. Av. Francisco Salazar 01145. Temuco. Chile.

²Departamento de Ciencias Animales. Pontificia Universidad Católica. Av. Vicuña Mackenna 4860. Santiago. Chile.

*Fono-fax: 56-45-325224. E-mail: mparedes@ufro.cl

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Caballo chileno.

ADDITIONAL KEYWORDS

Chilean horse.

RESUMEN

Se investigó la diversidad genética de 12 *loci* microsatelitales (HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, AHT4, AHT5, VHL20, ASB2, HTG7 y HTG10) utilizados en pruebas de filiación equina en Chile en una muestra poblacional de 45 caballos Criollos chilenos por medio del contenido de información polimórfica, heterocigosis y exceso o déficit de heterocigotos. Además, se estimó la probabilidad de exclusión de paternidad por *locus* y general considerando los 12 *loci*. Los resultados indican que la variabilidad genética de los microsatélites analizados es significativamente elevada en la población estudiada. Todos los *loci* analizados resultaron polimórficos. El número de alelos por *locus*, varió entre 4 y 10. La heterocigosis esperada promedio (H_e), considerando todos los *loci*, fue de 0,76, con un rango que osciló entre 0,52 y 0,88. El promedio de la heterocigosis observada (H_o) sobre el conjunto de todos los marcadores fue de 0,65. La probabilidad de exclusión de paternidad por *locus* osciló entre 14 a 59%. Al considerar los 12 *loci* en conjunto, la exclusión de paternidad se puede atribuir con 99,7% de certeza.

SUMMARY

The genetic diversity of equine microsatellite *loci* HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, AHT4, AHT5, VHL20, ASB2, HTG7 and HTG10

was investigated in a population of Chilean Creole horses by means of parameters such as: the polymorphic information content, heterocigosity and excess or deficit of heterocigotes. In addition, the probability of paternity exclusion was considered. The results indicated that the genetic diversity of these markers was significantly high in the studied population. All markers analyzed were polymorphic. The number of alleles per *locus*, varied between 4 (HMS10) to 10 (HTG10). The expected average heterocigosity (H_e) considering all *loci* simultaneously, was 0.76 ranging from 0.52 to 0.88. The average observed heterocigosity (H_o) for all the markers was 0.65. The paternity exclusion probability per *locus*, oscillated between 14 and 59%. The power paternity exclusion considering the 12 *loci* was 99,7%.

INTRODUCCIÓN

El tipo de grupo sanguíneo y los polimorfismos bioquímicos se han utilizado para la certificación de filiación tanto en humanos como animales de interés pecuario (De Andrés Cara, 1982; Bowling y Clark, 1985; Oltra *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 2002). Sin embargo, la tendencia actual es la utilización de diversos tipos de marcadores de ADN (Giovambattista *et al.*, 2001; Arangu-

Recibido: 1-3-07. Aceptado: 17-9-08.

Arch. Zootec. 58 (221): 111-116. 2009.

ren-Méndez *et al.*, 2001). Entre los marcadores moleculares de mayor utilidad se encuentran los microsatélites, los cuales están formados por secuencias nucleotídicas de entre dos a seis pares de bases que se repiten un número variable de veces dentro de una disposición en *tandem* flanqueada por secuencias no repetitivas (Tautz, 1989). El alto nivel de variación en el número de repeticiones genera una alta diversidad alélica, encontrándose entre 2 a 25 alelos por *locus*, con niveles de heterocigosis que fluctúan entre el 30 y 90% (Waldbieser y Bosworth, 1997; Hancock, 1999). Estas características, además de la herencia mendeliana y expresión codominante de los microsatélites (Chambers y MacAvoy, 2000), permiten su utilización en la resolución de la filiación con una probabilidad cercana al 100% (Aranguren-Mendez *et al.*, 2001).

Los *loci* microsatelitales equinos, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7 (Guerin *et al.*, 1994), HTG4, HTG6 (Ellegren *et al.*, 1992), AHT4, AHT5 (Binns *et al.*, 1995), VHL20 (Van Haeringen *et al.*, 1994), ASB2 (Breen *et al.*, 1997), HTG7, HTG10 (Marklund *et al.*, 1994), han sido validados en cuanto a sus características hereditarias, diversidad alélica, polimorfismo y rango de tamaño de sus alelos, como marcadores adecuados para pruebas de filiación equina (Ellegren *et al.*, 1992; Bowling *et al.*, 1997).

La efectividad de estos marcadores en pruebas de filiación requiere conocer los parámetros de diversidad genética específicos de la población, lo cual permite asignar parentesco genético con mayor exactitud (Jamieson y Taylor, 1997). El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de estos marcadores en caballos Criollos chilenos por medio de parámetros estimativos como, el contenido de información polimórfica (Botstein *et al.*, 1980), la heterocigosis (Ott, 1992) y el exceso o déficit de heterocigotos y determinar la probabilidad de exclusión de paternidad por *locus* y general considerando los 12 *loci*, utilizados de acuerdo a Jamieson y Taylor, (1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó ADN extraído de muestras de pelo de 45 caballos procedentes de diferentes planteles ubicados entre la VIII y X región del sur de Chile, inscritos en los registros genealógicos de la raza Caballo Chileno del Servicio Nacional de Agricultura.

El ADN se extrajo a partir de bulbos pilosos obtenidos según la metodología descrita por Suenaga y Nakamura, (2005). Para esto, se introdujeron cinco pelos en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, cuidando que las raíces quedaran ubicadas en el fondo del tubo, luego se agregaron 150 μ l de Chelex-100 5% (Bio Rad, Richmond, USA) y 10 μ l de proteínasa K (10 mg/ml) y se incubó a 56°C por 12 h. Posteriormente la mezcla se agitó en vortex por 10 s y se calentó luego a 100°C por 8 min. Luego, el tubo se agitó por 10 s en vortex y finalmente se centrifugó a 10000 g. Para la reacción de PCR se tomaron directamente 15 μ l del sobrenadante y se mezclaron con 5 μ l de tampón para PCR 10x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 KCl 500 mM), 2 μ l de MgCl₂ (50 mM), 2 μ l de una mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μ l de cada cebador (500 pmol/ μ l, cada uno) 0,5 μ l de *Taq* polimerasa, 5U/ μ l (Promega), más agua estéril, hasta completar 50 μ l de volumen final de reacción por tubo. Cada *locus* fue amplificado en forma individual utilizando un termociclador Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400, con termocupla. Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con una denaturación inicial a 94°C por 3 min., seguida de 30 ciclos de amplificación, cada uno consistente en denaturación a 94°C por 40 s, hibridación a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 35 s. Luego de concluidos los 30 ciclos se programó una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación se analizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución utilizando el sistema comercial Spreadex Gel Kit 70-250 (Elchrom Scientific). Los geles se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabri-

ANÁLISIS DE PATERNIDAD EN CABALLO CHILENO

cante. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis MiniProteam II (BioRad) a 200 V y 35 mA por una hora. La muestra sometida a electroforesis consistió en una mezcla de 10 µl de producto de amplificación y 2 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, glicerol 30% v/v disueltos en agua). Posteriormente los marcadores fueron visualizados por exposición del gel (previamente incubado en una solución de bromuro de etidio 0,5 mg/ml) a luz ultravioleta. El tamaño de los productos amplificados fue estimado utilizando un estándar de 10 pb (Invitrogen). Los genotipos y tamaños alélicos fueron registrados por conteo directo.

La probabilidad de exclusión de paternidad (Jamieson y Taylor, 1997) fue calculada a partir de las frecuencias alélicas observadas utilizando el programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Este mismo programa se usó para estimar la heterocigosis observada (Ho) y esperada (He), así como el contenido de información polimórfica (CIP). Se determinó, la deficiencia o exceso de heterocigotos por *locus* con la prueba exacta de Hardy-Weinberg según Raymond y

Rousset (1995a). La significación estadística de estos análisis se obtuvo de acuerdo al método de cadena de Markov (Guo y Thomson, 1992), utilizando el conjunto de programas GENEPOP versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 12 *loci* analizados, resultaron polimórficos (**tabla I**). El número de alelos por *locus*, varió entre un mínimo de 4 (HTG7) y un máximo de 10 (HMS10, HTG10) con un promedio de 7,6 alelos por *locus*. Este valor, es similar al descrito en caballos de raza Andaluza (Vega-Pla *et al.*, 2006), pero menor al reportado en otras razas españolas como: Jaca Navarra, Asturcon, Caballo Gallego, Losina, Menorquina, Pottoka y Mallorquina en las cuales se describe un promedio de 10,7 alelos por *locus* (Marletta *et al.*, 2006). La heterocigosis media esperada (He), considerando todos los *loci* a la vez fue de 0,76, mientras que su valor mínimo por *locus* fue de 0,52 en HTG7 y máximo de 0,88 en HTG10 (**tabla II**). El promedio de la heterocigosis observada (Ho) sobre el con-

Tabla I. Frecuencias alélicas determinadas para cada uno de los 12 loci analizados en caballo Criollo chileno. (Allelic frequencies in the 12 loci analyzed Chilean Creole horses).

Locus	alelo														
	D	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
VHL20	-	-	0,28	-	-	0,08	0,10	0,27	0,06	0,03	0,05	0,03	0,01	-	-
HTG4	-	-	-	-	-	0,30	0,10	0,25	0,10	0,11	-	-	-	-	-
AHT4	-	0,47	0,19	0,01	0,05	0,03	0,07	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-
HMS7	-	-	0,02	0,02	0,97	0,11	0,21	0,16	0,06	0,07	0,01	0,01	-	-	-
HTG6	0,11	0,09	0,29	-	-	-	0,03	0,38	0,02	-	-	-	-	-	-
AHT5	-	-	-	0,17	0,17	0,11	0,14	0,14	0,11	0,13	-	-	-	-	-
HMS6	-	-	-	-	0,03	0,07	0,10	0,29	0,01	0,07	0,34	0,01	-	-	0,01
ASB2	-	-	-	-	0,01	0,22	0,06	0,13	0,16	0,04	0,04	0,06	-	-	-
HTG10	-	-	-	0,05	-	0,09	0,17	0,16	0,07	0,13	0,11	0,09	0,01	0,05	-
HTG7	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	0,13	0,75	0,02	-	-	-
HMS3	-	-	-	-	0,09	-	-	-	0,02	0,01	0,19	0,27	0,29	0,07	0,02
HMS2	-	-	-	0,27	0,15	0,02	0,12	0,06	-	-	-	-	-	0,11	0,02

D a S: alelos microsatelitales descritos para equinos. (-) indica la ausencia del alelo respectivo.

PAREDES, NORAMBUENAY MOLINA

Tabla II. Parámetros estimativos de diversidad genética determinados en 12 loci microsatelitales en caballo Criollo chileno. (Genetic diversity parameters determined in 12 microsatellite loci analyzed in Chilean Creole horses).

Loci	Nº de alelos	Ho	He	CIP	PE	F _{is}	DE	P
VHL20	9	0,900	0,812	0,776	0,444	-0,112	0,004	0,945
HTG4	5	0,600	0,748	0,697	0,333	+0,192	0,004	0,071
AHT4	8	0,600	0,659	0,622	0,261	+0,110	0,019	0,244
HMS7	10	0,525	0,838	0,807	0,493	+0,341	0,000	0,001
HTG6	6	0,650	0,733	0,682	0,317	+0,107	0,011	0,093
AHT5	7	0,725	0,849	0,817	0,501	+0,149	0,004	0,048
HMS6	9	0,725	0,777	0,735	0,387	+0,176	0,001	0,007
ASB2	8	0,500	0,820	0,786	0,456	+0,407	0,000	0,000
HTG10	10	0,825	0,883	0,858	0,586	+0,093	0,014	0,154
HTG7	4	0,575	0,520	0,471	0,138	-0,099	0,005	0,063
HMS3	8	0,775	0,787	0,744	0,394	+0,053	0,015	0,241
HMS2	7	0,500	0,784	0,745	0,396	+0,332	0,000	0,000

Heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He), contenido de información polimórfica (CIP), probabilidad de exclusión (PE), deficiencia de heterocigotos (F_{is}), desviación estándar (DE) y valor P (P).

junto de todos los marcadores fue de 0,65, con un mínimo de 0,50 (HMS2, ASB2) y un máximo de 0,82 (HTG10). Cabe destacar, que en la mayoría de las razas equinas europeas (Aberle *et al.*, 2004; Marletta *et al.*, 2006) y norteamericanas (Plante *et al.*, 2007), los niveles promedios de heterocigosis de loci microsatelitales son generalmente superiores a 0,65. Recientemente, Luís *et al.* (2007) analizaron 12 loci microsatelitales similares a los utilizados en este trabajo en ocho razas sudamericanas, encontrando valores promedios de He (0,71 a 0,75) y Ho (0,66 a 0,76), lo cual es relativamente coincidente con los niveles detectados en la muestra poblacional de caballo Criollo chileno analizada.

El promedio del CIP considerando los 12 loci fue de 0,72, mientras que el mayor valor encontrado fue de 0,85 (HTG10) y el menor de 0,75 (HMS3). Estos valores indican un elevado valor informativo de los microsatélites analizados lo que coincide con lo informado para caballos portugueses (Luis *et al.*, 2002) o árabes (Gralak *et al.*, 1998).

Se detectó deficiencia de heterocigotos en 5 de los 12 loci analizados (HMS7, AHT4, HMS6, ASB2 y HMS2). Este déficit podría

deberse a diversos factores como la presencia de alelos nulos que lleva a la observación de una mayor cantidad de homocigotos (Dakin y Avise, 2004). También podría explicarse por una presión de selección sobre estos loci que podrían estar ligados a alguno de los fenotipos sujetos históricamente a selección artificial en esta raza. Los valores de Fis para locus similares descritos en diversas razas de caballos europeos son en generalmente menores a los detectados en nuestra muestra poblacional, aunque cabe destacar que también se han registrado valores altos en alguno de ellos (HMS2) en razas españolas (Marletta *et al.*, 2006). Es interesante destacar, que el análisis de variabilidad genética del mismo grupo de loci microsatelitales utilizados en este trabajo, realizado en otra raza chilena (caballo Chilote) por Mujica *et al.* (2005), describe valores de Fis, también relativamente mayores a los descritos en poblaciones de caballos europeos (Vega-Pla *et al.*, 2006; Plante *et al.*, 2007), lo cual es más coincidente con estos resultados, pues también se encontró 3 de 12 loci con exceso de homocigotos, sin embargo esta población de caballos confi-

ANÁLISIS DE PATERNIDAD EN CABALLO CHILENO

nada a la isla de Chiloé en el sur de Chile, ha sufrido drásticas reducciones del número poblacional lo que junto a su confinamiento insular podría explicar su moderado nivel de endogamia (Mujica *et al.*, 2005).

No se puede descartar tampoco, el efecto de prácticas reproductivas endogámicas, que no son evitadas por los criadores al utilizar un bajo número de reproductores y posiblemente relacionados por consanguinidad, lo cual no es extraño entre criadores de caballos de razas certificadas en Chile.

La probabilidad de exclusión por *locus* osciló entre 0,138 (HTG7) y 0,586 (HTG10), mientras que el poder de exclusión total (considerando los 12 *loci*) resultó ser de 0,997. Esto significa que la utilización del conjunto de 12 *loci* microsatelitales analizados en el presente trabajo permite la asignación de paternidad o maternidad con un

99,7% de certeza si utilizamos el índice de paternidad de Jamieson y Taylor (1997), ampliamente utilizado para este tipo de pruebas (Gralak *et al.*, 1998; Giovambattista *et al.*, 2001; Luis *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el alto nivel de variación genética encontrado en los 12 *loci* microsatelitales analizados hace extremadamente improbable asignar erróneamente paternidad en caballo Criollo chileno, sin embargo es recomendable evaluar a mayor escala, la variabilidad genotípica de estos *loci* ya que no se puede descartar el efecto de los desequilibrios en 5 de los 12 *loci* analizados. De confirmarse estos desequilibrios tal vez estos *loci* deberían ser reemplazados por otros en el panel de microsatélites equinos utilizados para pruebas de filiación en Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranguren-Méndez, J., J. Jordana and M. Gómez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.*, 33: 243-252.
- Aberle, K.S., H. Hamann, C. Drögemüller and O. Distl. 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.
- Breen, M., G. Lindgren and M. Binns. 1997. Genetic and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm. Genome*, 8: 267-273.
- Binns, M., N. Holmes, G. Hollimans and A. Scott. 1995. The identifications of polymorphic microsatellite *loci* in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit. Vet. J.*, 151: 9-15.
- Botstein, D., R. White, M. Skolnick and R. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Bowling, A. and S. Clark. 1985. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in the United States. *Anim. Blood Groups Bi.*, 16: 93-108.
- Bowling, A., M. Eggleston-Stott, G. Byrns, R. Clark, S. Dileannis and E. Wictum. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet.*, 28: 247-252.
- Chambers, G. and E. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Phys.*, 126: 455-475.
- Dakin, E. and J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504-509.
- De Andrés Cara, D. 1982. Pura Raza Española de caballos: comparación con otras razas mediante sus polimorfismos enzimáticos sanguíneos. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- Ellegren, H., M. Johansson, K. Sandberg and L. Andersson. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.*, 23: 133-142.
- Giovambattista, G., M. Ripoli, J. Lirón, M. Kienast, E. Villegas-Castagnaso, F. Dulout y P. Peral-García. 2001. Aplicación de las técnicas de polimorfismo de ADN en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. *Anal. Vet.*, 21: 5-11.

PAREDES, NORAMBUENAY MOLINA

- Guerin, G., M. Bertaud and Y. Amigues. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites. *Anim. Genet.*, 25: 124.
- Guo, S. and A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-72.
- Gralak, B., J. Kuryl and C. Niemczewski. 1998. Usefulness of a set of seven microsatellites for parentage control in Arabian Horse and Thoroughbreds in Poland. *Anim. Genet.*, 29: 1-6.
- Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites: Evolution and applications*. (Goldstein, D.B., Schlötterer, C., eds), Oxford University Press. Oxford, England, p. 1-9.
- Jamieson, A. and C. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.*, 28: 397-400.
- Kelly, L., A. Postiglioni and D. Andrés. 2002. Variabilidad genética de los caballos Criollos del Uruguay. *Arch. Med. Vet.*, 34: 13-23.
- Luís, C., E. Cothran and M. Oom. 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breed: usefulness for parentage testing. *Genet. Mol. Biol.*, 25: 131-134.
- Luís, C., R. Juras, M. Oom and E. Cothran. 2007. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. *Anim. Genet.*, 38: 20-27.
- Marletta, D., I. Tupac-Yupanqui, S. Bordonaro, D. García, A. Guastella, A. Criscione, J. Cañon and S. Dunner. 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.
- Marshall, T., J. Slate, L. Kruk and J. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7: 639-655.
- Marklund, S., H. Ellegren, S. Erikson, K. Sandberg and L. Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.*, 25: 19-23.
- Mujica, F., V. Obreque, P. Hinrichsen y G. Cothran. 2005. Recuperación, conservación y caracterización del caballo chilote. *Agro Sur*, 33: 58-67.
- Oltra, J., M. Ortiz, V. de la Barra y E. Stange. 1993. Tipificación de polimorfismos bioquímicos sanguíneos en equinos fina sangre de carrera y fina sangre chilena y su eficiencia en pruebas de exclusión de paternidad. *Arch. Med. Vet.*, 25: 147-153.
- Ott, J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 283-290.
- Plante, Y., J.L. Vega-Pla, Z. Lucas, D. Colling, B. de March and F. Buchanan. 2007. Genetic diversity in a feral horse population from Sable Island, Canada. *J. Hered.*, 98: 594-602.
- Van Haeringen, H., A. Bowling, M. Stott, J. Lenstra and K. Zwaagstra. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus VHL20. *Anim. Genet.*, 25: 207.
- Vega-Pla, J.L., J. Calderón, P. Rodríguez-Gallardo, A. Martínez and C. Rico. 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.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995 a. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995 b. GENEPOP 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248-249.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6463-6471.
- Suenaga, E. and H. Nakamura. 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. Chromatogr.*, 820: 137-141.
- Waldbieser, G. and B. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in chammel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Anim. Genet.*, 28: 295-298.