

Diversidad genética al interior de los núcleos reproductivos de las razas pesadas del Plan Nacional de Fomento Equino basado en el análisis de *loci* microsatélites

Genetic diversity analysis in the reproductive nuclei of heavy breeds of the National Equine Promotion Plan by using microsatellite *loci*

A Ramírez-Reveco^{a*}, R Hartley^{af}, M Ortiz^b, O Ulloa^{cd}, I Núñez^{de}

^aLaboratorio de Criobiología y Análisis de Funcionalidad Espermática, Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

^bLaboratorio de Marcadores Moleculares, CIA-CENEREMA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

^cHaras Militar Pupunahue, Los Lagos, Chile.

^dDGFER, Ejército de Chile, Santiago, Chile.

^eFacultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^fPrograma Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

SUMMARY

In Chile, the National Equine Promotion Plan for Agriculture (PNFE) aims to generate Chilean draft horses through absorbent crosses between native crossbred mares and fine heavy draft stallions belonging to the Chilean Army. The goal of this study was to characterise by microsatellite DNA analysis the genetic variability within the purebred core: Ardenés (20), Bretón (23) and Percheron (20). The individuals were analysed using 16 microsatellite locus (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, HMS1 and CA425). Molecular genotyping showed that the total number of alleles for several locus varied from 1 to 7; 3-6 and 2-7, according to each breed, with an average of 4.3; 4.8; 4.8 alleles per locus for the Ardennes, Breton and Percheron, respectively. Mean values of observed heterozygosity (H_o) were 0.63; 0.72 and 0.64 for each race, respectively. In all three cases, the mean observed heterozygosity was higher than expected heterozygosity (H_e) and Nei index. Heterozygosity and fixation index analysis revealed that the three cores showed a low level of inbreeding.

Key words: PNFE, equine, genetic variability, heterozygosity, microsatellite.

RESUMEN

El Plan Nacional de Fomento Equino para la Agricultura (PNFE) tiene el propósito de generar caballos chilenos de tiro por medio de cruzamientos absorbentes de hembras mestizas criollas con sementales finos de tiro pesado pertenecientes al Ejército de Chile. El objetivo de este estudio fue caracterizar, mediante uso de ADN microsatélites, la variabilidad genética al interior de los núcleos reproductivos finos de las razas Ardenés, Bretón de Montaña y Percherón. Se analizaron 20, 23 y 20 ejemplares mediante el uso de 16 *locus* de microsatélites (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, HMS1 y CA425). El genotipado molecular evidenció que el número total de alelos por locus varió de 1 a 7; 3 a 6 y 2 a 7, con un promedio de 4,3; 4,8; 4,8 alelos por locus para las razas Ardenés, Bretón y Percherón. Además, los valores medios de heterocigosidad observada (H_o) fueron de 0,63; 0,72 y 0,64 para cada raza; en los tres casos el valor medio de la heterocigosidad observada fue mayor que la esperada y que el índice de Nei. El análisis de heterocigosidad e índice de fijación revela que los tres núcleos no presentan déficit de heterocigosidad, indicando un bajo nivel de endogamia.

Palabras clave: PNFE, equinos, variabilidad genética, heterocigosidad, microsatélites.

INTRODUCCIÓN

Todos los años el PNFE despliega estaciones de monta y remonta (de 18 a 24) entre la VI y XIV Regiones del centro y sur de Chile. Recientemente, en la temporada reproductiva 2012-13 se logró servir 927 yeguas, dicha capacidad de

cobertura está limitada por el número de reproductores del PNFE, el que a su vez está directamente relacionado con la calidad y estado genético de los núcleos reproductivos finos que mantiene el Ejército de Chile. Los reproductores desplegados son sementales inscritos en los registros de razas Ardenés, Bretón y Percherón. La raza Ardenés se originó en la frontera entre Francia y Bélgica, aunque se considera francesa. Es un caballo de tiro pesado, que se cree desciende del caballo prehistórico de Solutré y que era muy apreciado por los romanos. El Ardenés se creó para trabajos duros, lo que es obvio en todos los aspectos de su conformación, tiene buen carácter y es obediente,

Aceptado: 08.07.2015.

Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF) D0811076

* alfredoramirez@uach.cl

su alzada oscila entre 1,52-1,62 m (Fitzpatrick 2007). La raza Bretón se originó en la región francesa de Bretaña, al noreste del país. El estándar de raza se formó hace poco, pero la historia de su creación se remonta hace 4000 años, cuando los arios introdujeron ganado asiático en Europa. En Bretaña, el clima exigente y la mala tierra condicionaron la adaptación de los caballos autóctonos al entorno, el resultado fue un caballo muy vigoroso y longevo. Los tres tipos de Bretón son de carácter estable y dispuestos para el trabajo. Son extremadamente resistentes y tienen mucha energía, lo que les hace fáciles de mantener, su alzada oscila entre 1,65-1,79 m (Fitzpatrick 2007). El Percherón

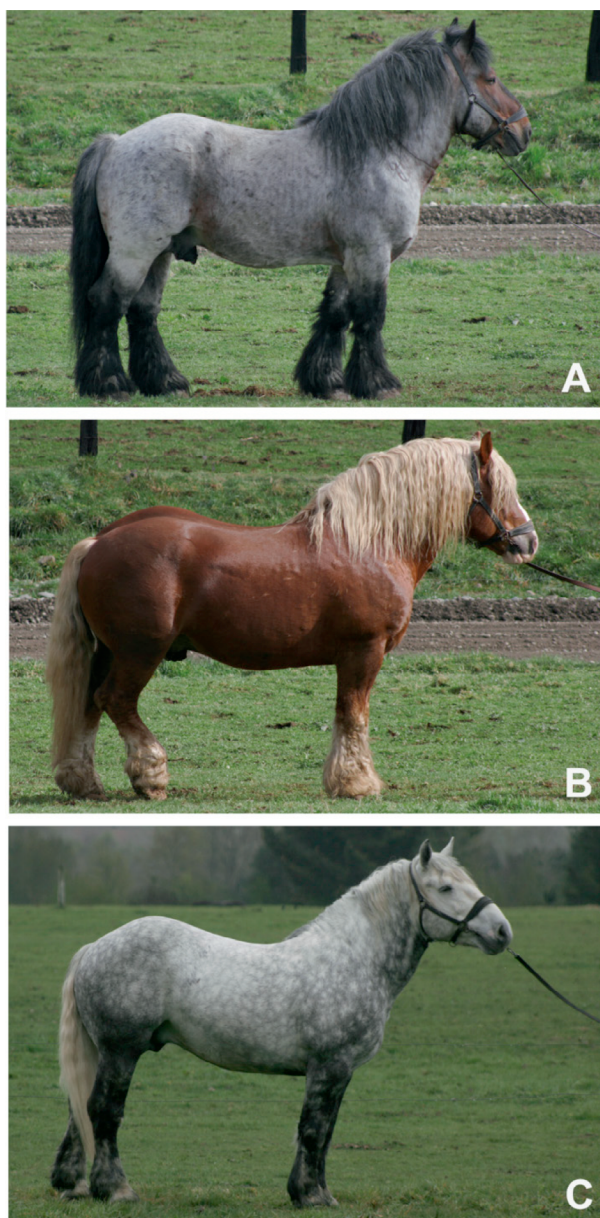


Figura 1. Fotografías de tres reproductores pertenecientes al núcleo reproductivo de equinos de tiro pesado del PNFE. Ardenés (A), Bretón (B) y Percherón (C).

Pictures of three stallions belonging to the PNFE reproductive core of heavy draft horses. Ardenes (A), Breton (B) and Percheron (C).

procede de La Perche, Normandía, norte de Francia. La raza es antigua; se remonta al año 732, cuando se dejó que los caballos árabes abandonados por los sarracenos tras su derrota en la batalla de Poitiers se cruzaran con yeguas pesadas de la región, surgiendo el Percherón. El caballo Percherón es elegante, de excelente temperamento, tranquilo, fácil de manejar y tiene una aguda inteligencia, su alzada oscila entre 1,65-1,80 m (Fitzpatrick 2007). En la figura 1 se muestran 3 reproductores del PNFE, cada uno representativo de cada raza.

Los STR (por *Short Tandem Repeat*) o microsatélites, son una clase de marcadores genéticos comúnmente usados en estudios poblacionales y de control de parentesco (Fornal y col 2013). Los microsatélites se caracterizan por tener herencia mendeliana y codominante, ser frecuentes en el genoma y estar repartidos por todo él, además de ser muy polimórficos. Por lo demás, debido a su pequeño tamaño son eficientemente amplificados mediante uso de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) seguida de electroforesis. La mayoría de los microsatélites son informativos debido a su alto grado de polimorfismo y son usados en pruebas de paternidad en equinos (Marklund y col 1994, Lee and Cho 2006). Además, los marcadores de ADN pueden ser usados para examinar la estructura genética de una población, el nivel de endogamia, homociguidad, distancia génica entre poblaciones o razas, planeamiento y manejo reproductivo o bien para el estudio y diseño de programas de preservación genética (Jozsa y col 2005). El objetivo de este trabajo fue determinar, de manera descriptiva, la variabilidad genética e índices de consanguinidad existentes en los tres núcleos reproductivos finos del PNFE. El análisis se basó en el uso de 16 marcadores microsatélites, estos fueron evaluados mediante PCR-multiplex y electroforesis capilar fluorescente. Se reportan los análisis por raza y por marcador al interior de cada núcleo reproductivo de: heterociguidad observada (H_o), esperada (H_e), índice de Nei, índice de fijación (F_{IS}), número promedio de alelos por locus (N_A), contenido de información polimórfica (PIC) y riqueza alélica.

MATERIAL Y MÉTODOS

RAZAS Y MUESTREO

Sesenta y tres ejemplares fueron utilizados, de ellos 20 correspondieron a la raza Ardenés, 23 a la Bretón y 20 a la Percherón. A todos los animales se les extrajeron entre 20-40 folículos pilosos, los que fueron catalogados y mantenidos a T° ambiente hasta su envío al Laboratorio de Marcadores Moleculares del CIA-CENEREMA de la Universidad Austral de Chile.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

A partir de cada muestra se seleccionaron 5-7 pelos que presentasen un folículo piloso visible. Dichos pelos se

cortaron a 1 cm del bulbo. Estas muestras se dispusieron en un tubo Eppendorf de 1,7 mL, al que se le agregó 200 μ L de solución al 5% de Chelex 100 y 1,0 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron a 56 °C toda la noche en un horno de cultivo (WTC Binder), y luego por 8 min a 95 °C, para inactivación de proteasas. Para separar el ADN genómico y eliminar impurezas de las muestras, el homogenizado fue centrifugado a 14.000 x g, por 2 minutos.

GENOTIPADO MOLECULAR

El genotipado consideró los 16 microsatélites recomendados por el Comité de Estandarización de Genética Equina de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para pruebas de paternidad y caracterización equina. Los marcadores analizados fueron los siguientes: VHL20 (van Haeringer y col 1994); HTG4, HTG6, HTG7 y HTG10 (Ellegren y col 1992); AHT4 y AHT5 (Binns y col 1995); HMS1, HMS2, HMS3, HMS6 y HMS7 (Guerin y col 1994); ASB23 (Lear y col 1999); ASB2, ASB17 (Breen y col 1997) y CA425 (Eggleston-Scott y col 1997).

PCR Y ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN

Las muestras fueron analizadas siguiendo un protocolo que consideró una reacción múltiple en un termociclador Geneamp modelo 2720 (Applied Biosystems). En cada reacción de PCR se utilizaron 20 ng de ADN genómico, diluidos a 8 μ L y previamente cuantificado en espectrofotometría UV a 260 nm (Shimadzu UVmini-1240), 100 μ M de dNTP, entre 0,1 y 0,3 mM de cada *primers* (16 en total), tampón de PCR 1x y 1U de *ampli*TaqGold ADN polimerasa (Applied Biosystem). Las condiciones de reacción incluyeron una etapa inicial de desnaturalización del ADN por 10 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de amplificación consistentes en desnaturación por 30 seg a 95 °C, hibridación por 30 seg a 60 °C y elongación por 60 seg a 72 °C, para terminar con una etapa de extensión de 60 min a 72 °C.

De cada muestra amplificada se tomó 1 μ L de ADN, al que se le adicionó 0,25 μ L Liz 500 Size Estándar (Life Technologies) y 12 μ L de formamida. Estos tubos, se sometieron a 95° C por 5 minutos, para posteriormente ser llevados al equipo de análisis de ADN, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), donde se realizó la electroforesis capilar automatizada. Para el análisis de los fragmentos se utilizó el *software* Genemapper 4.0, del cual se obtuvo el electroferograma. Aplicando el criterio de asignación de genotipos según nomenclatura recomendada por la ISAG, se determinaron los genotipos presentes en cada uno de los *locus* de cada animal. En la figura 2 se muestra un electroferograma representativo de los análisis de microsatélites realizados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de frecuencias alélicas, heterocigosidad observada y esperada y el índice de Nei fueron realizados con el programa POPGENE32 versión 1.31 (Yeh y col 1999). El Índice de Fijación o Coeficiente de endogamia (F_{IS}) fue calculado con el programa GenAIEx 6.5 (Peakell and Smouse 2012). El Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue determinado con el programa PICcalc (Nagy y col 2012).

RESULTADOS

La frecuencia alélica para cada microsatélite y para cada raza son presentados en el cuadro 1. Los valores de heterocigosidad observada y esperada, coeficiente de Nei, índice de fijación, número de alelos promedio, contenido de información polimórfica y riqueza alélica por *locus* son mostrados en el cuadro 2 y sus promedios finales por raza son mostrados en el cuadro 3.

El número total de alelos para las razas Ardenés, Bretón y Percherón fue de 69, 77 y 78. Los *loci* que presentaron menor polimorfismo (1-3) fueron los siguientes: HTG6 con un alelo en la raza Ardenés, HMS1 y HTG6 con dos alelos en las razas Ardenés y Percherón y HTG7 con tres alelos en la raza Ardenés y HTG6 y HMS6 con igual número de alelos en la raza Bretón. En tanto el *loci* que presentó el mayor grado de polimorfismo fue VHL20 con siete alelos en núcleo Ardenés y Percherón; le siguieron ASB17 con seis alelos en los tres núcleos; AHT5 y HMS2 con seis alelos en los núcleos Bretón y Percherón; VHL2 y HMS3 con seis alelos en los bretones, ATH4 y HTG10 con seis alelos en el núcleo Percherón. El número promedio de alelos obtenido (N_A) fue 4,31; 4,81 y 4,87 para los núcleos Ardenés, Bretón y Percherón.

A nivel general, el promedio de contenido de información polimórfica (*PIC*) por raza fue informativo, con valores de 0,54; 0,59 y 0,58, para las razas Ardenés, Bretón y Percherón. En términos específicos, los marcadores que no resultaron ser informativos ($PIC < 0,5$) por raza fueron los siguientes: Ardenés (HTG6; HMS2), Bretón HTG4; HTG6) y Percherón (HMS7; HTG6; HMS3 y HMS2). Por su parte, y en el mismo orden, los valores promedio de riqueza alélica (AR) fueron: 0,21; 0,20 y 0,24.

Los valores de heterocigosidad promedio (H_o) obtenidos en orden descendiente fueron 0,72 para los bretones, 0,65 para los percherones y la más baja con 0,63 para el núcleo Ardenés. El análisis de heterocigosidad por *locus* indicó que 4, 3 y 8 marcadores microsatélites presentaron mayor heterocigosidad esperada que observada para las razas Ardenés, Bretón y Percherón (cuadro 2).

Los niveles de heterocigosidad obtenidos mediante índice de Nei, y en orden decreciente, fueron 0,66; 0,62 y 0,59 para las razas Bretón, Percherón y Ardenés. Respecto

Cuadro 1. Frecuencias alélicas de las razas Ardenés (AR), Bretón (BR) y Percherón (PER) al interior de los núcleos reproductivos del PNFE.

Allelic frequencies of the Ardennes (AR), Breton (BR) and Percheron (PER) breeds in the PNFE reproductive nuclei.

Locus	Raza	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
VHL20	AR	-	-	-	0,100	-	-	-	0,150	0,075	0,200	0,125	0,275	0,075	-	-	-	-
	BR	-	-	-	0,087	-	-	-	-	0,109	0,413	0,022	0,304	0,065	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	0,075	-	-	0,075	0,100	0,125	0,475	0,100	0,050	-	-	-	-
HTG4	AR	-	-	-	-	-	-	0,150	0,425	0,025	0,250	0,150	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	-	0,174	0,652	-	0,065	0,109	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	-	0,025	0,400	0,175	0,125	-	0,275	-	-	-	-	-	-
AHT4	AR	-	-	0,275	-	0,150	0,125	-	-	-	0,450	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	0,065	0,087	0,283	0,065	-	-	-	0,500	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	0,300	0,100	0,025	-	-	0,050	0,225	0,300	-	-	-	-	-	-
HMS7	AR	-	-	-	-	-	-	0,125	0,150	0,625	0,100	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	-	0,283	0,304	0,326	0,087	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	0,025	-	0,725	0,100	0,050	0,100	-	-	-	-	-	-	-
HTG6	AR	-	-	-	-	0,475	0,325	0,600	0,275	0,600	1,425	0,400	0,100	0,025	0,300	-	0,325	-
	BR	-	0,043	-	-	0,043	-	-	-	-	0,913	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	0,025	-	-	-	-	-	-	-	0,975	-	-	-	-	-	-	-
AHT5	AR	-	-	-	-	0,475	0,100	0,075	0,150	-	0,200	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	0,283	0,087	0,043	0,348	0,109	0,130	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	0,225	0,325	0,300	0,075	0,050	0,025	-	-	-	-	-	-	-
HMS6	AR	-	-	-	-	-	-	0,500	0,100	-	0,025	0,375	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	-	0,478	0,174	-	-	0,348	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	-	-	0,175	0,400	-	0,175	0,250	-	-	-	-	-	-
ASB23	AR	-	-	-	-	0,025	0,325	0,025	-	-	-	-	-	-	0,300	-	0,325	-
	BR	-	-	-	0,087	0,022	0,022	-	-	-	-	-	-	-	0,587	-	0,283	-
	PER	-	-	-	-	0,300	0,075	-	-	-	-	-	-	-	0,475	-	0,150	-
ASB2	AR	-	-	-	0,150	-	0,075	-	0,075	0,600	-	-	0,100	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	0,065	-	0,239	-	0,109	0,522	-	0,065	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	0,350	-	-	-	0,050	0,375	-	0,150	0,075	-	-	-	-	-
HTG10	AR	-	-	-	-	-	-	-	0,125	0,250	0,575	0,025	-	0,025	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	-	-	0,348	0,239	0,326	0,022	-	0,065	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	-	-	0,150	0,450	0,025	0,225	0,100	-	0,050	-	-	-	-
HTG7	AR	-	-	-	-	-	-	0,450	0,275	0,275	-	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	0,261	-	0,196	0,261	0,283	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	-	0,125	-	0,225	0,175	0,475	-	-	-	-	-	-	-
HMS3	AR	-	-	-	-	-	-	-	0,025	-	0,300	0,150	0,450	0,075	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	-	-	-	0,022	0,109	0,065	0,326	0,261	0,217	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	-	-	0,050	-	0,125	0,725	-	-	0,100	-	-	-	-
HMS2	AR	-	-	0,600	0,300	-	0,075	-	-	-	-	-	-	0,025	-	-	-	-
	BR	-	-	0,391	0,109	-	0,196	0,174	-	-	-	-	-	0,130	-	-	-	-
	PER	-	-	0,150	0,700	-	0,125	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASB17	AR	-	-	-	0,050	-	-	-	0,200	0,300	-	0,025	0,050	0,375	-	-	-	-
	BR	0,087	-	-	-	-	-	-	0,174	0,457	0,043	0,174	-	0,065	-	-	-	-
	PER	-	-	-	0,150	-	0,325	-	-	0,225	0,050	-	-	0,225	0,025	-	-	-
HMS1	AR	-	-	-	-	0,425	-	-	0,575	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	0,109	0,413	0,022	0,043	0,391	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	0,200	0,225	0,100	0,400	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-
CA425	AR	-	0,050	-	-	0,200	-	0,025	-	0,725	-	-	-	-	-	-	-	-
	BR	-	-	-	-	0,065	-	0,152	0,109	0,587	0,087	-	-	-	-	-	-	-
	PER	-	-	-	-	0,075	-	0,100	0,300	0,425	0,100	-	-	-	-	-	-	-

del índice de fijación (F_{IS}) o nivel de deficiencia de heterocigosidad los resultados observados fueron: $-0,030$; $-0,064$ y $-0,003$, para las razas Ardenés, Bretón y Percherón. Los valores negativos de F_{IS} obtenidos en las tres razas indican que no existe deficiencia de heterocigotos al interior de los planteles y por lo tanto estas aún presentan un bajo nivel de consanguinidad.

DISCUSIÓN

El uso de microsatélites en equinos, como marcadores de polimorfismo genético, ha mostrado ser una

valiosa y confiable herramienta tanto para análisis y de registro de parentesco como para los estudios de estructura genética de poblaciones, dentro de los que se destacan los análisis de consanguinidad o endogamia que pueda presentar una población y también los análisis de distancia génica que puedan existir entre poblaciones o razas.

En este estudio el número promedio de alelos obtenido (N_A) fue de 4,31; 4,81 y 4,87 para los núcleos Ardenés, Bretón y Percherón (cuadro 3). Estos valores fueron considerablemente más bajos que los reportados en núcleos reproductivos de referencia (Haras Nationaux, Francia),

Cuadro 2. Heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e), índice de fijación (F_{IS}), número promedio de alelos por *locus* (N_A), contenido de información polimórfica (PIC) y riqueza alélica (N_A) por *locus* de las tres razas al interior de los núcleos reproductivos del PNFE.

Observed heterozygosity (H_o), Expected (H_e), Fixation index (F_{IS}), mean number of alleles per locus (N_A), Polymorphic Information Content (PIC) and Allelic Richness (AR) per locus of three breeds into PNFE reproductive nuclei.

Locus	Ardenés						Bretón						Percherón					
	H_o	H_e	F_{IS}	N_A	PIC	AR	H_o	H_e	F_{IS}	N_A	PIC	AR	H_o	H_e	F_{IS}	N_A	PIC	AR
VHL20	0,900	0,825	-0,091	7,000	0,802	0,350	0,826	0,713	-0,159	6,000	0,668	0,261	0,850	0,725	-0,172	7,000	0,700	0,350
HTG4	0,800	0,711	-0,125	5,000	0,665	0,250	0,652	0,528	-0,234	4,000	0,488	0,174	0,700	0,718	0,024	5,000	0,67	0,250
AHT4	0,750	0,684	-0,097	4,000	0,631	0,200	0,652	0,654	0,003	5,000	0,603	0,217	0,850	0,756	-0,124	6,000	0,715	0,300
HMS7	0,700	0,561	-0,247	4,000	0,522	0,200	0,870	0,714	-0,219	4,000	0,657	0,174	0,450	0,451	0,003	5,000	0,426	0,250
HTG6	0,000	0,000	n/a	1,000	0	0,050	0,174	0,163	-0,070	3,000	0,156	0,130	0,050	0,049	-0,026	2,000	0,047	0,100
AHT5	0,750	0,696	-0,077	5,000	0,657	0,250	0,826	0,761	-0,086	6,000	0,724	0,261	0,850	0,745	-0,141	6,000	0,701	0,300
HTS6	0,550	0,599	0,081	4,000	0,520	0,200	0,739	0,620	-0,192	3,000	0,543	0,130	0,650	0,716	0,092	4,000	0,667	0,200
ASB23	0,600	0,698	0,140	5,000	0,636	0,250	0,652	0,567	-0,150	5,000	0,505	0,217	0,750	0,656	-0,143	4,000	0,598	0,200
ASB2	0,550	0,596	0,078	5,000	0,563	0,250	0,652	0,650	-0,003	5,000	0,605	0,217	0,750	0,706	-0,062	5,000	0,655	0,250
HTG10	0,550	0,590	0,068	5,000	0,535	0,250	0,783	0,711	-0,101	5,000	0,656	0,217	0,650	0,711	0,086	6,000	0,672	0,300
HTG7	0,800	0,646	-0,238	3,000	0,573	0,150	0,913	0,746	-0,224	4,000	0,698	0,174	0,800	0,678	-0,181	4,000	0,628	0,200
HMS3	0,700	0,679	-0,031	5,000	0,625	0,250	0,739	0,762	0,030	6,000	0,723	0,261	0,450	0,446	-0,008	4,000	0,416	0,200
HMS2	0,550	0,544	-0,011	4,000	0,473	0,200	0,826	0,750	-0,102	5,000	0,713	0,217	0,400	0,471	0,151	4,000	0,433	0,200
ASB17	0,850	0,724	-0,174	6,000	0,676	0,300	0,783	0,717	-0,091	6,000	0,682	0,261	0,800	0,768	-0,042	6,000	0,730	0,300
HMS1	0,650	0,489	-0,330	2,000	0,369	0,100	0,783	0,645	-0,214	5,000	0,577	0,217	0,700	0,734	0,046	5,000	0,693	0,250
CA425	0,500	0,431	-0,159	4,000	0,385	0,200	0,696	0,609	-0,143	5,000	0,575	0,217	0,650	0,704	0,076	5,000	0,656	0,250

Cuadro 3. Tamaño de la muestra, heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e), índice de Nei, índice de fijación (F_{IS}), número promedio de alelos por *locus* (N_A), contenido de información polimórfica (PIC) y riqueza alélica (N_A) en las tres razas del PNFE. Se muestran los promedios y error estándar (Media \pm SE).

Sample size, Observed Heterozygosity (H_o), Expected (H_e), Nei Index, Fixation Index (F_{IS}), mean number of alleles per locus (N_A), Polymorphic Information Content (PIC) and Allelic Richness (AR) for three PNFE breeds. Means and standard errors (Mean \pm SE) are shown.

Raza (Código)	Tamaño de muestra			Heterocigosidad			F_{IS} (SE)	N_A (SE)	PIC (SE)	RA (SE)
	♀♂	♀♀	Total (Alelos)	H_o (SE)	H_e (SE)	Nei (SE)				
AR	8	12	69	0,637 (0,052)	0,607 (0,048)	0,592 (0,046)	-0,081 (0,035)	4,31 (0,36)	0,540 (0,045)	0,216 (0,018)
BR	8	15	77	0,722 (0,042)	0,658 (0,037)	0,644 (0,037)	-0,122 (0,021)	4,81 (0,24)	0,599 (0,035)	0,209 (0,011)
PER	9	11	78	0,6469 (0,054)	0,6432 (0,048)	0,6271 (0,047)	-0,026 (0,026)	4,87 (0,24)	0,589 (0,045)	0,244 (0,015)

que reportan 6,09; 6,36 y 6,64 para las mismas razas (Leroy y col 2009).

Por lo demás, los valores de heterocigosidad promedio observada (H_o) obtenidos en las razas Ardenés y Percherón fueron más bajos (0,63 y 0,64) que los reportados en estudios núcleos franceses con 0,66 y 0,69 (Leroy y col 2009). En tanto, el valor de heterocigosidad observada (H_o) obtenida en la raza Bretón fue más alta que la reportada en núcleo de referencia, con 0,72 vs 0,65 (Leroy y col 2009). Además, los valores de heterocigosidad (H_o) observada obtenidos en nuestro estudio son considerablemente más altos que los reportados en una muestra de plantales polacos con valores de: 0,42; 0,38 y 0,40 (Iwaczyk y col 2006).

Al realizar el análisis de heterocigosidad usando el índice de Nei se obtuvieron los siguientes resultados en orden decreciente: 0,66; 0,62 y 0,59 para las razas Bretón, Percherón y Ardenés, se ajustaron mejor a los esperados cuando se compara con los mismos valores de referencia.

Respecto del índice de fijación (F_{IS}) o nivel de deficiencia de heterocigosidad los resultados observados fueron: -0,030; -0,064 y -0,003, para las razas Ardenés, Bretón y Percherón, los que resultaron negativos en las tres razas y más bajos (Ardenes y Bretón) que los reportados por Leroy y col (2009), con 0,08; -0,02 y -0,01 para las tres razas, similares diferencias fueron observadas en el estudio de Pirault y col (2013) en ellos se obtuvieron los siguientes valores: 0,09; -0,02 y -0,18, para las tres razas. Finalmente

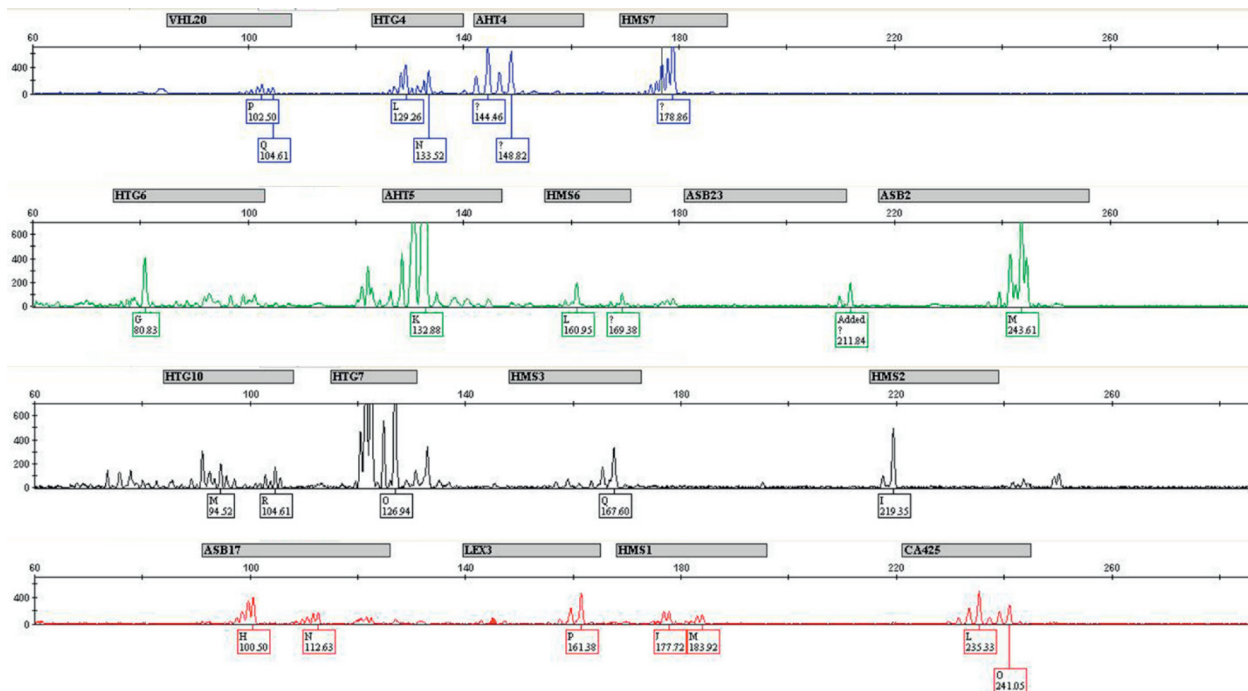


Figura 2. Electroferograma representativo de microsatélites amplificados mediante PCR múltiple.
Representative electropherogram of multiplex PCR-amplified microsatellites.

en otro estudio, aunque menos reciente, Iwanczyk y col (2006), reportan índices de fijación (F_{IS}) también negativos de: -0,02; -0,102 y -0,01, para las mismas razas, siendo mayor en el caso de la raza Ardenés, menor en el caso de la Bretón e igual valor en el caso de la Percherón, que los obtenidos en nuestro estudio.

El análisis del índice de fijación no muestra evidencia de la existencia de endogamia al interior de los núcleos reproductivos (F_{IS} negativos). Al contrario, el hecho de que el grado de polimorfismo presentado en cada núcleo (N_A), comparado a los valores de referencia (Leroy y col 2009), sea más bajo, sumado el limitado número de individuos presentes en cada grupo (< 22 en c/u) y las cada vez más bajas posibilidades de proyectar cruzamientos no consanguíneos, sugieren que los niveles de consanguinidad se incrementarán de manera importante en las próximas generaciones, sin el ingreso de nueva genética.

Finalmente, la información y resultados obtenidos, constituyen una línea base sobre la que se podrá evaluar, de manera dinámica, la variabilidad genética al interior de los núcleos genéticos, derivada del manejo reproductivo del Haras Militar Pupunahue y de los eventos de flujo génico, ya sea por ingreso de nuevos ejemplares o la importación de semen o embriones de las respectivas razas.

AGRADECIMIENTOS

Especiales agradecimientos a todos los oficiales y personal militar de la DGFER por la colaboración recibida en la toma, registro y envío de las muestras al Laboratorio.

REFERENCIAS

- Breen M, G Lindgren, MN Binns, J Norman, Z Irvin, K Bell, K Sandberg, H Ellegren. 1997. Genetical and physical assignments of equine microsatellites-First integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 8, 267-273.
- Binns MM, NG Holmes, A Holliman, AM Scott. 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit Vet J* 151, 9-15.
- Eggleston-Stott ML, A Delvalle, M Bautista, S Dileanis, E Wictum, AT Bowling. 1997. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ405, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505. *Anim Genet* 28, 370-371.
- Ellegren H, M Johansson, K Sandberg, L Andersson. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim Genet* 23, 132-133.
- Fitzpatrick A. 2008. *Guía Completa de razas de caballos*. 2^{da} ed. Lisma Ediciones, Barcelona, España.
- Fornal A, A Radko, A Piestrzyńska-Kajtoch. 2013. Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochim Pol* 60, 761-765.
- Guérin G, M Bertaud, Y Amigues. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Anim Gen* 25, 62.
- Iwańczyk E, R Juras, G Cholewiński, EG Cothran. 2006. Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy Horse. *J Appl Genet* 47, 353-359.
- Józsa C, B Bán, S Mihók, I Bodó. 2005. DNA microsatellite test of Hutsul horses in Hungary. *EAAP 56th Annual Meeting*, 5-8 June, Uppsala, Sweden.
- Lee S, G Cho. 2006. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *J Vet Sc* 7, 63-67.
- Leroy G, L Callède, E Verrier, JC Mériaux, A Ricard, C Danchin-Burge, X Rognon. 2009. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by Microsatellite polymorphism *Genetics Selection Evolution* 41, 5.

- Marklund S, H Ellegren, S Eriksson, K Sandberg, L Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet* 25, 19-23.
- Nagy S, P Poczai, I Cernák, AM Gorji, G Hegedűs, J Taller. 2012. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics* 50, 670-672.
- Peakall R, PE Smouse. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pirault P, S Danvy, E Verrier, G Leroy. 2013. Genetic Structure and Gene Flows within Horses: A Genealogical Study at the French Population Scale. *PLoS ONE* 8, e61544.
- Van Haeringen H, AT Bowling, JA Lenstra, KA Zwaagstra, ML Stott. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus VHL20. *Anim Genet* 25, 207.
- Yeh FC, R Yang, T Boyle. 1999. *POPGENE, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis*. Version 1.31, University of Alberta, Edmonton, Canada.

