



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN
POBLACIONES EQUINAS DE ARGENTINA”.**

Kienast, Mariana

Director: Ing. Dulout, Fernando N.

Co-director: Dra. Peral García, Pilar

Lugar de trabajo:

Centro de Investigación en Genética Básica y Aplicada.

CIGEBA

Miembros del jurado:

Dra. Lojo, María Mercedes

Dra. Mirande, Susana

Dr. Molinuevo, Héctor

A mi hermosa familia, en especial a Manu, Juanpi, Tintín y Juli

A mi amor, Damián

A la memoria de una persona especial, Ruth

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al director Ing. Fernando Dulout, por darme un lugar en el laboratorio y guiarme en el fascinante camino de la investigación. A la co-directora Dra. Pilar Peral García por confiar plenamente en mi trabajo y darme la libertad para crecer.

A las personas que colaboraron con mi formación dándome la oportunidad de realizar pasantías en sus respectivos laboratorios Dr. Gus Cothran y Dra. Ann Bowling.

A las personas que colaboraron directamente en la realización de este trabajo: A Mercedes por su invaluable guía, a Guillermo por su paciencia para evacuar dudas de toda índole. A Pedro por sus aportes técnicos y charlas sobre temas comunes. A Tati por sus aportes con las filogenias. Al "Dr" Martín por su colaboración en la edición final de este trabajo. A Patry que me acompañó al muestreo en Salta. A la colaboración via e.mail del Dr. Jordana con los "arbolitos". A Ernesto por su colaboración con las fotos.

A las amigas de siempre, Egle y Vero, que creo que les debo el apoyo tan incondicional que evitó el psicoanálisis. A Alba por su eterna paciencia. A Julio por su "paternidad" dentro del ámbito del laboratorio. A Silvina por su compañía desde los primeros tiempos. A Vero (la turca), Tili, Carlos, Silvana y todo el personal del CIGIBA por todos los momentos compartidos.

Además en el largo camino que significó realizar esta tesis tuve la suerte de conocer gente, muchos de los cuales hoy conservo como amigos:

A los propietarios y personal de los haras de criollos muestreados.

A los Dres. Carlos y Cecilia de Mattos por su invaluable compañía en Davis.

Al Dr. Juan Pablo Lovaglio por su desinteresada colaboración en el muestreo de los caballos peruanos. A sus hermanos por el interés mostrado en este trabajo.

A las personas que colaboraron en el muestreo.

Al Sr. Fernando Escalante por darme la oportunidad de divulgar mi trabajo.

Por último a aquellos que por estar cerca mio me dieron el ánimo suficiente para llegar hasta el final, mi familia:

-Mamá Negrita y Papá Pablo que me dieron todo el apoyo y amor necesario para lograr todas las metas que me propuse.

-A mis hermanos Patricia, Guillermo y mi "cuñada" Marce por creer que lo que yo hago es muy importante.

-A los nenes por la alegría de siempre.

-A Damián por su persistencia en decirme "termina la tesis" y su amor incondicional.

	Página
RESUMEN	1
I) INTRODUCCIÓN	3
I.1) Generalidades	
I.2) LA VARIABILIDAD GENETICA: ORIGEN Y DETECCION	4
I.3) VARIABILIDAD A DISTINTOS NIVELES	5
I.4) USOS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS	5
I.5) HISTORIA DEL POLIMORFISMO	6
I.5.a) El Polimorfismo Proteico	7
I.5.a.1) El Polimorfismo Proteico En Equinos	7
I.5.b) El Polimorfismo Molecular	9
I.5.c) Ventajas De La Tipificación Por Marcadores Moleculares Sobre Los Clásicos	10
I.5.d) ADN mitocondrial (ADNmt)	11
I.5.e) Nuevas Metodologías	11
I.5.e.1) Polimorfismo De Nucleótido Simple (SNP)	
I.5.e.2) ESTs (<i>Expressed Sequence Tags</i>)	12
I.5.e.3) <i>Microarrays</i>	12
I.5.d) Microsatélites	12
II) IMPORTANCIA DE ESTE TIPO DE ESTUDIO EN EQUINOS ARGENTINOS.	14
III) ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS EN RAZAS EQUINAS LATINOAMERICANAS.	16
IV) HISTORIA DEL CABALLO	17
IV.1) Familia Equidae	17
IV.2) ORIGEN AMPLIAMENTE DISTRIBUIDO DE LA DOMESTICACION EQUINA	19
IV.3) HISTORIA DEL CABALLO EN ESPAÑA	20
IV.4) EL CABALLO EN AMERICA	23
IV.5) HISTORIA DEL CABALLO EN ARGENTINA	24
IV.5.a) LOS BAGUALES	25
V) CONCEPTO DE RAZA	26
V.1) CABALLO CRIOLLO (CA)	26
V.1.a) Características Del Caballo Criollo Argentino	
V.1.b) Origen Del Caballo Criollo Argentino	26
V.1) PASO PERUANO (PP)	27
V.2.a) Características Del Caballo De Paso Peruano	
V.2.b) Universalidad De La Ambladura	28
V.2.c) Origen Del Caballo De Paso Peruano (PP)	29
V.2.d) Comparación Entre El Caballo Peruano De Paso (PP) Y El Paso Fino (PF).	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y METODOS	34
I) OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	34
II) PREPARACION DE LA MUESTRA.	34
II.a) Para Marcadores Moleculares (microsatélites).	
II.a.1) Método de extracción de ADN con Chelex a partir de sangre periférica	34
II.a.2) Método de extracción con DNA ZOL	35
II.b) Para Marcadores Bioquímicas	36
III) TÉCNICAS. III.a) Para Marcadores Moleculares (microsatélites)	36
III.a.1) Amplificación por PCR	
III.A.2) Caracterización de los loci analizados	36
IV) DETECCION DEL POLIMORFISMO. IV.a) Para Marcadores Moleculares (microsatélites).	38
Soluciones y materiales	
IV.b) Para Marcadores Bioquímicos. Poliacrilamida básica .	41
Soluciones utilizadas	

V) TINCIÓN.Soluciones y materiales	43
V.a) Para Marcadores Moleculares	
V.b) Para Marcadores Bioquímicos	44
Tinción	
VI) METODOLOGIA ESTADÍSTICA	46
VI.a) Consideraciones generales	
VI.b) Consideraciones teóricas	46
VI.b.1) Frecuencias génicas y genotípicas	
VI.b.2) Equilibrio de Hardy-Weinberg	47
VI.b.3) DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	47
VI.b.3.a) Índices De Fijación	
VI.b.4) Test Exacto Para Diferenciar Poblaciones	50
VI.b.5) DIVERSIDAD GENÉTICA	50
VII) ANÁLISIS DE PARENTESCO	52
V.9) DISTANCIA GENETICA	54
V.9.a.2) Filogenia De Los Individuos Como Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)	55
V.10) Asignación De Raza	55
RESULTADOS	56
I) DESCRIPCION DE LAS RAZAS EN ESTUDIO	56
I.1) POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS	56
I.1.A) ALBÚMINA (AL)	56
I.1.B) ESTERASA ALCALINA (ES)	57
I.1.C) POST ALBÚMINA (XK)	57
I.1.D) TRANSFERRINA (TF)	58
I.2) POLIMORFISMOS DE ADN DEL TIPO MICROSATELITE	59
I.2.A) HMS6	59
I.2.B) HMS7	60
I.2.C) AHT4	61
I.2.D) HTG6	61
I.2.E) HMS2	62
I.2.F) AHT5	63
I.2.G) HTG4	64
I.2.H) ASB2	65
II) COMPARACION DE LOS PPA CON LOS CA	65
II.1) NIVELES DE DIVERSIDAD GENETICA EN LOS POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS	
II.2) EN LOS MARCADORES MOLECULARES	66
II.3) COMPARACION CON RAZAS EQUINAS RELACIONADAS ANCESTRALMENTE	67
II.3.1) DISTANCIAS GENÉTICAS	67
III) DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	68
III.1.A) INDICES DE FIJACIÓN EN LOS POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS	
III.1.B) INDICES DE FIJACIÓN EN MARCADORES MOLECULARES	69
III.2) COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GÉNICAS Y GENOTÍPICAS	70
III.2.A) TEST EXACTO PARA DIFERENCIAR POBLACIONES EN POLIMORFISMOS BIOQUÍMICAS	
III.2.B) TEST EXACTO PARA DIFERENCIAR POBLACIONES EN LOS MARCADORES MOLECULARES	71

IV) MECANISMOS EVOLUTIVOS QUE DIFERENCIARON LAS RAZAS:	71
IV.1) CALCULO DEL EQUILIBRIO EN POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS	
IV.1.B) CALCULO DEL EQUILIBRIO EN POLIMORFISMOS MOLECULARES	72
V) GRADO DE DISCRIMINACIÓN DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS	72
V.1) ANÁLISIS DE PARENTESCO	
V.2) FILOGENIA CON INDIVIDUOS COMO UNIDADES TAXONOMICAS OPERACIONALES (OTUS)	73
v.3) Asignación de raza	73
DISCUSIÓN	74
I) PERFIL DE LAS RAZAS ANALIZADAS	74
I.1) POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS	
I.1.1) COMPARACIÓN CON DATOS PUBLICADOS DE FRECUENCIAS GENICAS EN LOS MARCADORES ESTUDIADOS EN DISTINTAS RAZAS EQUINAS	74
I.2) EN LOS MARCADORES MOLECULARES	75
II) EL ORIGEN DE LAS RAZAS AMERICANAS	76
II.1) PROPUESTA DE LA RELACIÓN HISTÓRICA DE LAS RAZAS EN ESTUDIO.	
III) COMPARACION ENTRE LAS RAZAS ANALIZADAS	78
III.1) DIVERSIDAD GENÉTICA	
IV) DIFERENCIACIÓN GENETICA	80
IV.1) INDICES DE FIJACIÓN	
V) ESTRUCTURA GENETICA	82
V.1) ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO DE H-W	
V.1.1) CONTRASTE DE LAS METODOLOGIAS UTILIZADAS	84
VI) PARAMETROS PARA PRUEBAS DE IDENTIDAD Y FILIACION EN LOS PPA Y EN LOS CA.	85
VI.1) ANÁLISIS DE PARENTESCO	85
VI.2) FILOGENIA CON INDIVIDUOS COMO UNIDADES TAXONOMICAS OPERACIONALES(OTUS)	86
VI.3) ASIGNACIÓN DE RAZA	87
CONCLUSIONES	88
TABLAS	90
FIGURAS	105
BIBLIOGRAFÍA	115

INTRODUCCIÓN

TÍTULO DEL TRABAJO

“ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN POBLACIONES EQUINAS DE ARGENTINA”.

Palabras clave:

equinos; marcador genético, polimorfismo; caracterización.

RESUMEN

El estudio de los caballos Paso Peruano Argentino (PPA) y los Criollo Argentino (CA) se fundamenta en que se trata de dos razas autóctonas muy difundidas y utilizadas con múltiples propósitos en dos regiones muy distintas de nuestro país. La determinación de los polimorfismos bioquímicos y los microsatélites han sido utilizados para estudiar la variabilidad genética en numerosas razas equinas.

Las técnicas empleadas fueron la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para los polimorfismos bioquímicos (Albúminas, Post- Albúminas , Esterasas y Transferrinas). Para los polimorfismos moleculares (AHT4, AHT5, HMS2, HMS6, HMS7, ASB2 y HTG6) se realizaron amplificaciones específicas de cada locus mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) seguida por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes teñidos con nitrato de plata.

Todos los marcadores proteicos y moleculares resultaron polimórficos en los PPA y en los CA, haciendo posible establecer el perfil genético de cada una de ellas.

Se evaluaron los posibles mecanismos evolutivos de diferenciación genética entre y dentro de las razas en estudio. Ambas razas presentan un exceso de homocigotas que se pone más aún de manifiesto cuando se analizan en forma conjunta, hecho que podría deberse a la deriva génica y la endogamia.

Desde el punto de vista del origen histórico, las evidencias disponibles establecen que los caballos evolucionaron en América. Los equidae se extinguieron hace 10000 años. Más tarde fueron reintroducidos por los conquistadores, existiendo diferentes criterios a cerca de esto. A este respecto en el presente trabajo se estableció una mayor relación, de las razas estudiadas, con los caballos Bereberes (BE) y los ponies españoles Asturcones (AS), que con los Pura raza española (PRE).

Por último se determinaron los valores de Poder de exclusión (PE) de cada sistema en particular y en conjunto para cada raza, con el fin de establecer parámetros para pruebas de identidad y filiación. Los sistemas de microsatélites resultaron más eficaces que los polimorfismos bioquímicos

I) INTRODUCCIÓN

I.1) Generalidades

La genética de poblaciones tiene por objeto investigar las leyes que gobiernan la estructura genética de las mismas, a través de las leyes mendelianas y otros principios genéticos; esto incluye el estudio de la variación genética dentro y entre especies para tratar de entender el proceso resultante de los cambios evolutivos a través del tiempo.

La existencia de variabilidad genética es una condición necesaria para evolucionar. De la observación de la naturaleza se constata que los seres vivos varían tanto entre especies como también dentro de ellas. Mientras que la variabilidad interespecífica es el tema central de estudio de la evolución, la variabilidad intra específica es tratada por la genética de poblaciones.

No es posible separar completamente estas dos áreas ya que en realidad ambas forman parte de una concepción global del proceso evolutivo. A través del desarrollo de la genética de poblaciones es posible clarificar las leyes que gobiernan los mecanismos de la evolución, que está dada, básicamente, por el cambio de las frecuencias génicas.

La historia de la genética de poblaciones está íntimamente ligada al desarrollo de las ideas evolutivas en biología. En un principio, esta variabilidad se estudiaba solo a nivel fenotípico; el desarrollo de los métodos moleculares ha permitido detectar variabilidad genética en el ácido desoxirribonucleico (ADN), corroborando que existe suficiente variabilidad para que las poblaciones puedan evolucionar. A pesar de esto, no es posible afirmar que toda esta variación tenga valor adaptativo. La medida de la variabilidad tiene un interés en si misma, independientemente de su valor adaptativo, ya que su cuantificación inter e intra poblacional y, el seguimiento generacional de las variantes permite describir la historia, hecho fundamental para entender la dinámica evolutiva de las especies. Como en el caso de la especie humana, la diversidad entre poblaciones ha sido utilizada para investigar su historia evolutiva (75). Las poblaciones aisladas generalmente desarrollan variantes genéticas distintivas, que pueden transmitirse a otras poblaciones sólo cuando hay movimiento de individuos entre poblaciones.

Distintas teorías han tratado de explicar la variabilidad:

La teoría de la evolución de Darwin constituye un ejemplo de abordar el fenómeno de la variabilidad en forma global. La idea simplificada *darwinista* de la evolución sería la descendencia con modificaciones de las distintas ramas o linajes de los seres vivos. La herencia (descendencia) y la variabilidad (modificación) son los dos pilares sobre los que descansa el mecanismo evolutivo. En el otro extremo se ubica la teoría neutralista de

Kimura (70), que sostiene que los cambios pueden ser tan frecuentes que la mayoría de ellos son selectivamente neutros.

Por otro lado el término diversidad genética aparece con mucha frecuencia en el contexto de conservación de recursos genéticos. Se acepta que la tasa de evolución en poblaciones naturales está limitada por la cantidad de variabilidad genética (Teorema Fundamental de la Selección Natural de Fisher) (45). Por lo tanto, los programas de gestión de recursos genéticos se dedican al mantenimiento de la variabilidad. Las poblaciones de animales domésticos autóctonos constituyen una fuente de biodiversidad, resultando de sumo interés conocer la estructura genética de dichas razas, ya que éstas están adaptadas a diferentes condiciones de cría, clima, geografía y, por ende, constituyen una fuente de variación para el mantenimiento de la biodiversidad.

I.2) LA VARIABILIDAD GENETICA: ORIGEN Y DETECCION

La variabilidad en los individuos puede estar dada por los siguientes mecanismos:

- Cambios puntuales
- Reordenamiento del ADN.
- Reestructuración cromosómica (inversión, translocación, delección, duplicación)
- Multiplicación de cromosomas completos (euploidía, aneuploidía)
- Recombinación.

En las poblaciones:

- Migración, selección, consanguinidad y deriva génica.

En la formación de las razas participarían en mayor medida los mecanismos de mutación génica y migración, por un lado; selección, consanguinidad y deriva, por otro. En el primero de los casos, la variabilidad poblacional aumentaría y en el segundo disminuiría. De existir un equilibrio entre estas fuerzas, obtendríamos un equilibrio de las frecuencias génicas y genotípicas. Dicho equilibrio se puede estimar a través del cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg, (G.H. Hardy, un matemático inglés, y W. Weinberg, un médico alemán), publicaron simultáneamente en 1908, un modelo matemático que demostraba que, bajo ciertas condiciones, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a la siguiente. Los factores que afectan el equilibrio génico serían: una base fundadora estrecha, poblaciones pequeñas y aisladas, la práctica de una intensa endocria y la existencia de un período de disminución del tamaño de la población (cuello de botella). Cualquiera fuera el motivo de la disminución

de la variación en una población, traería aparejado una pérdida de la posibilidad de adaptación a los cambios que pudieran presentarse.

I.3) VARIABILIDAD A DISTINTOS NIVELES

La detección de variabilidad a nivel externo (fenotipo) se basa en observaciones relativamente sencillas. Sin embargo, al estar altamente influida por el ambiente requiere de métodos estadísticos elaborados para interpretar los datos correctamente. En general, este tipo de caracteres muestra una distinción gradual entre sus estados y por ello se denominan caracteres cuantitativos. Estos resultan de la adaptación al medio, por lo tanto, presentan una gran presión de selección. Además, la variabilidad genotípica que determina rasgos diferenciales de raza están condicionados solo por unos pocos genes, por consiguiente un estudio de distancias entre poblaciones utilizando este tipo de marcadores estaría sobrestimado (21).

Los marcadores genéticos son características moleculares heredables, polimórficos y fácilmente detectable: existiendo tanto en la secuencia de ADN codificante (clásicos: polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos); como en la no codificante (marcadores moleculares). El desarrollo de estos permitió medir la variabilidad genética en forma directa, estableciendo frecuencias diferentes en distintas poblaciones de una misma especie (75).

I.4) USOS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Anteriormente al uso de los marcadores genéticos, la identificación de un individuo solo podía hacerse mediante el empleo de descripciones fenotípicas, a través del uso de siluetas de la cabeza y del individuo vistas de frente y de perfil, que se utilizaban para marcar remolinos, marcas, manchas, etc. Estos criterios son subjetivos, ambiguos, escasamente informativos y de herencia escasamente conocida, dados por la acción de muchos genes actuando simultáneamente. Por esta razón, se han desarrollado métodos de identificación a partir de marcadores genéticos. Para poder ser utilizados estos marcadores deben cumplir una serie de premisas:

- Ser loci correspondientes a caracteres cualitativos.
- No deben estar influenciados por el ambiente.
- Poseer herencia mendeliana sencilla.
- Estar presentes en el individuo en el momento del nacimiento.

- El análisis de los mismos no debe conllevar riesgo para el animal.
- Ser informativos.
- La metodología debe ser repetible y debe estar estandarizada.

La determinación de los polimorfismos bioquímicos y los marcadores moleculares ha sido utilizada para estudiar la variabilidad genética en numerosas razas equinas (97, 43, 98, 83, 100, 134, 38, 68, 4). Con lo cual ha sido posible trazar un perfil genético de cada una de ellas, así como determinar relaciones de ancestralidad (17, 18, 19, 32, 20, 21, 38, 28, 12).

Por otra parte, con el desarrollo del mapa genético equino (1^{er} Workshop Internacional de Mapeo Genético en Equinos; Lexington, Kentucky, 1995), posiblemente aparezcan marcadores asociados a patologías así como también a caracteres deseables.

Internacionalmente la búsqueda de marcadores genéticos para mejoramiento animal ha cobrado particular importancia en los últimos tiempos. La búsqueda no sólo se orienta a las mejoras productivas sino también a otros aspectos importantes, tales como análisis de la variabilidad entre razas, asociación con caracteres de producción, resistencia a enfermedades y conocimiento de la constitución genómica. (Comunidad Económica Europea -*Pig Map*; en los Estados Unidos -*National Animal Genome Research Program*).

I.5) HISTORIA DEL POLIMORFISMO

Antes del descubrimiento de los marcadores genéticos ubicados en regiones no codificantes del genoma, el término polimórfico se aplicaba a las manifestaciones fenotípicas de los genes codificantes. Con el descubrimiento de regiones variables no codificantes, el término se extendió a estos nuevos marcadores.

Existen numerosas definiciones para los polimorfismos genéticos; a saber: Según Cavalli-Sforza y Bodmer (30), los polimorfismos genéticos son la existencia en la misma población de dos o más alelos de un locus, cada uno con una frecuencia apreciable. Según Ford (48) el polimorfismo es la presencia simultánea de dos o más formas discontinuas en una especie, de manera tal que la menos frecuente de ellas no puede ser mantenida únicamente por mutación. Lucotte (79) define un locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0,99, siendo esto dependiente de los valores muestrales. Una definición más actual es la presencia de formas discretas y diferentes de un gen o carácter (mendeliano) con al menos dos fenotipos, ninguno de ellos con una frecuencia menor al 1% (125).

El primer estudio de polimorfismo genético fue realizado por Landsteiner (73) quien describió la variabilidad presente en grupos sanguíneos humanos. De esta manera, por primera vez, fue posible agrupar a los individuos en base a un criterio objetivo a través del uso de marcadores genéticos. Si nos referimos a los polimorfismos determinados a través de técnicas bioquímicas podemos considerar que las estimaciones de la variación genética de las poblaciones están basadas en las evaluaciones de la heterogeneidad de los productos de los genes estructurales, tales como enzimas y otras proteínas. Estos análisis están basados en el empleo de la electroforesis sobre geles de distintos medios soportes (celulosa, almidón, poliacrilamida). Combinando la electroforesis con métodos de tinción histoquímicos, Hunter y Market (59) desarrollaron la técnica del zimograma para identificar enzimas en extractos de tejidos.

Los estudios de la variación individual se extendieron a estudios de tipo poblacional con los que se puede medir consanguinidad, distancias genéticas entre poblaciones, relación de los marcadores genéticos con caracteres de importancia económica, etc. (18, 19, 97, 136, 126, 110). Estas técnicas hicieron surgir estudios teóricos y, en conjunto, llevaron a la formulación de la teoría neutral de la evolución molecular (69). Luego surgió el concepto de reloj molecular (139) que propone que las secuencias proteicas y de ADN evolucionarían estocásticamente con una tasa constante a lo largo del tiempo. Por lo tanto, es posible ubicar temporalmente eventos evolutivos correlacionando la distancia genética con el tiempo.

I.5.a) El Polimorfismo Proteico

El polimorfismo proteico ó bioquímico comprende un conjunto de variantes proteicas enzimáticas y no enzimáticas que se identifican por medio de la electroforesis. La electroforesis utiliza la corriente eléctrica para separar las moléculas embebidas en un medio de soporte como geles de almidón, agarosa ó poliacrilamida. Las proteínas son moléculas con carga positiva o negativa lo cual le confiere capacidad de migración cuando son sometidas a un campo eléctrico. Las proteínas a pH alcalino presentan carga propia negativa por lo que migran del ánodo al cátodo (62). Detecta proteínas séricas y eritrocitarias es una técnica directa que permite la visualización de los productos de los genes en un gel. La interpretación es sencilla ya que la proteína presenta tantas bandas (electromorfos) como alelos posea: una si es homocigota y dos si es heterocigota, dado que cada alelo dirige la síntesis de una cadena. Las proteínas son codificadas por genes estructurales y cada variante electroforética de una proteína es un alelo de ese gen. Por

lo tanto, los alelos son codominantes, permitiendo establecer el genotipo a partir del fenotipo (21).

I.5.a.1) El Polimorfismo Proteico En Equinos

La Sociedad Internacional de Genética Animal, (*International Society of Animal Genetics*, ISAG), reconoce 16 sistemas de polimorfismos proteicos en equinos, pero no todos son utilizados ya que presentan diferentes requerimientos técnicos. En equinos de la raza Criolla Argentina, el empleo de estos marcadores ha permitido iniciar su caracterización, que evidenció un alto grado de variabilidad (100) y permitió establecer relaciones genéticas con razas ancestrales (101).

Albúmina (Al)

La Al es una proteína globular con un PM de 66.000 daltons y es la principal componente del suero. Cumple diversas funciones tales como: mantenimiento de la presión osmótica y transporte de iones y hormonas. Es una de las más abundantes, constituyendo el 35-50% de las proteínas plasmáticas. Es sintetizada en el hígado y catabolizada por varios tejidos

Fue descrita en equinos, presentando inicialmente tres fenotipos determinados por dos alelos: A (anódico) y B (catódico). Actualmente, se reconocen tres variantes alélicas, las ya mencionadas y la variante I. El gen que la codifica se encuentra ubicado en el grupo II de ligamiento equino (66).

A1b glicoproteína (A1B ó Xk)

Es una α -globulina que migra al frente de las globulinas (67). Presenta tres alelos codominantes, F, K y S. Que pueden ser detectados en geles de poliacrilamida (66).

Braend describió el polimorfismo de este sistema en equinos en 1970 (23). Este sistema se llamó post-albúmina hasta que Bowling (17) determinaron que con la técnica de *immunoblotting* usando antisuero humano a1b-glicoproteína era idéntico a la Xk. El gen que codifica para A1B está localizado en el grupo de ligamiento IV en el cromosoma 10 (138).

Carboxilesterasa (Es)

Corresponde a un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en los tejidos y con un gran espectro de especificidad. Ésta es una enzima que cataliza la reacción ester carboxílico + agua, dando alcohol y carboxilato. Existen evidencias de que esta enzima sería una proteína inhibidora de proteasas y que la actividad esterásica sería una actividad residual de la proteasa unida a ella (84).

Las características fisicoquímicas de algunas esterases equinas fueron estudiadas por Kingsbury y Masters (71) que encontraron dos formas moleculares: una grande de 165.000 unidades de peso molecular y otra pequeña que tiene la mitad de ese peso molecular probablemente monómeros de la primera. Gahne (50) estudió las Es en geles de almidón detectando tres alelos: F (rápida), I (intermedia) y S (lenta). Se describió un alelo silencioso que al ser puesto de manifiesto por inmunofluorescencia reveló vestigios de la enzima indicando baja actividad de la misma (46).

Transferrina (Tf)

La transferrina es una glicoproteína que transporta iones de hierro en el plasma (62). Su polimorfismo fue descrito por primera vez en equinos por Braend y Stormont (23) en geles de almidón. Identificaron cinco alelos: D, F, H, O y R. Cuando se cambió la solución tampón a pH 6,6 los alelos O y R comenzaron a migrar más lentamente que los restantes, y apareció una segunda banda después de F1 denominada F2. Los demás alelos fueron obtenidos con los geles de poliacrilamida, que hicieron posible identificar dos bandas H: H1 y H2 (9). El alelo J se describió en la raza Andaluza (3). Actualmente, son detectados 13 alelos: D, D2, E, F1, F2, F3, G, H, H2, J, M, O y R por lo que resulta uno de los sistemas proteicos más polimórficos (18).

I.5.b) El Polimorfismo Molecular

El ADN es la fuente primaria de variación y cualquier mutación a este nivel puede ser puesta de manifiesto mediante técnicas moleculares, utilizadas para evidenciar polimorfismos, tanto de las secuencias codificantes (5 a 10% del genoma) como no codificantes (90 a 95 % del genoma). Éstas últimas comprenden ácido desoxiribonucleico (ADN) de copia única, ADN heterodisperso y ADN repetido en tándem (ADN satélite, telómeros, minisatélites y microsatélites).

La primera técnica para identificación de diferencias a nivel del ADN se desarrolló en la década del 60 y fue la de hibridación ADN-ADN. Se basa en las propiedades de reasociación de las cadenas simples de ADN y se aplicó a estudios taxonómicos y de evolución molecular (120).

En la década del '70, surgieron las técnicas de determinación de las secuencias de ADN (85, 114).

Las técnicas de análisis del ADN por marcadores moleculares en la década de los '80, permitieron grandes avances en cartografía y caracterización de un gran número de genomas (49, 11, 8).

Entre las mismas puede citarse en primer lugar, a el descubrimiento de las enzimas de restricción (proteínas bacterianas que digieren el ADN de doble cadena al reconocer una determinada secuencia) (86). El empleo de las mismas dio origen al estudio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y a otra técnica denominada *Southern blot* que consiste en la detección de sitios de restricción (presencia ó ausencia) mediante la utilización de una sonda (13, 55).

En segundo lugar, 1985, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simplificó los estudios moleculares (89). Se basa en la amplificación *in vitro* de una secuencia determinada de ADN, limitada por un par de cebadores u oligonucleótidos específicos, mediante la utilización de una polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa). Con ella fue posible el desarrollo de una gran variedad de técnicas para aplicar a distintas situaciones(106): la *Artificial create restriction site* (PCR-ACRS) consiste en la creación de sitios de restricción artificiales para la detección de variantes alélicas; *Allele specific oligonucleotide* (PCR-ASO) se basa en la amplificación de una región polimórfica y su posterior hibridación con sondas específicas ; *Specific sequence primer* (PCR-SSP) basada en la utilización de un cebador general y otro específico para cada uno de los alelos del locus en estudio; *Single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) se utiliza para detectar mutaciones puntuales en base a las diferencias en la conformación de cadenas simples; *Random amplified polymorphic ADN* (PCR-RAPD) se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN mediante la utilización de oligonucleótidos de pequeño tamaño en condiciones de hibridación relajadas (106).

A partir de la identificación de secuencias repetidas fue posible desarrollar sondas capaces de hibridar con ellas. Estas secuencias están caracterizadas por tener un motivo que se repite un número determinado de veces. Entre ellas están las secuencias denominadas minisatélites que poseen una longitud de 0,1 a 2 Kb y el motivo va de 9-

24pb. El uso de sondas correspondientes a secuencias de este tipo permitió el desarrollo de la técnica “*fingerprinting*” (64).

I.5.c) Ventajas De La Tipificación Por Marcadores Moleculares Sobre Los Clásicos

El ADN es un material biológico muy estable que posee la característica de presentar una secuencia única para cada individuo. En consecuencia, la variabilidad individual puede ser enorme. Además se puede obtener de diversos materiales biológicos como sangre, semen, pelos, saliva, restos cadavéricos, huesos, etc.

I.5.d) ADN mitocondrial (ADNmt)

Las mitocondrias son organelas que se encuentran en el citoplasma de la células aeróbicas e intervienen en el mecanismo de respiración celular: Estas organelas contienen en su interior un número variable de moléculas de ADN propio denominado ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt es circular, haploide, monoclonal y carece de recombinaciones, segregándose de madre a hijo en forma directa. En forma similar con lo que sucede en el cromosoma Y en los varones, la peculiaridad hereditaria del *ADN mt* lo hace útil para estudios de relación materno-filial.

En base a la secuencia completa del genoma mitocondrial en humanos, se describió una región como el bucle D (*D-Loop*), donde existen dos dominios altamente polimórficos debido a sustituciones de nucleótidos en diversas posiciones a lo largo de una secuencia conservada. Gracias al polimorfismo allí existente, dichas secuencias se utilizan como marcadores polimórficos. Otra característica del *ADNmt* es el gran número de copias (de 2 a 10 en el hombre), lo cual facilita el procesado de la muestra en aquellas que están muy degradadas.

El análisis del *ADNmt* se realiza por comparación de secuencias con diferentes métodos: *RFLP*, *SSCP*, *sondas ASO* y secuenciación (132).

I.5.e) Nuevas Metodologías

I.5.e.1) Polimorfismo De Nucleótido Simple (SNP)

El polimorfismo de un nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) es un pequeño cambio genético ó variación de un nucleótido que puede ocurrir en la secuencia de ADN de un organismo. En general, se hallan fuera de las zonas codificantes, por lo

que no producen cambios físicos en los individuos, salvo aquellos cambios que están involucrados en el desarrollo de algunas patologías, o que puedan intervenir en la respuesta a determinado fármaco ó a regímenes. Con el progreso de las técnicas empleadas, se ha llegado a comparar regiones seleccionadas del ADN de múltiples individuos que comparten un rasgo en común. En cada test, el resultado muestra una diferencia física en las muestras de ADN donde se detecta un SNP. En no mucho tiempo, los clínicos podrán evaluar a sus pacientes para la susceptibilidad a una enfermedad, analizando sus ADN en la búsqueda de determinados patrones de SNP. También, es potencial el uso de SNP's para el estudio de la respuesta a las drogas y la individualización de la medicina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.5.e.2) ESTs (*Expressed Sequence Tags*)

Son pequeñas piezas de ADN de 200 a 500 nucleótidos de largo que son generadas por la secuenciación de uno o ambos extremos de un gen expresado en células, tejidos y órganos de diferentes organismos. Se usan para detectar los genes en los cromosomas por hibridación. Son herramientas muy poderosas para el estudio de enfermedades hereditarias. Así por ejemplo se han conseguido aislar algunos genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de colon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.5.e.3) *Microarrays*

Los *microarrays* son pequeños soportes sólidos donde las secuencias de diferentes genes (ADN ó ADNc) son inmovilizados en localizaciones fijas. En general se usa como soporte un portaobjeto, chips siliconados ó membranas de nylon. Al cual se lo expone a una mezcla de hibridación que contiene ADNc de ARNm expresados por la célula, por lo tanto se lo utiliza para analizar expresión génica. Su importancia radica que en un pequeño espacio se analizan un gran número de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.5.d) *Microsatélites (Short Tandem Repeats, STR's)*

Los microsatélites (STR's) son secuencias de bases en el ADN que se repiten en tándem. Dichas secuencias pueden ser di -tri - ó tetranucleotídicas. Frecuentemente son

del tipo CA/GT y están representadas muchas veces en diferentes lugares (loci) del genoma de los mamíferos. El número de repeticiones posee herencia mendeliana.

Son muy polimórficos y, en general, presentan numerosos alelos por locus. Poseen bajos índices de mutación (10^{-4} - 10^{-5} / generación). Hay entre 50-100.000 loci estudiados hasta hoy, en diferentes especies. Son muy informativos para el análisis de flujo génico e hibridación (111). En equinos han sido descritos hasta la actualidad 628 microsátélites, (43, 129, 24, 83, 10, 7, 25, 131, 53, 76, 77, 108, 12, 128) . De los cuales, 489 se conoce su ubicación en el genoma (123, 52, 118, 74, 53, 77). Se han determinado grupos sinténicos utilizando microsátélites en numerosos heterohíbridomas (7). Los microsátélites son marcadores tipo II y los genes tipo I. Comparando el mapa que se elabora con marcadores del tipo II el cual progresa rápidamente, el mapa equino con marcadores del tipo I se encuentra en un estadio muy primitivo (51).

Aunque en el genoma equino no se ha caracterizado tan exhaustivamente como en el de otras especies de animales domésticos (bovino, ovino, cerdo, aves de corral), un estudio a través del uso de células somáticas híbridas permitió asignar 240 marcadores tipo II (7).

El análisis de microsátélites se ha utilizado en el mapeo de genomas de numerosas especies, como por ejemplo en ratones, donde se han detectado 300 microsátélites que cubren aproximadamente el 99% del genoma con una separación promedio de 4,3 cM (centimorgans) (40). En ratas se han descrito 100 marcadores con su localización cromosómica (116). En ambos casos algunos de ellos se han asociado a con enfermedades tales como hipertensión (58, 61) y autoinmunidad de tipo I (126). Incluso se han utilizado en material de museo piel de un ave de 130 años de antigüedad (42).

En producción animal, los microsátélites han sido utilizados en bovinos para estudios poblacionales (5), en mapas de ligamiento en ganado vacuno (11; 8), en asociación con loci de caracteres cuantitativos (QTL) (106), en conservación, etc. Desde su descubrimiento, se han convertido en los marcadores moleculares de elección, ya sea tanto para verificación de parentesco y fenómenos de ligamiento, como para el análisis de la constitución del genoma.

El genoma humano, en general, contiene un STR tri ó tetramérico cada 20 Kb y casi la mitad de los STR's estudiados son polimórficos en cuanto al número de repeticiones que contienen. En el cromosoma X, estos mismos STR's se encuentran cada 300 a 500 kb (41). Han sido utilizados para estudios de evolución y estructura genética de poblaciones humanas (29).

En el presente estudio fueron utilizados ocho microsatélites equinos: HMS6, HMS7, AHT4, HTG6, HMS2, AHT5, HTG4 y ASB2. Todos son dinucleotídicos y pertenecen al conjunto de marcadores recomendados por la ISAG para identificación de equinos. Por estudios realizados en una gran cantidad de muestras de equinos (21) fue posible determinar que los eventos de mutación son raros en estos microsatélites y estarían dados por fenómenos de *slipagge* durante la replicación cromosómica (80). Así, en el sistema AHT4 se reportó una tasa de entre 0,01-0,02% por generación, similar a lo reportado en ratones 10^{-4} y humanos ($4,5 \times 10^{-4}$), (72). Un valor <0,2% de mutación puede ser aceptable, (<http://www.aabb.org>). Por lo tanto, los valores observados en los microsatélites equinos son aceptables para chequear filiaciones

Para explicar la variación observada en los microsatélites, la genética de poblaciones ha propuesto dos modelos que se ajustan, en diferente grado, a los cambios mutacionales producidos en ellos. El modelo de los alelos infinitos (*Infinite Allele Model, IAM*) explica la variación genética observada como surgida a partir de mutaciones puntuales (95). De esta forma, el número de alelos por locus sería enorme, ya que cada nucleótido que compone un gen podría mutar en alguna de las 4 bases nitrogenadas (componentes del ADN). Cada variante mutada tendría igual probabilidad de surgir, dando infinidad de alelos posibles siendo poco probable que un alelo mute para originar otro ya existente en la población. La distribución de frecuencias alélicas para loci que codifican proteínas, suele ajustarse a este modelo. Este marco teórico condujo luego a Kimura (1983) (70) a desarrollar la teoría de evolución neutral.

El modelo de mutación por pasos (*Stepwise Mutation Model, SMM*), (94) fue introducido como teoría alternativa para explicar la variación observada. A través de la electroforesis, se observó que las distribuciones alélicas de ciertos loci presentaban un alelo más frecuente con movilidad intermedia y varios alelos menos frecuentes distribuidos simétricamente a los lados del alelo modal. Esto sugirió un modelo de mutación que agrega o sustrae una sola unidad al alelo original con igual probabilidad. En loci del tipo microsatélite se asume que los alelos de tamaño semejante son menos diferentes entre sí, en términos de pasos mutacionales. Pero, también propone que no existen limitaciones para el tamaño de los alelos. Sin embargo, los alelos se acotan entre 5 y 50 repeticiones. Esto estaría dado como consecuencia de la regulación de cambios de repeticiones. Las mutaciones que conducen a una expansión alélica se producen a una tasa constante para todos los alelos de un microsatélite. Por otra parte las mutaciones que producen una contracción ó disminución en el número de repeticiones

aumentan su tasa exponencialmente con la longitud del alelo (141). En general, la distribución de alelos de los microsatélites se adapta al modelo SMM (119; 121; 41).

La aceptación teórica de los microsatélites como herramientas para el estudio de variabilidad y evolución, ha significado que numerosos investigadores los apliquen en varias especies. Aunque la mayoría de los estudios se llevaron a cabo en humanos, no obstante también se realizaron en especies como bovinos, ovinos, chimpancés, tortugas marinas, lobos, osos polares y abejas (80).

IV) IMPORTANCIA DE ESTE TIPO DE ESTUDIO EN EQUINOS ARGENTINOS.

La importancia del estudio de razas autóctonas desde el punto de vista de los marcadores genéticos ha sido puesta de manifiesto por el programa mundial para la ordenación de recursos genéticos implementado por la FAO. Dentro de dicho programa está el Proyecto Mundial de Investigación para la Determinación de la Diversidad de los Animales Domésticos (MoDAD), que emplea técnicas moleculares (microsatélites) para establecer el alcance de la diversidad cuantificando la distancia genética entre distintas razas, sobre la base de las diferencias de sus composiciones genéticas.

Este programa está dirigido, principalmente, a especies en peligro de extinción y a conservar aquellas especies o razas autóctonas adaptadas a diferentes condiciones ambientales. Algunas poseen una elevada variabilidad genética, resultando de interés como fuente de variación y mejora futuras.

El estudio mediante marcadores genéticos de razas equinas criadas en nuestro país, permite conocer su estructura, así como también establecer relaciones entre ellas (distancias genéticas) y con las mismas razas en otros países, corroborando los datos históricos del origen de cada una de ellas.

Por otra parte, la importancia en el mercado ganadero argentino de los caballos es gravitante. Según datos de 1980, en nuestro país existen 2.050.000 cabezas de ganado equino. En 1995, se produjeron 18.000 nacimientos considerando sólo los animales inscriptos en diferentes asociaciones. En el mismo año ingresaron \$25.000.000 en concepto de exportaciones de caballos de tipo deportivo. Asimismo, en exportación de carne equina se alcanzaron \$66.000.000. (20^{mo} Congreso Argentino AAPA, 1996).

El estudio de las razas Paso Peruano Argentino (PPA) y Criollo Argentino (CA) radica en que son autóctonas muy difundidas y utilizadas con múltiples propósitos en dos zonas muy distintas de nuestro país. La primera, básicamente en la zona del NOA, se adapta perfectamente a las condiciones de clima y terreno característico de esa región.

Los CA, ampliamente difundidos por todo el país, poseen características de cría únicas dada su rusticidad. En este estudio en particular, la muestra fue tomada en dos poblaciones de la provincia de Buenos Aires (Chascomús y Coronel Vidal). En los caballos criollos se hace una selección orientada a un tipo de caballo funcional para múltiples tareas, además de la selección de tipo morfológica, lo cual involucra condiciones de carácter, docilidad, resistencia y agilidad determinadas. Los caballos de Paso Peruano Argentino se seleccionan básicamente por la capacidad de amblar (andar con la pata y mano del mismo lado en forma simultánea). La presencia del término en los movimientos de las manos fija un objetivo netamente funcional, único y preciso de selección.

Por lo expuesto, es esencial comenzar el desarrollo de estudios de caracterización poblacional en dichas razas, para tener una idea inicial con respecto a su acervo génico. Además, debido a los diferentes objetivos de cría fijados, se espera encontrar diferencias genéticas entre las mismas.

Las referencias bibliográficas establecen que los caballos evolucionaron en América y luego, no se sabe con precisión el motivo, desaparecieron y fueron reintroducidos por los conquistadores, estableciéndose centros de cría. Existen diferentes criterios sobre el tipo de caballo introducido por los conquistadores. En el presente trabajo se pretende establecer cuál de dichas posturas resulta más aceptable a partir de las relaciones que surjan entre las razas estudiadas y otras relacionadas históricamente.

Los marcadores analizados son los polimorfismos bioquímicos (Al, Xk, Es y Tf) y los microsatélites (AHT4, AHT5, HTG4, HTG6, HMS2, HMS6, HMS7 y ASB2). Los primeros pertenecen a genes estructurales y por lo tanto, sus niveles de polimorfismos son limitados. Por otra parte, los microsatélites son marcadores del ADN y pertenecen a regiones no codificantes del genoma por lo que sus niveles de variación son muy elevados. Es de esperar que los niveles de discriminación, tanto a escala poblacional (árboles filogenéticos) como los poderes de exclusión sean mayores en los microsatélites.

III) ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS EN RAZAS EQUINAS LATINOAMERICANAS.

Hay antecedentes en el estudio de microsatélites en caballos de Cuarto de Milla brasileros, en la tesina de maestría de Sanches do Amaral Gurgel (112). Como antecedentes de estudios de polimorfismos en razas equinas autóctonas

latinoamericanas podemos citar la caracterización de los equinos de raza criolla Argentina mediante polimorfismos bioquímicos de Peral García (99); Y el estudio de caballos de la raza criolla brasilera mediante polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos (133). También, estudios mediante polimorfismos del ADN para la caracterización de caballos criollos del Uruguay, a través de los microsatélites (68).

IV) HISTORIA DEL CABALLO

Reino: <i>Animalia</i>
Phylum: <i>Chordata</i>
Clase: <i>Mammalia</i>
Orden: <i>Perissodactyla</i>
Familia: <i>Equidae</i>
Género: <i>Equus</i>
Especie: <i>caballus</i>

Clasificación zoológica del equino.

IV.1) Familia Equidae

Esta familia posee un género con ocho especies. Las incluidas en el género son *Equus asinus* (Ass), *Equus burchelli* (Burchell's o Plains Zebra), *Equus caballus* (caballo doméstico), *Equus caballus przewalskii* (caballos salvajes przewalskii o caballos salvajes de Mongolia), *Equus grevyi* (zebra Grevy's), *Equus quagga* (quagga), *Equus zebra* (zebra de la montaña), *Equus hemionus* (onagers de Asia).

Los équidos domésticos se hallan distribuidos por todo el mundo, los salvajes en el este de África y este de Mongolia. Habitan todo tipo de terrenos desde praderas hasta desiertos. Los équidos son en general animales de cráneo grueso y cuerpo redondeado. Poseen abundante pelo, siendo el largo del mismo muy variable. La mayoría de las especies tienen crines en el cuello. Algunos son veloces corredores por lo que poseen patas largas con un solo dedo funcional. Los mismos caminan con las puntas de sus pies (ungulados). En la mano, el radio y cubito se encuentran unidos, y este último es muy reducido por lo que todo el peso recae sobre el radio. En la pata, la tibia soporta el peso y el peroné está reducido y fusionado con la tibia. Los équidos salvajes son animales grandes con un peso que varía entre 200-500 kg. Sus descendientes domésticos son más variables, con pesos que van de 140 a 1000kg.

Los équidos poseen una fórmula dentaria de 40-42 dientes, con la fórmula dental 3/3, 1/1, 3-4/3, 3/3. Los caninos son vestigiales o están ausentes en las hembras. Las

muelas poseen una estructura compleja. La edad de los équidos es estimada por el grado de desgaste de los incisivos, pero la comida abrasiva puede jugar un rol muy importante en la precisión de este cálculo.

Las calaveras de los équidos son largas debido a que los huesos nasales son largos, estrechos y proyectados hacia adelante. La orbita está ubicada bien atrás en la calavera, detrás de los dientes y los procesos post-orbitales son anchos. Las bullas timpánicas son pequeñas.

Las hembras presentan celos varias veces en el año durante la época cálida. La mayoría de las especies dan una cría cada dos años luego de una gestación de 11 a 13 meses. El destete ocurre a los 6-8 meses y las crías están sexualmente maduras alrededor de los dos años de edad. Las posibilidades de vida van de 25 a 35 años.

Todos los équidos son relativamente alertas, corredores y, generalmente, huyen del peligro. También se defienden pateando y a veces mordiendo. Los équidos son activos durante el día y la noche pero principalmente durante el crepúsculo. Son herbívoros, la mayoría bebe agua a diario, aunque pueden soportar períodos sin beberla.

En libertad son polígamos y viven en grupos familiares ocupando amplios territorios. La comunicación de estados de ánimo y otras informaciones se llevan a cabo con cambios en las posiciones de las orejas, boca y cola. También, poseen comunicación vocal a través del relincho en caballos y cebras.

Son numerosos los hallazgos de fósiles equinos; los que permitieron establecer el cambio gradual evolutivo, fundamentalmente en dientes y miembros. El primer caballo, *Hyracotherium* (= *Eohippus*), perteneció al eoceno temprano y se supone derivó de un *condylarth*. Era un caballo pequeño con dientes relativamente simples, cuadrados y un pequeño metacarpal. Durante el oligoceno, el mioceno y el plioceno, los caballos crecieron en tamaño; sus dedos laterales, se acortaron y perdieron contacto con el suelo; el cerebro creció y los molares se volvieron más complejos. El primer caballo que pastaba fue el *Merychippus*, que vivió en el mioceno. Sus molares poseían unas fuertes y desarrolladas superficies oclusales. Tres de los dedos de cada pata contactaban con el suelo. El primer caballo que poseyó solo un dedo funcional, fue el *Pliohippus*, que existió en el mioceno tardío. El género *Equus* apareció durante el plioceno.

Los caballos se diseminaron y habitaron temporalmente praderas y estepas en América del Norte, Asia, África y Europa. Norte América fue el centro de la evolución equina. Luego, desaparecieron por completo de América aproximadamente durante 8000 años, para recién regresar con los conquistadores europeos hace quinientos años atrás. (<http://www.flmnh.ufl.edu/NATSCI/VERTPALEO/FHC/fhc.htm>)

IV.2) ORIGEN AMPLIAMENTE DISTRIBUIDO DE LA DOMESTICACION EQUINA

Según A. Cabrera (26), las antiguas hipótesis sobre un único centro primitivo de domesticación (Arabia, para algunos autores y Asia para otros), desde los cuales se habría extendido el uso al resto del mundo, han sido descartadas. Ya que sostiene que no es raro que dos o más pueblos distintos hayan pensado en domesticar al caballo. Cita un centro de domesticación en Siberia sud-occidental unos 5000 años antes de Cristo, y además las pinturas rupestres prueban que existían caballos domésticos antes de iniciarse la época neolítica en el sur de España. Y un tercer centro en el norte de África, en algún lugar de donde hoy es el Sahara, pero sin datos sobre la época de desarrollo. El hecho es que, si bien la domesticación se llevó a cabo en el viejo mundo, el desarrollo de la especie se produjo en América, donde se extinguió mucho antes que el hombre llegase a alcanzar un grado de cultura preciso como para domesticarlos.

Vilá y colaboradores en el 2001 (132) publicaron un artículo sobre este tema en el cual postulan que existen dos hipótesis alternativas acerca del origen de la domesticación equina, a partir de razas salvajes:

-Una dice que el origen de domesticación fue en pocos lugares (restringida), que implicaría una selección multigeneracional. La otra postula que la domesticación se produjo en muchos lugares, por lo tanto, los primeros caballos no representan un acervo genético altamente modificado por la selección genética. Se desarrolló un estudio para probar cuál de estas teorías era cierta sobre la base del estudio del DNA mitocondrial (DNAMt) que es ADN de herencia materna. Si la primera era la correcta la diversidad del DNAMt estaría limitada a pocas líneas fundadoras y aquellas adicionadas por efecto de las mutaciones. En cambio si la segunda era cierta, se esperaba una variación mayor a las encontradas en poblaciones salvajes.

Se encontró que las razas modernas equinas no formaban un grupo monofilético con respecto a sus progenitores salvajes, como se esperaría si provendrían de un grupo fundador limitado. La falta de *clades* filogenéticamente soportados y la presencia de numerosas líneas maternas, sugieren una masiva e inesperada retención de líneas maternas ancestrales indicando claramente la utilización de un gran número de caballos salvajes como fundadores de las razas actuales del caballo doméstico.

Aunque el origen del caballo doméstico incluyó la incorporación de numerosas líneas maternas, el desarrollo de razas fenotípicamente distinguibles puede ser un proceso distinto caracterizado por un número limitado de animales fundacionales y

cruzamientos restrictivos. Consistente con eso, el intercambio limitado entre razas encontró que los haplotipos difieren significativamente. Sin embargo, las secuencias encontradas en las razas modernas y las razas antiguas nunca definen un grupo monofilético, como sería de esperar si todas pertenecieran a un grupo fundacional limitado en número. Además, la diversidad genética dentro de las razas es alta, tanto en las razas modernas como en las antiguas.

Además, se realizó un estudio con microsatélites sobre el mismo grupo de animales, y revelaron marcadas divergencias entre las razas. Los individuos de la misma raza se agrupaban en un mismo conjunto (*clúster*). Estos resultados demuestran que la deriva génica materna ha dominado el intercambio genético entre razas, y que el tamaño efectivo de la población es mayor en hembras que en machos, lo que es consistente con la práctica común actual de criar razas seleccionadas con un padrillo que se cruza con 15 a 20 yeguas.

Por registros fósiles, se sabe que los caballos salvajes estaban muy distribuidos por la estepa de Eurasia, durante el paleolítico temprano (hace 35.000 a 10.000 años); pero en muchas regiones desaparecieron de los registros fósiles hace 10.000 años. Se encontraron numerosos restos en el sur de Ucrania y Kazajistán de hace 6000 años atrás, que por cierto desgaste de los dientes se sugiere que eran caballos que habían sido montados. Al comienzo de la edad de hierro, los caballos salvajes comenzaron a declinar y solo una probable población salvaje de caballo de Przewalski se conserva hoy en día.

De acuerdo con los datos arqueológicos los animales salvajes capturados de grandes áreas geográficas eran usados como medio de transporte y alimento. Cuando las poblaciones salvajes declinaron por la explotación o cambios ambientales, se desarrolló la práctica de la cría en cautiverio, permitiendo que numerosas líneas ancestrales maternas estén integradas al pool genético del caballo doméstico actual.

Mirol y colaboradores (87), realizaron una investigación sobre el caballo criollo Argentino, Paso Peruano Argentino y su relación con razas españolas a través de la porción del *D-loop* del ADN mitocondrial. Establecieron que los caballos criollos compartían dos haplotipos con los Paso Peruano Argentino y un haplotipo (el más común en los CA) con los caballos andaluces, lo que indicaría una estrecha relación entre ambas razas. Sin embargo, los análisis filogenéticos no mostraron grupos monofiléticos. Esto podría ser interpretado como una mezcla de ancestros de los caballos sudamericanos en concordancia con las numerosas líneas maternas ancestrales en los caballos modernos, citadas en el trabajo de Vilá.

IV.3) HISTORIA DEL CABALLO EN ESPAÑA

Existen diversas corrientes de opinión en cuanto a las características del caballo español del tiempo de la conquista:

- A. Cabrera (26) propone que en la época de la conquista de América (siglo XV) en España terminaba el dominio de los moros, denominados genéricamente árabes por su idioma, pero representados por grupos mahometanos que habitaban la berbería o costa sur del Mediterráneo, formada por Marruecos, Argelia, Túnez y parte de Libia. Desde el siglo VII, los moros trasladaron a la península una parte muy considerable de su cultura, que se manifestó claramente por el idioma, la arquitectura y en costumbres que aún continúan vigentes, no solo en España sino también en América. Dentro de ese aporte llegó a España el caballo berberisco, propio de la zona norte de África. Según diversos autores se incorporaron 300.000 ejemplares. Fruto de este aporte, el caballo español se transformó, dándole uniformidad de tipo, excepto en el norte de España, que resistió la invasión, donde se conservaron las jacas navarras, asturianas, losinas y el caballo Asturcón.

Otra característica de la invasión mora (26) fue que los moros cabalgaban caballos machos enteros facilitando la cruce con yeguas autóctonas. Además de los caballos, los españoles adoptaron características de la equitación, como cabalgar con los estribos cortos, usar freno de alto puente, emplear barbada de aro de hierro, no castrar a los caballos y no cabalgar en yeguas. Se estableció un centro de producción equina en Andalucía y la ocupación se extendió durante 780 años.

La confusión de decir que los caballos españoles tienen sangre árabe, surge del hecho de llamar árabe a todo lo que pertenece al Islam. Pero los invasores eran berberiscos y los caballos también.

Fruto de lo expuesto, el caballo español resultante de esa época era chico, mesomorfo, cerca de la tierra, cabeza corta, perfil recto ó convexo y hundido en los nasales. No era deseable el perfil acarnerado. La caja amplia, pecho ancho, cuello musculoso y corto, grupa redonda y en declive, cola insertada baja. Estas dos últimas características son típicas del caballo berberisco. Los colores de capa eran zaino, doradillo, bayo cabos negros, colorado, overo y tobiano. En las pinturas de Tiziano, Rubens y Clouet se observa este tipo de caballo.

En consecuencia, los caballos de la conquista provenían de las planicies de Córdoba (España), ya que era un corto camino a Cádiz. Y también de Sevilla, San Lucar y Puerta de Santa María; Los cuales eran los principales puertos de embarque para las Indias (América). Por lo tanto, los caballos en Sud-América eran muy similares a los caballos españoles (26, 34).

Continúa el mismo autor citando que el caballo español de los siglos X a XVI era usado como mejorador de razas. Este tipo de caballo se perdió actualmente en España por los cruzamientos a los que fue sometido. Al comenzar el siglo XVII, deseando conseguir un caballo de gran talla para tirar carruajes, se usaron reproductores frisonos y daneses. Durante la dinastía Borbón se trajeron caballos napolitanos. La invasión francesa de 1808 acaba con lo poco que quedaba del caballo español, ya que los franceses ordenaron castrar a los padrillos que quedaban en Andalucía. Todos estos cruzamientos dieron origen al caballo andaluz moderno, de cabeza pesada, perfil convexo y escaso fondo.

Por otro lado, en la centuria diecisiete el uso de caballos trotadores se incrementó. Se comenzaron a construir caminos y a utilizar vehículos tirados por caballos. Asimismo, se inició la cría de ganado vacuno, para lo cual era más útil el caballo trotador que el de paso. Simultáneamente se hicieron populares las carreras de caballo, otra actividad vedada para los caballos de paso. Por lo que resultó que al principio del siglo era más popular el caballo de paso y hacia finales del mismo lo sucedió el caballo trotador.

Hasta mediados del siglo XVII en España, se distinguían más que razas castas o familias. Así, al caballo de andar si su talla era por lo menos de 1,46 m se lo denominaba palafrén, si estaba cerca de esa altura se lo denominaba hacanea. Y si era más pequeño hacia ó jaca (sinónimo de *cob* o *pony* inglés). A los caballos de trabajo que montaban los campesinos se los denominaba rocines cuando tenían una buena talla y, cuartagos si eran más chicos (26).

- El historiador Altamirano (2) sostiene que en 1567 Felipe II mandó a crear al caballo de pura raza española, cruzando para ello los innumerables tipos de caballos existentes, entonces, en Andalucía. La cabaña equina andaluza, en ese periodo histórico, era muy variada: *hacas*, *hacaneas*, *frisonos*, *cuartagos*, *trotos*, *asturcones*, *pottokas*, *gallegos*, etc. La variedad de pueblos que invadieron, o con los que comerció, lo que hoy es Andalucía (íberos, fenicios, griegos, cartagineses, romanos, visigodos y árabes) induce a pensar que los caballos criados en esa tierra

difícilmente se hubieran podido mantener intactos con el paso de los años y de los gustos y necesidades de cada uno de estos pueblos y culturas.

Para llevar a cabo la selección de los animales más idóneos para ese fin, Felipe II nombró como caballero real al cordobés Diego López de Haro, verdadero artífice del caballo español. El resultado obtenido por éste fue tan extraordinario que los caballos conseguidos serían, contraviniendo lo expuesto por este rey al principio del proyecto, exclusivamente para uso de la Casa Real que los utilizó como regalo a reyes extranjeros, nobles y clero.

El desconocimiento del logro gestado en las caballerizas reales debido a que, al ser un proyecto privativo del rey Felipe II, toda la documentación del proceso de creación del caballo español fue enviada desde Córdoba al Archivo del Palacio Real de Madrid y desde allí, como era costumbre, se hacía llegar al Archivo General de Simancas (Valladolid). En ese lugar ha permanecido dormida durante más de cuatro siglos, favoreciendo a través del tiempo la aparición de distintas interpretaciones sobre origen, historia y morfología de la pura raza española (2).

IV.4) EL CABALLO EN AMERICA

Según Altamirano (2), la pura raza española no existía cuando se descubrió América. Tendría que pasar casi un siglo para verlo nacer y, posiblemente, más de dos para que él pisara tierras americanas. Cuando lo hizo, debió llegar en muy escaso número y de manos de algunos nobles y virreyes que se instalarían en el Nuevo Mundo. Pero ¿Qué caballos fueron los que llevaron los conquistadores? La mayoría eran de raza "haca" y también los caballos denominados "comunes", desde la antigüedad clásica griega. Entendiendo por comunes a los caballos de baja calidad y de variada morfología que abundaban en todo el territorio europeo. Estos animales eran los caballos importados de Inglaterra. Efectivamente, las hacas eran un tipo de caballos procedente de ese país, donde se utilizaba para el trabajo en el campo y tirar de los carros. Pero las hacas acabarían por desaparecer de Andalucía a raíz de la proliferación de los caballos españoles y debido a la promulgación de leyes que prohibieron la importación de caballos extranjeros.

En tanto en América, Cristóbal Colón llegó a la isla de Santo Domingo en 1493, en su segundo viaje, con 25 caballos provenientes de Andalucía a fin de establecer allí un centro de cría para cubrir las necesidades de la conquista. En los siguientes 12-13 años, por pedido de Colón y, luego, por el gobernador general de Indias Nicolás de Ovando se

importaron caballos de España a América, estableciéndose numerosas cabañas en La Española (Santo Domingo). De allí, se dispersaron a las islas Antillas, Jamaica y Cuba, y llegando finalmente al continente, (Panamá y Nicaragua) alrededor de 1514. Los primeros centros de cría se desarrollan en Panamá y Colombia (26).

El primer ganado caballar en Puerto Rico lo importó el explorador Juan Ponce de León desde La Española (Santo Domingo) en 1509. Estos caballos provenían de Andalucía. En 1510, el mismo trajo yeguas desde Sevilla. En 1515 Puerto Rico criaba y exportaba caballos a otras partes del Nuevo Mundo.

En 1532, Francisco Pizarro introdujo el caballo en el Perú (25 machos y 25 hembras), provenientes de un centro de cría en Nicaragua. Junto con la caída del Imperio Inca, otros expedicionarios llegaron al Perú con caballos de Centro América. En 1536, desde Santo Domingo le enviaron a Pizarro un refuerzo de 200 caballos. En 1538, comenzó a desarrollarse en Charcas, Perú, un importante centro de cría caballar. De allí, se fueron distribuyendo a toda América del Sur. Así, por ejemplo, Valdivia obtuvo del Perú los caballos para la conquista de Chile.

Posteriormente, continuaron trayendo caballos andaluces y yeguas berberiscas para la cría, aunque para esa época el rey Fernando I (1507) como regente de su hija Juana, prohibió la exportación de equinos desde la península Ibérica. Sin embargo 100 años más tarde se exportaban desde La Española y Nueva España (hoy México) 100.000 cueros de caballo por año.

En las capitulaciones que autorizaban la conquista, el monarca les concedía a los conquistadores caballos de los centros de cría americanos.

Durante el reinado de Carlos V y, a través de las capitulaciones, se restableció la exportación de caballos de España a América. Así Pedro de Mendoza trae caballos a Buenos Aires, Cabeza de Vaca al Paraguay, etc.

Todos los caballos del continente americano, ya sean nacidos en él o traídos desde España, mostraban un tipo racial bastante homogéneo, ya que todos poseían el mismo origen. Posteriormente fueron introducidos caballos de otros países como Inglaterra, Francia, Portugal, Holanda, pero de todas formas, siempre los caballos españoles fueron mayoría y a partir de ellos se establecieron centros de cría (26).

En América, de las primeras estirpes de caballos surgieron 12 o más precursores del paso fino. Estos fueron seleccionados por su andar cómodo, rítmico y cadencioso. Hacia el siglo XX, continuó la cría de caballo de paso fino en Puerto Rico (y otros países del caribe), y en 1943 se crea la Asociación de Dueños de Caballos de Silla de Puerto Rico, con lo comenzó el registro genealógico de la raza paso fina puertorriqueña (26).

IV.5) HISTORIA DEL CABALLO EN ARGENTINA.

En nuestro país no había caballos hasta la época de la conquista. Los primeros caballos fueron los que trajo Pedro de Mendoza desde España en 1536, al fundar Buenos Aires (según registros de la época desembarcaron 72). En el abandono de la misma por Irala, alrededor de 40 caballos quedaron en libertad constituyendo la base de los cimarrones o baguales. Antes de emprender la reconstrucción y repoblación de Buenos Aires desde Asunción en 1580, Juan de Garay, hizo pregonar que, en nombre del Rey, daría a quien lo acompañara en la campaña "el ganado silvestre que quedó del tiempo de don Pedro de Mendoza".

Otros caballos fueron introducidos en nuestro territorio por diversos conquistadores. Así Alvar Nuñez Cabeza de Vaca trajo desde España hasta Asunción caballos españoles que luego Garay utilizó en su campaña a Santa Fé. Diego de Rojas y Nuñez Prado vinieron desde Perú hasta Tucumán con caballos criados en ese país. Francisco de Aguirre trajo caballos desde Chile a través de Cuyo.

En el siglo XVIII, las tribus araucanas migraron hacia la pampa trayendo caballos de la cordillera, lo que constituyó un aporte para la futura raza criolla. Los tehuelches capturaban caballos baguales de la Sierra de la Ventana y en los valles australes.

También en esa época eran muy codiciados los reproductores chilenos. Por lo que muchos eran importados para ser cruzados. Hubo mucho intercambio con países vecinos. Esta cultura de cría se mantuvo por tres siglos y constituyó la base del caballo criollo.

De todas formas las razas argentinas analizadas no son poli genéticas, ya que su tronco originario es uno solo y bien definido: Los caballos que trajo Pedro de Mendoza, los que trajo de Asunción Cabeza de Vaca y los que entraron por Tucumán y por Cuyo, descendientes de los llevados por los conquistadores al Perú y Chile. Que procedían a su vez de las cabañas de Santo Domingo, Jamaica y Nicaragua, las mismas establecidas con caballos andaluces. Y todos los registros de la época afirman que las expediciones españolas venían de Andalucía, siendo este un lugar de producción caballar (26).

IV.5.a) LOS BAGUALES

Los animales que se escapaban o quedaban abandonados dieron origen a los caballos cimarrones, que se multiplicaban como otros mamíferos autóctonos. Los lugares donde hubo más desarrollo de este tipo de animales fueron la Isla de Santo Domingo, los Llanos de Venezuela, las praderas del occidente de Estados Unidos y la pampa argentina. Es decir, el bagual no era otra cosa que el caballo libre e independiente del dominio del hombre, al igual que el mesteño mejicano y como el cimarrón de Santo Domingo. En todos aquellos lugares donde el caballo tuvo oportunidad de escapar se originaron caballos cimarrones.

Los primeros baguales fueron reconocidos como tales por Garay en 1580, cuando autorizó su captura y propiedad a aquellos que lo acompañaron en la segunda de Buenos Aires. Ya en 1586, era una práctica común entre los pobladores de Bs. As. la de enlazar caballos cimarrones.

V) CONCEPTO DE RAZA

Las razas son poblaciones que se distinguen por un conjunto de caracteres visibles exteriormente, que están determinados genéticamente y que se han diferenciado de otras de la misma especie a lo largo del proceso histórico, teniendo en cuenta que se han originado y localizado en un área determinada con un ambiente común (108).

En el ámbito mundial se han identificado 515 razas equinas distribuidas en el mundo, la mayoría en Asia, 147 y Europa, 138.

V.1) CABALLO CRIOLLO (CA)

V.1.a) Características Del Caballo Criollo Argentino

El estándar de la raza adoptado en Argentina, Uruguay, Brasil, Chile y Paraguay es eumétrico, mesomorfo, rectilíneo y subconvexilíneo. La alzada permitida es de 1,40-1,48 m, el perímetro torácico de 1,70-1,86 m, cerca de la tierra. La cabeza es de base ancha y vértice fino, frente amplia, mucho cráneo y poca cara. El cuello debe ser mediano, la cruz musculosa y poco destacada, la espalda semioblicua. Debe presentar poca distancia al piso y la grupa debe ser semioblicua. El antebrazo y la pata deben ser musculosos. La cuartilla en tanto, de mediana longitud. La grupa descendiente y la cola

de implantación baja (como sus antecesores los bereberes). La cabeza mediana, algo pesada, frente recta, de forma triangular, a veces aparece perfil convexilíneo. La espalda fuerte, debe tener amplitud de pecho y caja torácica. Vientre grueso y miembros huesudos. Presenta muy variados pelajes: zaino, alazán, bayo, albinos parciales: overos y tobianos, moros, rocillos, tordillos, gateados, cebrunos y doradillos.

V.1.b) Origen Del Caballo Criollo Argentino

Entre 1825-1852 se importaron caballos de diversas razas (Shire, Pura Sangre Inglés, Percherones, etc) y comenzaron a hacerse cruces. Antes de la desaparición del caballo criollo, un grupo de cabañeros entusiastas y, con el apoyo de la Sociedad Rural Argentina, se resolvió crear en 1917 un registro genealógico de equinos de raza argentina, cuyo origen es exclusivo y genuinamente el caballo criollo. El registro se abrió al año siguiente. Se eligió al doctor Emilio Solanet para que escogiese los planteles que habían de tomarse como base. Este junto con su hermano Pedro, venía luchando por la conservación de la raza y dedicándose a la cría, para lo cual ya habían comprado reproductores a los caciques indios del interior de la Patagonia. Posteriormente, el nombre oficial de la raza fue cambiado de Argentina a Criolla Argentina. Luego, en 1923, se fundó en Buenos Aires la Asociación de Criadores de Caballo Criollo.

V.1) PASO PERUANO (PP)

V.2.a) Características Del Caballo De Paso Peruano Argentino

Autóctono del Perú, es un equino de silla de tipo eumétrico, con una alzada promedio de 1,48 m para los machos y 1,47 m para las hembras. Se desplaza en bípedos laterales, con la realización de término en los miembros anteriores y movimiento rasante de los miembros posteriores. El término es el movimiento que presentan las manos del caballo que da idea de brazada de nadador. A medida que incrementa la velocidad pasa del paso al *sobreandado*. Dichas características son heredables ya que todas las crías nacen con el andar de paso.

La cabeza es predominantemente subconvexa (con tendencia a rectilínea), con largo promedio de 59 a 61 cm (medida de la testera al labio superior), ancho de 11 a 13

cm entre las orejas y de 16 a 18 cm entre apófisis orbitales. Posee carrillos bien definidos, frente ancha y plana. Orejas largas y móviles. El cuello tiene crines finas abundantes con una longitud promedio de 60 cm (medido desde el atlas a la escápula). El cuerpo posee un perímetro torácico de 1,77-1,8 m. Las hembras poseen un perímetro mayor que los machos. Estos presentan una longitud cercana a la altura, siendo en las hembras esta un 5% mayor. La distancia de la cruz al esternón (llamada profundidad) es similar a la altura sub-esternal (distancia entre el esternón y el suelo). Las hembras son algo más profundas que los machos. La cercanía a la tierra es una característica racial.

El pecho debe ser amplio en un rango de 34 a 36 cm (medido entre las puntas de los hombros). El dorso corto, ligeramente recto unido a la zona lumbar la cual posee una buena cobertura muscular. Grupa redonda, cola de inserción baja, con cerdas largas finas y abundantes. En los miembros anteriores, el antebrazo tiene una longitud entre 39-42cm, la rodilla debe ser bien definida en su cara anterior y ligeramente convexa. El metacarpo de 26-29cm de largo y un perímetro de 17-19cm, cuartillas con un diámetro menor que el de la caña. El perímetro de la caña posterior tiene entre 18-20cm. Las cuartillas un largo de 9-11cm y un perímetro de 17-20cm.

Los pelajes son variados: existen simples y compuestos. Estos últimos son los que poseen arrosillamiento (moros, canelos, rocillos y ruanos); en general, son sólidos con piel oscura: negros, bayos, marrones, alazán, palomino, gris, ruano. Excesivas marcas blancas y piel rosada no son caracteres deseables en la raza. Los albinos y los overos son desechados.

En sus movimientos desplaza el centro de gravedad hacia delante, libre de movimientos verticales lo que lo convierte en un caballo de equitación pasiva y de función viajera.

Para catalogar a un caballo como ejemplar de la raza se tienen en cuenta todas las características antes mencionadas. Luego se evalúa el apero, que es el conjunto de arreos: el terno de cabeza o jato, la falsa rienda, la montura peruana, los estribos y el pellón. Las competencias se dividen en categorías y premios especiales. La máxima categoría es la de Campeón de Campeones. Si un caballo consigue el cetro tres veces se convierte en "laureado", título cumbre que en el Perú lo han alcanzado pocos caballos entre los que se encuentran Caramelo (1974), Regional (1972), Cascabel (1977), Sol de Ahíjan (1982) y Predilecto (1987). Entre las yeguas Gitana (1970), Ximena (1976), Regina (1979) y Doña Luisa (1991).

V.2.b) Universalidad De La Ambladura

Muchos países han tenido dentro de su historia hípica una época de caballos de paso. Así, en Francia los caballeros de la Edad Media solían viajar en sus *Palefrois* de paso para cambiar de cabalgadura en el momento del combate y montar caballos de trote o *Destriers*. También las damas montaban “*haquenées*” o sea ambladores de aires muy suaves. Del cual deriva el nombre “*Hackney*” que es hoy el caballo trotador de Norfolk, el cual es la antítesis del paso. Los caballos ambladores se han perdido hoy prácticamente en toda Europa. Se cita que en los comienzos de la cacería del zorro su uso era común. En el siglo XIV en Escocia, se impuso un fuerte impuesto a los ponies ambladores, “*hobbies*” (caballos que se exportaban a Inglaterra) (6). También en un inventario de los caballos de la duquesa de Suffolk, en 1547, se cuenta con 30 ambladores.

También en Abisinia los gobernadores de provincia y gente con recursos solían montar mulas de paso llamadas “*sanga*”. En África del sur, los caballos Batusto forman una raza de caballos ambladores. En China se describen a los pacers, como caballos de paso suave. En Islandia, también existen caballos de paso. En la República Socialista de Kasakh, se corre una carrera de distancia corta con caballos ambladores montados por mujeres.

En Sudamérica las razas ambladoras derivan del caballo de Paso Peruano. Así en Brasil existe una raza denominada Campolina. Y en EE.UU, hay una larga lista de razas de animales ambladores: el *American Single-Footing*, *American Saddlebred*, *Baskir*, *Baskir Curly*, *Flatwalker*, *French Trotter*, *Gaited Pony*, *Gaited Appaloosa*, *Hackney*, *Icelandics*, *Kabardin*, *Kentucky Mt. Horse*, *Mangalarga Marchador*, *Manga Larga*, *Missouri Fox Trotter*, *Montana Traveler*, *Morgan Gaited*, *Mountain Pleasure*, *Pacing Horse*, *Racking Horse*, *Rocky Mountain*, *Spotted Saddle*, *Spanish Mustang*, *Standarbred*, *Tennessee Walker*, *Tennuvian*, *Virginia Traveler*, *Walkaloosa*, e incluso mulas ambladoras (*Gaited mules*).

V.2.c) Origen Del Caballo De Paso Peruano (PP)

Según Ascasubi (6), “el PP es el resultado de una selección funcional que ha obrado durante mucho tiempo sobre una población caballar mestiza, en la que han intervenido tres razas: La española, la frisona (sí bien no directamente, a través del

caballo español mejorado) y la berberisca. Los PP son descendientes de los caballos traídos a América por los conquistadores, los cuales traían solo ejemplares de valor. Este autor dice que en esa época en España existían varias razas y las más afamadas eran la andaluza y otra andaluza más pequeña que la primera conocido como *Genet d' Espagne* oriundo, de la región de Granada. Siendo lo más probable que hayan pertenecido a estas razas la inmensa mayoría de caballos traídos a América”.

Otra autora, von Rust Mc Cormick (134), en una revisión sobre el origen del caballo de paso critica lo sostenido por Ascasubi en los siguientes términos:

Sostiene que la confusión con respecto a la raza frisona como origen del PP que se hizo muy popular, la generó este autor. Cita que en primera instancia el PP es un caballo español de pura raza que fue seleccionado por la ambladura apenas llegó al Perú. Se sabe que existen caballos andaluces que amblan, los cuales habrían sido seleccionados por los peruanos. Está bien documentado que los conquistadores trajeron a América *Hacks* (ambladores) y *Chargers* (trotadores) de la misma raza, y como consta en el archivo de indias (y todavía es) el caballo español es una raza que contiene animales de Galicia (célticos), Sorraia (predecesor del andaluz) y Berberiscos de Marruecos. Además dice, que Ascasubi por comparación de dos fotografías (una de una yegua de paso peruana montada y un caballo frisón tirando un carro), asume que la similitud de los movimientos de las manos de los mismos confirma la ascendencia del frisón sobre el PP. Cita la inconveniencia de comparar dos caballos en acciones distintas (uno montado y otro tirando de un carro), además que los métodos de observación están muy influenciados por la apreciación del observador. Además, consta que muchos caballos andaluces fueron a Holanda con la caballería española del rey Carlos V durante la conquista de esas tierras (Fresia, también conocida como tierras bajas). Ahí fue donde los holandeses cruzaron caballos del lugar de sangre fría con caballos andaluces y desarrollaron la raza frisona. En consecuencia el parecido de los caballos frisonos con los PP y andaluces se debe a que poseen sangre española. Además la autora sostiene que otros historiadores, como Carlos Villa Fuentes y Verne Albrigh, repiten lo que Ascasubi dice acerca de los caballos Frisonos fortaleciendo los conceptos erróneos sobre el origen de la raza. El hecho del cruzamiento con caballos andaluces que le dan la capacidad de elevar las rodillas a los caballos frisonos también es citado por la Asociación de caballos Frisonos de Norteamérica. Cita que, en el segundo viaje Colón, trajo caballos (padrillos y yeguas), para centros de cría ubicados en lo que hoy es República Dominicana, Puerto Rico y hasta Panamá. De este último lugar, tomó Pizarro los caballos para realizar la conquista del Perú.

En tanto según Cabrera (26), dice que tras dos accidentados viajes por la costa occidental de Sud-América, Pizarro, recibió la licencia real para conquistar y poblar la provincia del Perú, para lo cual partió con 37 caballos de la cría de Nicaragua (1532). Luego, recibió refuerzos y, en el momento de la conquista de Cajamarca, llevaba 62 caballos. Posteriormente, recibe nuevos refuerzos; tal es así, que consta que en el alzamiento de los indios de Cuzco (1536), los españoles pierden 200 caballos que son repuestos desde Santo Domingo. Posteriormente, fueron enviados a Perú caballos directamente desde España.

Las guerras civiles que siguieron a la conquista no fueron impedimento para que la ganadería caballar progresara en el Perú. A 70 años de la conquista, según numerosas autores los caballos eran tan buenos como los originales de España.

A diferencia de lo que sucedía en otros lugares, el indio local fue refractario al uso del caballo, persistiendo su temor hacia ellos mucho tiempo después de la conquista.

Se cita que con el tiempo se ha diversificado en tres sub-razas: el caballo costeño, o criollo peruano propiamente dicho, el serrano o cholo y el morucho ó de las punas (altiplano). Las diferencias estarían dadas en la forma de crianza. Siendo en los costeños, donde más esmero se ha puesto en su selección y crianza. Son los que posee la ambladura como paso natural. Que ya se ha descrito como caballo de paso peruano. El cholo o serrano es menos elegante que el costeño, pero más rústico y resistente, más anguloso y posee los mismos aires que el costeño, pero no tan vistosos. El morucho del altiplano, es de talla reducida no supera el 1,40 m, cuerpo corto, cuello delgado y frecuentemente de ciervo. Su aspecto es rústico.

V.2.d) Comparación Entre El Caballo Peruano De Paso (PP) Y El Paso Fino (PF).

La presencia de la palabra "Paso" en el nombre de ambas razas da lugar a la confusión que existe de que ambas razas son iguales o al menos están muy relacionadas. Sin embargo, existe una serie de diferencias importantes entre ambas: el tamaño, conformación, andares, métodos de entrenamiento y usos.

De la comparación de ambas razas surge que son diametralmente opuestas. Están relacionados en el sentido de que ambos descenden del caballo español, pero esto ocurrió hace 500 años. Los países que desarrollaron el PF fueron básicamente Puerto Rico, Colombia, República Dominicana y Cuba, todos en el mar del Caribe y muy

cercanos. El caballo PP, aislado geográficamente, fue preservado de cruzamientos externos y seleccionado por casi 400 años.

La doma del caballo de PP comienza a los 3 años y usualmente finaliza a los 4 ó 5. Los andares del mismo son paso, paso llano (andar lateral cadencioso) y sobreandado (que es el mismo movimiento de paso pero acelerado). El término es un carácter altamente deseado en la raza. Los métodos de entrenamiento se realizan con un bozal para no interferir en la suavidad de la boca. Luego se introduce la embocadura.

Los PF, también comienzan la doma a los 3 años. Sus movimientos son rápidos cortos y prácticamente no avanza, llevando su cola elevada. El término es raro y no deseado por los criadores. Se crían principalmente, en Puerto Rico. Se los monta con sillas inglesas y la embocadura es en cuchara. El aire más deseado del PF es el fino-fino, que es muy rítmico con gran acción de las patas pero con casi nada de avance. Existen otros dos tipos de PF, el *performance* que posee un paso que avanza más pero no galopa y el *pleasure* que muestra gran versatilidad.

OBJETIVOS

- Realizar la caracterización genética de dos razas equinas: el caballo Criollo Argentino (CA) y el caballo de Paso Peruano Argentino (PPA).
- Establecer las posibles relaciones y diferencias entre ambas razas, y efectuar su comparación con aquellas que serían sus ancestrales.
- Evaluar los posibles mecanismos evolutivos de diferenciación genética entre y dentro de las razas en estudio.
- Contrastar y convalidar metodologías de identificación genética: polimorfismos bioquímicos y moleculares (microsatélites).
- Determinar los valores de Poder de Exclusión (PE) de cada sistema en particular y en conjunto para cada raza en estudio con el fin de establecer parámetros para pruebas de identidad y filiación.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

I) OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se emplearon muestras de sangre periférica obtenidas por punción de vena yugular con y sin anticoagulante (ACD). Se analizaron muestras de 40 Caballos Criollos Argentinos (CA), pertenecientes a dos haras, uno de la localidad de Chascomús y otro de Coronel Vidal. Ambos en la provincia de Buenos Aires. Para el estudio de los caballos Paso Peruano Argentino (PPA) se tomaron 102 muestras durante un concurso de la raza realizado en la ciudad de Salta, provincia de Salta. De las mismas se procesaron 40 tomadas al azar, para poseer el mismo tamaño muestral que los CA y facilitar de esa manera el análisis estadístico.

Se analizaron ocho microsátélites: HMS 7, HMS 6, AHT 4, HTG 6, HMS 2, AHT 5, HTG 4 y ASB 2 y cuatro sistemas proteicos: Albúmina (Alb), Esterasa (Es), Proteína Xk (Xk) y Transferrina (Tf) .

II) PREPARACION DE LA MUESTRA

II.a) Para Marcadores Moleculares (microsátélites).

A partir de la muestra con anticoagulante (ACD), se procedió a la extracción del ADN mediante las siguientes técnicas:

II.a.1) Método de extracción de ADN con *Chelex*[®] a partir de sangre periférica (135).

Es un método de obtención rápida de ADN genómico (Bio Rad Laboratories). Se basa en la incubación de la muestra con el *Chelex*[®] que es una resina quelante. A continuación se detalla el protocolo utilizado (135).

1. En un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml se colocó 1 ml de agua bidestilada con 5 μ l de sangre.
2. Se incubó durante 15-30' mezclando ocasionalmente.
3. Se centrifugó 2-3 min. a 10000-15000 g.

4. Luego se removió cuidadosamente el sobrenadante dejando 20-30 μ l.
5. A dicho resto se agregó una solución de Chelex [®]5%(aprox. 200 μ l).
6. Se incubó a 56° C por 15-30'.
7. En un vortex se mezcló a máxima velocidad por 5-10".
8. En agua hirviendo se incubó durante 8'.
9. Con el vortex se mezcló a máxima velocidad por 5-10".
 - a. Luego se centrifugó por 2-3' a 10.000-15.000g.
10. Del sobrenadante se utilizaron 5 μ l para la reacción de PCR.
11. La muestra se congeló en el freezer a -80° C.

II.a.2) Método de extracción con DNA ZOL[®](33).

El DNA ZOL [®] (Gibco BRL –Life Technologies, Grand Island , New York, USA) es un detergente que contiene isocianato de guanidina. Este reactivo, altamente caotrópico, permitió el lisado de las células y la precipitación diferencial del ADN. El protocolo incluyó los siguientes pasos:

1. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se colocó 1 ml de agua bidestilada al que se le agregó 0,5 ml de sangre.
2. Durante 1 hora se incubó a temperatura ambiente.
3. Luego se centrifugó 1' a 10.000g.
4. El sobrenadante se descartó.
5. 1ml de solución buffer (PBS) se agregó.
6. Posteriormente se centrifugó 1' a 10.000g.
7. Hasta obtener un pellet blanco se repitieron los pasos 5 y 6.
8. La solución de DNA-ZOL se agregó (0,5ml) homogeneizando el pellet con la pipeta.
9. Utilizando el vortex se homogeneizó la solución.
10. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 5'.
11. El sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo.
12. A dicho tubo se agregó 250 μ l de etanol 100% y se mezcló por inversión.
13. Una vez descartado el sobrenadante se centrifugó 15' a máxima velocidad.

14. Una solución de etanol 70% se agregó (250 μ l).
15. Posteriormente se centrifugó 5' a máxima velocidad.
16. El etanol se descartó y el tubo se dejó a secar a temperatura ambiente.
17. Una solución de Na OH 8 mM fue agregada (300 μ l) y fue incubado a 37°C.
18. Por último fue agregada una solución de HEPES 1M (3,45 μ l).

II.b) Para Marcadores Bioquímicos

Para la obtención del suero para las respectivas electroforesis se centrifugó la muestra sin anticoagulante a máxima *r.p.m.* durante 5'.

III) TÉCNICAS

III.a) Para Marcadores Moleculares (microsatélites)

III.a.1) Amplificación por PCR:

La caracterización de los loci en estudio se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (89, 44, 60). Esta metodología consiste básicamente en la síntesis *in vitro* de una secuencia de ADN limitada por un par de oligonucleótidos específicos. Se requiere una polimerasa termoestable (taq polimerasa), KCl, MgCl₂, desoxinucleótidos (dNTPs), un par de oligonucleótidos específicos y el ADN molde.

Las amplificaciones consistieron en una etapa de desnaturalización inicial y ciclos de desnaturalización, hibridación y polimerización. Estas tres últimas se repitieron en un número aproximado de 30 veces. Por último, se realizó un paso de polimerización final. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un reactor de PCR (MJ Research).

III.a.2) Caracterización de los loci analizados

Los loci analizados correspondieron a los recomendados por *la Sociedad Internacional de Genética Animal*, (ISAG), para la identificación de los equinos: AHT4, HMS 7, HMS6, HTG 6, HTG 4, HMS 2, AHT 5 y ASB 2.

Microsatélite	Secuencia	Ubicación Cromosómica	Cita
AHT 4	5' AACCGCCTGAGCAAGGAAGT 3' 5'GCTCCCAGAGAGTTTACCCT 3'	24q14	(10)
HMS 7	5' CAGGAAACTCATGTTGATACCATC 3' 5' TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT 3'	1	(52)
HMS 6	5' GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG 3' 5' CTCCATCTTGTGAAGTGTA ACTCA 3'	4	(52)
HTG 6	5' CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT 3' 5' GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT 3'	15q26-q27	(43)
HTG 4	5' CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC 3' 5' CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC 3'	9	(43)
HMS 2	5' ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAT 3'	10	(52)
AHT 5	5' ACGGACACATCCCTGCCTGC 3' 5' GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC 3'	8	(10)
ASB 2	5' CACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG 3' 5' CACA ACTGAGTTCTCTGATAGG 3'	15q21.3-q23	(25)

La mezcla de la reacción consistió en: 10 mM Tris-HCl, 50 mM ClK, 1,5 mM Cl₂Mg, 0,1% Tritón X-100, 100 µM de cada dNTP's, 1U de Taq polimerasa (Gibco BRL- Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA), 0,5 µM de cada cebador y 5 µl de ADN genómico en 25 µl de volumen final.

Se mezclaron alícuotas de los productos de amplificación (5 µl) en un volumen de DYE 2X (formamida 96%, EDTA pH 8 20 mM, azul de bromofenol 0,5% y xylene cyanole FF), se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96° C y posteriormente se colocaron en hielo. Luego se procedió a la siembra en el gel desnaturalizante como se detalla más adelante.

Condiciones:

Desnaturalización inicial 94° 5'. Luego 30 ciclos a 92° 15", 60° 15", 72° 20" y finalmente 72° 10'.

Chequeo del amplificado:

Luego de la amplificación, se procede al chequeo de las muestras amplificadas en geles de agarosa al 6%. La visualización de las bandas se realiza por tinción con Bromuro de etidio.

IV) DETECCION DEL POLIMORFISMO

IV.a) Para Marcadores Moleculares (microsatélites).

Soluciones y materiales

TBE (5X)	54 g Tris, 27,5 g Ac. Bórico y 20ml EDTA (0,5 M)/ 100ml H ₂ Od .
Acrilamida 30% (19:1)	30 g Acrilamida, 1,57 g bis- acrilamida/ H ₂ O destilada csp 100ml.

Urea	
Persulfato de Amonio 10%	
TEMED	
Solución Silane	95 μ l alcohol etílico, 50 μ l ácido acético y 5 μ l Bind Silane (Promega).
Silicona	
Placas de vidrio de geles de secuenciación	
Espaciadores y peines	
Aparato de electroforesis	

1. Los vidrios se limpiaron con alcohol.
2. El vidrio posterior se le aplicó solución de silicota.
3. En el vidrio anterior se aplicó la solución de *Silane* y a los 5' fue lavado 3 veces con alcohol
4. Los espaciadores entre ambos vidrios se colocaron asegurándolos con grampas para papel.
5. La solución del gel desnaturizante se preparó variando su concentración de acuerdo al microsatélite:

Así para HMS6, HMS7, AHT4 se empleo la solución al 6%:

Urea	33,6 gr.
TBE (5X)	16 ml
Acrilamida 30%	16 ml
dH ₂ O	20 ml

Se mezcló bien y antes de verter en el molde se agregó:

Persulfato de Amonio 10%	533 μ l
TEMED	53,3 μ

Para HTG4 y HTG 6 se empleo la solución al 5%:

Urea	33,6 gr
TBE (5X)	16 ml
Acrilamida 30%	13,3 ml
H ₂ O csp	22,7 ml

Se mezcló bien y se agregó antes de verter en el molde:

Persulfato de Amonio 10%	533 μ l
TEMED	53,3 μ l

Para ASB2, AHT 5 Y HMS2 se empleo la solución al 4%:

Urea	33,6 gr
TBE (5X)	16ml
Acrilamida 30%	10,66ml
dH ₂ O	25,33ml

Se mezcló bien y se agregó antes de verter en el molde

Persulfato de Amonio 10%	533 μ l
TEMED	53,3 μ l

Inmediatamente la solución se colocó en el molde de los vidrios:

6. Se colocó el peine.
7. El gel polimerizó a las 24 h.
8. En ambos tanques de la cuba de electroforesis se colocó TBE 1X.
9. El molde fue ubicado en el aparato de electroforesis y se aseguró con grampas para papel.
10. Para proceder a la siembra se sacó el peine.
11. El producto de PCR (5 μ l) se mezcló con 5 μ l de solución de carga (DYE).
12. Dicha mezcla se desnaturalizó durante 5' a 95°.
13. El gel fue precorrido a 60W fijos durante 60'.
14. Las muestras, desnaturalizadas, fueron sembradas en el.
15. La electroforesis transcurrió por aproximadamente 4 h. (60W).
16. El sistema se desconectó, fue retirado el molde del aparato de electroforesis.
17. Por último se procedió a su coloración.

IV.b) Para Marcadores Bioquímicos.**Poliacrilamida básica (66).****Soluciones utilizadas:**

Solución A: (para 4 geles)

32g Acrilamida

0,8g bis-acrilamida

70ml dH₂O

Se colocó en un erlenmeyer, al cual se agregó 70 ml de dH₂O. Se colocó en un agitador magnético durante 1 h. Luego se filtró con 2 papeles *Wathman* nº1 por medio de una bomba de vacío.

Solución B:

Solución stock 1

90 g de *Tris* disueltos en 500ml de dH₂O.

Solución stock 2

20 g ácido cítrico (monohidrato), disuelto en 500ml de dH₂O

(para 4 geles):

50 ml sc stock 1

50 ml sc stock 2

300µl TEMED

150 µl Mercaptoetanol

Solución C:

dH₂O

Solución D:

0,2g Persulfato de amonio, disuelto en 100ml de H₂O.**Soluciones para la tinción:**

Solución para la tinción de Esterasas:Buffer PO^4 0,1M (pH=6,8):7,8g NaH^2PO^4 7,1G NaH^2PO^4 Disuelto en 1 lt. de dH_2O 1% α -naftilacetato**Solución Buffer de corrida:**

16g TRIS

4g ácido bórico

Disolver en 2 lts. de dH_2O .*Bromofenol Blue* al 1%**Preparación del gel:**

Se colocaron dos placas de vidrio limpias sobre una superficie plana .Se limpió uno de los lados de ambas placas con alcohol etílico. Se colocó sobre una de ellas el marco plástico. Sobre el mismo se colocó la segunda placa de vidrio. Se aseguraron con las grampas de papel. Se procedió a marcar una de las placas con un marcador a los 18cm, 20cm y 24 cm., respectivamente desde el extremo inferior.

Para realizar el gel se procedió a mezclar las soluciones en las cantidades indicadas más adelante. De forma que se obtuvieron 3 concentraciones distintas:10%, 4% y 8%, respectivamente. Las que se procedió a colocar dentro del molde en el orden antes mencionado. Así primero se colocó la solución del 10% hasta la marca de 18cm.Inmediatamente se colocó alcohol isobutílico (2ml aprox.).Se esperó entre 10-15' hasta que se completó la polimerización. Se desechó el resto no polimerizado y de alcohol. Se procedió de la misma forma con el gradiente del 4% hasta la marca de 20cm.Y con la solución al 8% hasta la marca de 24cm.

%Acrilamida	Solucion A	Solucion B	Solucion C	dH_2O
10	28ml	17ml	17ml	8,5ml
4	2ml	2ml	4ml	8,25ml
8	2ml	3ml	1ml	2ml

Preparación de la muestra:

Se utilizó suero fresco o congelado. Cada muestra se tomo con un papel *Whatman* n°14 de 3x3 mm, el cual fue sumergido en la muestra y luego se quito el exceso en un papel absorbente, para luego colocarlo en el peine para su posterior siembra.

Corrida:

Se conectó la placa de frío para que en el momento de la corrida este a 4°C. Se colocó 10ml aprox. de agua sobre la placa. Se colocó la placa de vidrio con el gel sobre el mismo. Se evitó la formación de burbujas de aire. Se saturó en el suero de cada muestra los papeles de 4x6mm (*Whatman* n° 17). Se secó el exceso en un papel absorbente; y se colocó cada papel sobre el peine para proceder a sembrar el gel. Para ello se colocó el peine sobre un soporte a 45° con respecto al gel, y se deslizó cada papel para que quede en contacto con el gel. Se colocó la solución buffer en ambas cubas. Se agregaron 2 gotas de *Bromofenol Blue* al 1%, en la cuba que correspondiente al cátodo. Se colocaron las toallas que conectan el buffer de las cubas con el gel. Se conectó la fuente de poder a 60mA constantes. A los 2'se retiraron los papeles y se continuó la corrida hasta que el frente alcanzó los 12cm dentro de la zona del 10%.

V) TINCIÓN**Soluciones y materiales****V.a) Para Marcadores Moleculares:**

Solución de fijación	100ml Ácido Acético/H ₂ O csp 1000ml
Solución de teñido	1g AgNO ₃ y 3ml Formaldehído (37%)/ H ₂ O csp 1000ml
Solución de revelado	30g Na ₂ CO ₃ / H ₂ O csp 1000ml. Enfriar a 10°, antes

	de usar agregar 1,5ml Formaldehído y 200 l Tiosulfato de Sodio (10mg/ml).
Formaldehído 37%	
Tiosulfato de Sodio	100mg/100ml H ₂ O destilada
Bandejas de fotografía	

1. El vidrio superior del molde se removió.
2. En la bandeja con solución de fijación permaneció en agitación durante 20'.
3. Con H₂O destilada se lavó durante 2', 3 veces.
4. En la solución de teñido se colocó por 30'.
5. Posteriormente se lavó con H₂O destilada durante 10''.
6. Con la correspondiente solución se reveló hasta que aparecieran las bandas.
7. En dicho momento se agregó la solución de fijación por 5'.
8. Con H₂O destilada se lavó durante 2'.
9. Posteriormente se procedió a su lectura.

Análisis de la lectura:

La estimación del peso molecular de los alelos de los microsatélites se realizó mediante el programa de computación 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science TM Rochester, NY, USA). Los geles de poliacrilamida desnaturalizantes utilizados para realizar la tipificación de los microsatélites se fotografiaron con una cámara digital (Kodak DC 40). La imagen obtenida se analizó con el programa antes mencionado utilizándose como controles muestras previamente tipificadas pertenecientes a los test de comparación para equinos organizados por la ISAG (1998, 1999, 2000).

5.b) Para Marcadores Bioquímicos

Tinción:

Tinción de Esterasas:

15ml Buffer de fosfatos

0,4 g *Fast Blue BB salt*

2ml α -naftilacetato

Tinción de sistemas proteicos:

Luego de completar la corrida del gel en poliacrilamida, se colocó en un recipiente y en el se volcó la solución A. Se dejó por 30 min. en el agitador. Se descartó el colorante y se cubrió el recipiente con un plástico fino y se incubó a 37° C durante 30min. Se quitó el plástico se secaron los restos de condensación de agua y se colocaron soluciones B y C juntas, se llevó al agitador durante 30min. Se destiñó con ácido acético al 2%.Se colocó en bolsa plástica, sellado e identificado.

I) METODOLOGIA ESTADÍSTICA

VI.a) Consideraciones generales

Con el tipo de datos producidos a través de marcadores polimórficos autosomales, se pudieron considerar dos tipos de análisis: estimadores de variación entre y dentro de las poblaciones y el análisis de la estructuración dentro de las poblaciones. La estratificación genética puede estar dada por una variedad de causas, las cuales incluyen sub-estructuración de la población, cruzamientos assortivos, *inbreeding*, mutación, selección, migración y deriva génica. Dichos mecanismos pueden variar las frecuencias genotípicas, por lo que las mismas perturbarán el equilibrio de Hardy-Weinberg, (Ej.: los alelos no se distribuyen azarosamente entre los individuos), (80).

Con los datos de los individuos analizados se creó una base de datos y se analizaron por medio de los programas Genepop version 3.1 (104), DISPAN (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpe/>), POPULATION(<http://www.cnrs-if.fr/pge/bioinfo/population>) y GENECLASS (35).

Los sistemas genéticos analizados en el presente trabajo pueden agruparse en dos clases:

- 1) Polimorfismos de secuencias codificadoras de proteínas (genes estructurales), identificados en la propia proteína.
- 2) Polimorfismos moleculares de secuencias microsatélites.

Estas últimas son consideradas secuencias hipervariables debido al número de alelos que presentan (en general), superior a los de los loci estructurales. Por lo tanto todos los análisis que se describen a continuación se han aplicado por una parte al conjunto de los loci proteicos y por otra al estudio de microsatélites.

VI.b) Consideraciones teóricas

VI.b.1) Frecuencias génicas y genotípicas

En los marcadores genéticos los alelos con una frecuencia menor a 0,05 pueden ser clasificados como poco frecuentes y raros con una frecuencia entre 0,01 y 0,005 (20). Estos últimos no fueron observados en ninguno de los sistemas analizados. Debido a que la técnica experimental utilizada permitió la identificación directa de los alelos de cada muestra, las frecuencias se estimaron por recuento directo de los genotipos observados, sobre el total de animales analizados. Mediante la fórmula:

$$x_i = (2N_{ii} + N_{ij}) / (2N) \quad \text{Fórmula 1.0}$$

Donde N_{ii} indica el número de animales homocigotas para el alelo i , N_{ij} indica el número de animales donde j es cualquier alelo distinto de i y N representa el número total de animales analizados.

Las frecuencias genotípicas constituyen la proporción de los distintos genotipos de un locus en una población

$$X_{ii} = m / n \quad \text{Fórmula 1.1}$$

Siendo m el número de genotipos observados ii en una muestra de n individuos.

VI.b.2) Equilibrio de Hardy-Weinberg

Es el estado de una población panmítica, sometida exclusivamente a leyes de la transmisión mendeliana, en que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes. El equilibrio no puede extenderse a sistema multilocus porque el equilibrio individual de un locus no implica el equilibrio en otros sistemas por lo que es calculado para cada sistema analizado.

Estas desviaciones del equilibrio pueden ser detectadas por una variedad de métodos diferentes. El más simple es realizar una tabla de contingencia y calcular el χ^2 de los valores observados con respecto a los esperados, este método tiene como limitante que no puede ser aplicado a muestras pequeñas con un gran número de alelos ya que pueden presentar valores de χ^2 que no son reales (104).

Alternativamente a través de programas de computación es posible generar distribuciones de genotipos observados, (algoritmos de *Monte Carlo*, *Markov Chain*), uniendo alelos al azar en genotipos, produciendo series de nuevas poblaciones. Las cuales son testeadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg. Lo cual ajusta mucho más la probabilidad de rechazar erróneamente la hipótesis nula (no desvío del equilibrio de H-W) de la población analizada. En el presente estudio se realizó el chequeado del equilibrio por el programa Genepop 3.1 (139) para cada locus y en cada raza por el test exacto (54); y a través de los loci y poblaciones por el método de Fisher (104). Solo se aplicó el χ^2 en aquellos marcadores donde fue posible dado que presentaban pocos alelos (A1, Es y Xk).

VI.b.3) DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

VI.b.3.a) Índices De Fijación

Wright, S., (1978) propuso la medida de la desviación de las frecuencias genotípicas en poblaciones sub-divididas a través de tres parámetros: F_{is} , F_{it} y F_{st} . F_{is} y F_{it} se refieren a la probabilidad que dos alelos tomados al azar de una subpoblación o de la población total respectivamente sean idénticos por ascendencia. Mientras que F_{st} se refiere a la probabilidad de dos alelos tomados de dos sub-poblaciones distintas sean idénticos por ascendencia.

Algunos autores (1965,20) amplían la utilización de los estadísticos F aplicándolos al estudio de subpoblaciones, poblaciones y razas diferentes, utilizando el F_{st} como medida de variabilidad genética y los F_{is} , F_{it} como medidas de prevalencia o deficiencia de individuos heterocigotos. Las tres medidas se relacionan por la siguiente ecuación:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad \text{Fórmula 2.0}$$

VI.b.3.a.1) F_{IS} :

Es definido como la probabilidad que dos genes homólogos en un individuo I sean idénticos por ascendencia dentro de la subpoblación. También como la correlación entre genes homólogos en un individuo I relativos a genes elegidos al azar de la subpoblación. Su valor va entre -1 a 1 , resultando negativo en los casos de exceso de heterocigotas y positivo en caso de exceso de homocigotas.

En el caso de loci multialélicos, con m alelos, se estimaron $m F_{IS}$ parámetros para una completa especificación de las frecuencias genotípicas de la población, ya que solo se consideraron los homocigotas. Las desviaciones de las frecuencias genotípicas, con respecto al equilibrio teórico de cada uno de los alelos presentes en cada población fueron estimadas a través del índice F_{Iski} que puede calcularse por la siguiente fórmula:

$$F_{Iski} = X_{ki} - x_{ki}^2 / x_{ki}(1-x_{ki}) \quad \text{Fórmula 2.1}$$

Como los valores F_{Iski} estimados por la fórmula (2.1) varían de alelo a alelo, por lo cual se estimó un único índice de fijación para todos los alelos presentes en cada una de las poblaciones. Fue calculado con el programa genepop 3.1 (1997).

Las desviaciones de F_{IS} con respecto a cero pueden ser verificadas a través de la prueba de Ji-cuadrado. El valor del mismo puede ser calculado por la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = NF_{IS}^2 \text{ Fórmula 2.3}$$

Con un grado de libertad, siendo N el número de animales analizados (57).

VI.b.3.a.2) Fit:

Es la probabilidad total de identidad de un individuo I. También puede ser definido como la correlación entre genes homólogos en un individuo con relación a la población total. Fue calculado con el programa genepop 3.1 (137).

Las desviaciones de F_{IT} con respecto a cero pueden ser verificadas a través de la prueba de χ^2 , por la misma fórmula vista en F_{IS} . (2.3).

VI.b.3.a.3) Fst:

Es la proporción relativa de varianza génica entre sub-poblaciones. Indica el estado en que se encuentra un proceso de fijación génica por deriva. Estima la probabilidad que dos genes homólogos elegidos al azar en la subpoblación sean idénticos por ascendencia y la correlación entre genes elegidos al azar en una subpoblación con relación a la población total.

Para marcar las diferencias entre razas (PPA y CA) la medida de F_{ST} es la medida de mayor interés.

Para ilustrar el efecto de los parámetros del muestreo se puede utilizar F_{ST} como medida de distancia genética (80). Para dos poblaciones F_{ST} puede ser definida como F_{ST1} :

$$F_{ST1} = (x_1 - y_1)^2 / 2z_1(1 - z_1) \text{ Fórmula 2.4}$$

Donde x_1 e y_1 son las frecuencias de un alelo dado en un locus en dos poblaciones y z_1 es el promedio de ambos. Esta estimación puede ser hecha para cada alelo y para cada locus, incluso sobre todos los loci. Para poder determinar a que nivel se producen las diferenciaciones entre dos poblaciones, fue calculado con el programa genepop 3.1 (137).

El grado de significación estadística de la diferencia entre las frecuencias génicas de cada una de las poblaciones (medidas a través de F_{ST}) en la raza fue verificado para cada locus a través de la prueba de χ^2 . El valor del mismo se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = 2NF_{ST}(k-1) \quad \text{Fórmula 2.4.1}$$

Los grados de libertad se estimaron con la fórmula $(k-1)(s-1)$, donde k es el número de alelos por locus y s el número de sub-poblaciones estudiadas (39).

VI.b.4) Test Exacto Para Diferenciar Poblaciones

Raymond, M. y Rousset, F. (Genepop 3.1), (104), propusieron un método para ensayar la diferencia poblacional basado en que la composición alélica es independiente de la asignación de la población. Este estadístico se basa en el uso de tablas de contingencia usando las reiteraciones por el método en cadena de *Markov* para obtener una estimación no desviada del test de probabilidad de rechazar erróneamente la hipótesis nula (ej: la composición alélica es independiente de la asignación de la población, es decir no hay diferenciación). Se llevó a cabo con pruebas de independencia entre poblaciones, para cada marcador genético, mediante tablas de contingencia.

VI.b.5) DIVERSIDAD GENÉTICA

VI.b.5.a) Número De Alelos Observados

Es una medida de variabilidad poblacional, se estimó como el número total de alelos observados por loci y por raza (tabla 1 y 12).

VI.b.5.b) Heterocigocidad Observada

Es una medida práctica de diversidad genética, se define como la proporción de individuos heterocigotas por locus en la población en estudio. Se determinó por conteo directo de los genotipos heterocigotas (tabla 10 y 20).

VI.b.5.c) Heterocigocidad Esperada

Un estimador de la diversidad genética es la heterocigocidad esperada, la cual fue calculada para cada locus y cada población usando la siguiente ecuación a partir de las frecuencias génicas:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \quad \text{Fórmula 3.0}$$

Donde x_i es la frecuencia génica del alelo i en un locus dado y m es igual al número de alelos presentes. Considerando el número de individuos muestreados (93):

$$h = 2n \left(1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \right) / (2n - 1) \quad \text{Fórmula 3.1}$$

Donde n es el número de individuos muestreados. Se calculó para cada marcador en cada población. También la heterocigocidad promedio para ambas razas en marcadores microsatélites y polimorfismos bioquímicos. Según la fórmula:

$$H_e = \sum_{j=1}^r h_j / r \quad \text{Fórmula 3.2}$$

Siendo h_j el valor de h_e para el locus j^{th} y r el número de loci estudiados (57).

VI.b.5.d) Varianza de la heterocigocidad

En la estimación de H_e hay dos tipos de varianza producto de dos tipos de muestreo, la debida al número de alelos muestreados (varianza intralocus) y la debida al número de loci estudiados (varianza interloci). La varianza intralocus puede reducirse incrementando el número de individuos estudiados, mientras que la varianza interloci puede reducirse aumentando el número de sistemas analizados (106).

Varianza interloci: Esta puede ser estimada a través de la fórmula:

$$O^2 H_e = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r O^2_j$$

Fórmula 3.3

Donde r es el número de loci y O es la varianza de h_e que es igual a:

Varianza intralocus: La varianza en la h_e de un locus en particular puede ser estimada de la siguiente manera:

$$O^2 Hej = 2 \left\{ 2(2n - 2) \left[\sum x_i^3 - \left(\sum x_i^2 \right)^2 \right] + \sum x_i^2 - \left(\sum x_i \right)^2 \right\} / 2n(2n - 1)$$

Fórmula 3.3.1

VI.b.5.e) Test de significancia:

La comparación entre los valores estimados de heterociguidad de dos grupos puede establecerse utilizando la prueba de t . El valor de t para un conjunto de loci se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$t = d/Sd \quad \text{Fórmula 3.4}$$

Donde d es la diferencia entre las heterociguidades y Sd los desvíos estándares promedios para todos los loci respectivamente.

VII) ANÁLISIS DE PARENTESCO

Existe una serie de supuestos o indicios racionales para plantear una duda en la filiación de un producto y llevar a cabo una prueba de paternidad, pues sobre la maternidad suele existir certeza debido a que el reseñamiento de los productos se hace en el período de lactación, cuando los vínculos materno-filiales son intensos. En cualquier caso, si se llegara a cuestionar la maternidad, el análisis genético es el mismo que para la paternidad. Los supuestos a que se hace referencia anteriormente son los siguientes:

- Yeguas que manifiestan signos de celo después de cubiertas, volviendo a ser presentadas a un padrillo distinto.
- Gestaciones anormalmente cortas o largas que nos indican que no hubo fecundación cuando se programó la cubrición con determinado padrillo.
- Aplicación de técnicas de inseminación artificial o transferencia de embriones.
- El empleo de sistemas de reproducción en libertad.

- Incompatibilidad de color de pelo de un producto con sus progenitores. (Ej: Regla de los alazanes).

El análisis de parentesco se basa en el principio de exclusión. Los loci polimórficos los posee el producto en doble copia ya que es un organismo diploide, por lo tanto una de las copias la hereda de la madre y la otra del padre. Por lo tanto los alelos presentes en la cría deben estar presentes en los padres.

En las disputas por paternidad es necesario determinar cuando un padrillo en particular es padre de una determinada cría. Las consideraciones clásicas se limitan a excluir un padre si no posee el alelo paterno correspondiente a esa cría para ese locus.

La eficiencia de la exclusión de los sistemas depende de las frecuencias alélicas de las razas en estudio y el número de marcadores analizados.

La eficiencia de la exclusión dada puede ser evaluada a través de la probabilidad de exclusión. Estima la habilidad de un marcador para determinar la exclusión al azar de un padrillo como posible padre. Esa exclusión depende de las frecuencias alélicas para ese locus, pero no del genotipo. Para un locus autosómico con alelos codominantes, las probabilidades de la cría están condicionadas a las de la madre. Un acercamiento de que bueno es un locus para ser capaz de excluir al azar padrillo como padre, asumiendo que no es el padre de la cría, está dado por la suma de las posibles uniones de la madre-cría y exclusiones del padre. Expresado en la ecuación de probabilidad de exclusión Q .

$$Q_1 = 1 - \prod_k (1 - Q_{1k}) \quad \text{Fórmula 4.0}$$

Donde Q_{1k} es la exclusión de paternidad para el locus k th (35).

Jamieson, A. en 1997,(63), describe la fórmula general para calcular la capacidad promedio de un sistema de marcadores para disputar la falsedad de un pedigrí en una especie unípara. La fórmula es aplicable tanto para paternidad como para maternidad, conociendo el genotipo de uno de los progenitores.

$$P = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

Fórmula 4.1

Usando el criterio que la exclusión debe estar basada en incompatibilidades genéticas en más de un sistema (21), permite al panel de microsatélites adecuarse a eventos genéticos raros que se presentan en ellos: como son presencia de alelos nulos y

mutaciones (27; 101; 102). Por lo tanto existen fórmulas desarrolladas por Chakraborty, R. en 1974 (35) que consideran que la probabilidad de exclusión se ve aumentado con el incremento de uso de marcadores. Así la probabilidad de exclusión total está dada por la combinación de todos los marcadores genéticos.

$$Q = 1 - \prod_k (1 - Q_{1k}) - \sum_k Q_{1k} \prod_{l \neq k} (1 - Q_{1l}) \quad \text{Fórmula 4.2}$$

V.9) DISTANCIA GENETICA

Cuantifican el grado de diferenciación entre dos taxones (conjunto de organismos) y pueden ser consideradas de varias maneras : desde reducir la información ,ya que transforman toda la información genética en un único número (136), hasta poner de manifiesto la transformación evolutiva que ocurre entre dos taxones que se separan, siendo la cantidad de diferenciación proporcional al tiempo de separación, lo que hace posible la reconstrucción de historias evolutivas. Todas estas estimaciones deben contar con un modelo evolutivo de lo que sucedió con los taxones en estudio ya que si las distancias evolucionaron de una manera diferente al modelo, estas no son una medida adecuada.

V.9.a) DISTANCIAS EVOLUTIVAS

Son estimadas para cuantificar el significado evolutivo, dicha medida varía de acuerdo conforme a la medida escogida. En el presente trabajo se utilizó la distancia de Nei (90), que estima el número de sustituciones génicas que ocurren en genes de dos taxones desde su divergencia a partir de un ancestro en común.

V.9.a.1) DISTANCIA DE NEI, M. (92).

Para dos poblaciones (X e Y) respecto de las cuales se dispone de datos de las frecuencias génicas (x e y) para m locus , cada uno con i alelos . Nei propuso un cálculo en las siguientes etapas:

Inicialmente se calcula la probabilidad de dos alelos, escogidos uno de cada población, de ser idénticos. Para un locus con m alelos ese valor es calculado:

$$j_{xy} = \sum_{i=1}^m x_i y_i \quad \text{Fórmula 5.0}$$

Ese valor es una medida de identidad entre dos poblaciones. Como las probabilidades de alelos idénticos son tomados a partir de una única población, son calculados para las poblaciones X e Y:

$$j_x = \sum_{i=1}^m x_i^2 \quad j_y = \sum_{i=1}^m y_i^2 \quad \text{Fórmula 5.1}$$

Usando estos valores la identidad entre las poblaciones pueden ser corregidas en función de la probabilidad de alelos idénticos son obtenidos a partir de una única población. Por lo que se obtiene el valor de identidad normalizada (I) usando:

$$I = j_{xy} / \sqrt{j_x j_y} \quad \text{Fórmula 5.2}$$

Donde j_x , j_y y j_{xy} son las medias aritméticas de los valores de j_x , j_y y j_{xy} obtenido para el conjunto de loci analizados. A partir del valor de identidad se calcula la medida de distancia como:

$$D_s = -\ln(I) \quad \text{Fórmula 5.3}$$

V.9.a.2) Filogenia De Los Individuos Como Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

Utilizando el programa Population (www.cnrs-gif.fr/pge) se calcularon las distancias *shared allele distance* (DAS) (36) utilizando los individuos como OTUs para construir filogenias de relación entre ellos. Y poder determinar de esa manera si los individuos de una misma raza tendían a agruparse en los mismos CLADES.

V.10) Asignación De Raza

Utilizando el programa GeneClass para asignación individual, fue posible calcular a través del método bayesiano y el método basado en distancias genéticas (DAS) la probabilidad de asignación de cada individuo en su raza.

RESULTADOS

RESULTADOS

I) DESCRIPCION DE LAS RAZAS EN ESTUDIO

I.1) Polimorfismos Bioquímicos

Todos los marcadores proteicos (Al, Xk, Es y Tf) resultaron polimórficos en los PPA y en los CA. Se observaron 13 variantes en PPA y 12 variantes en CA (tabla 1).

El número efectivo de alelos más bajo se observó en el sistema de las transferrinas (Tf) en PPA (3,8802) y el más alto fue en el sistema Post-albúmina (Xk) en los CA (1,2495).

A través de los índices F_{Iski} (140), (Fórmula 2.1), (tabla 2) se observó la conformación en cuanto a exceso o déficit de homocigotas de cada alelo en cada sistema de las poblaciones en estudio y el grado de significancia de cada desvío que indica el exceso o déficit de homocigotas (Fórmula 2.3).

El número promedio de alelos por loci fue 3,25 en los PPA y 3 en los CA .

I.1.a) ALBÚMINA (Al)

Mientras que en los CA en el sistema Al el alelo A ($f = 0,7$) fue el más frecuente, en los PPA resultó más frecuente el alelo B ($f = 0,6474$), (tabla 3).

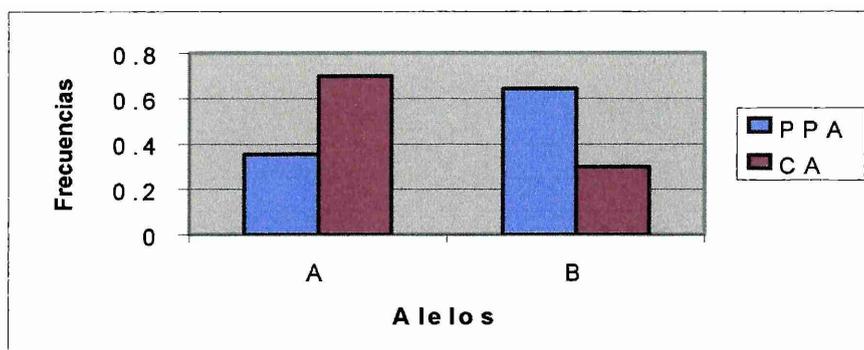


Figura nº 1. Frecuencias génicas en el sistema Al

A través del índice F_{ISki} , por alelos (tabla 2), se analizó el exceso de homo o heterocigotos. Así, se observó en los PPA que ambos alelos resultaron en valores de F_{ISki} positivos pero no significativos, indicando un mayor número de individuos homocigotas ($0,7 > p > 0,5$). En los CA por el contrario, ambos resultaron negativos pero tampoco en forma significativa ($0,7 > p > 0,5$), indicando un mayor número de individuos heterocigotas.

I.1.b) ESTERASA ALCALINA (Es)

En el sistema Es en el CA el alelo más frecuente resultó el I ($f = 0,775$), y en el PPA la variante F ($f = 0,3919$), (tabla 3). Además, en esta última raza se detectó la variante S que no se observó en el CA.

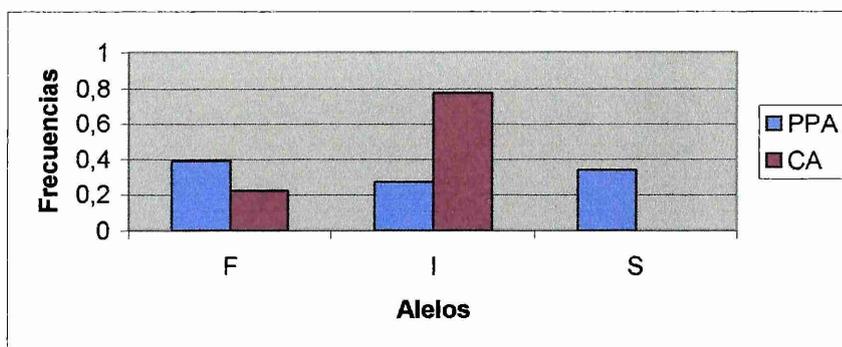


Figura nº 2. Frecuencias génicas en el sistema Es.

A través de los índices F_{ISki} , (tabla 2) se observó que en los PPA todos resultaron positivos pero solo el alelo I en forma significativa ($0,01 > p > 0,001$) indicando exceso de homocigotas. En tanto, en los CA resultaron positivos los dos alelos presentes pero ninguno en forma significativa ($0,20 > p > 0,10$).

I.1.c) POST ALBÚMINA (Xk)

En el sistema Xk en las dos razas el alelo K resultó ser el más frecuente con una frecuencia similar en ambas (CA $f = 0,8875$; PPA $f = 0,8375$) (tabla 3).

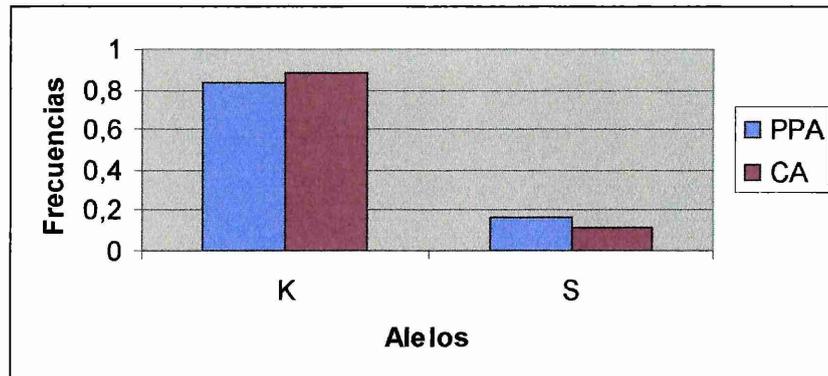


Figura nº 3. Frecuencias génicas en el sistema Xk.

En el cálculo de los índices $F_{I_{ski}}$ por alelos se observó que tanto en el PPA y como en el CA resultaron negativos y no significativos ($0,20 > p > 0,10$; $0,50 > p > 0,30$ respectivamente) (tabla 2).

I.1.d) TRANSFERRINA (Tf)

Es el sistema proteico más polimórfico en ambas razas. El alelo más frecuente en los CA fue F_2 ($f = 0,425$), luego D ($f = 0,3125$) y H ($f = 0,1125$). En tanto que en PPA el alelo D ($f = 0,375$) resultó ser el más frecuente, luego F_1 ($f = 0,236$) variante no presente en los CA y, por último F_2 ($f = 0,1806$) (tabla 3).

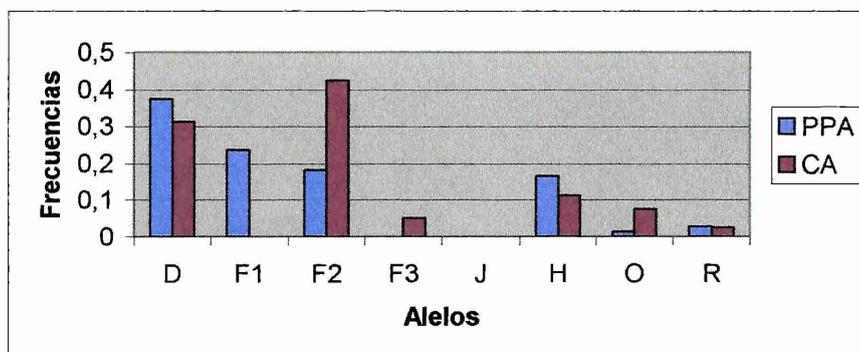


Figura nº 4. Frecuencias génicas en el sistema Tf.

A través de los índices F_{iski} , se determinó que en los PPA los alelos F_1 y F_2 resultaron positivos y significativos ($p < 0,001$; $0,01 > p > 0,001$) evidenciando exceso de homocigotas, en tanto en los CA la variante F_3 resultó positiva y significativa ($p < 0,001$) (tabla 2).

I.2) POLIMORFISMOS DE ADN DEL TIPO MICROSATELITE

Todos los marcadores microsatélites resultaron polimórficos en los PPA y los CA. En total se observaron 57 alelos en los caballos PPA y 62 alelos en los CA en todos los sistemas de microsatélites analizados (tabla 12). El número promedio de alelos por loci fue de $7,12 \pm 1,35$ en los PPA y $7,75 \pm 1,66$ en los CA.

En general, se observaron números efectivos elevados, lo que indica el grado de polimorfismo de los sistemas analizados. Ambas razas muestran una media de número efectivo similar CA $4,5928 \pm 0,9273$ y PPA $4,4558 \pm 0,7448$.

La nomenclatura de los alelos fue tomada de los test de comparación internacional organizados por la ISAG (tabla 13).

I.2.a) HMS6

En el sistema HMS 6, se observaron 6 alelos en los PPA y 9 alelos en los CA . En los PPA se observó como alelo más frecuente el alelo P ($f = 0,257$), luego los alelos K y O con una frecuencia de 0,23 y 0,203 respectivamente. Los alelos L ($f = 0,122$), M ($f = 0,081$) N ($f = 0,108$), resultaron poco frecuentes. En los caballos CA los alelos característicos del sistema fueron P ($f = 0,368$) y luego M ($f = 0,316$). Con mucha menos frecuencia se presentaron los alelos N ($f = 0,092$) y Q ($f = 0,066$). Los restantes alelos (J, K, L, O y R) se observaron con una frecuencia de 0,05 o menor, por lo que pueden ser clasificados como poco frecuentes (20).

A través de los índices F_{iski} se obtuvieron valores significativos y positivos para el alelo K en los PPA ($0,01 > p > 0,001$) y para los alelos L y O en los CA ($P > 0,001$) evidenciando aumento significativo de homocigotas para dichos alelos (tabla 13).

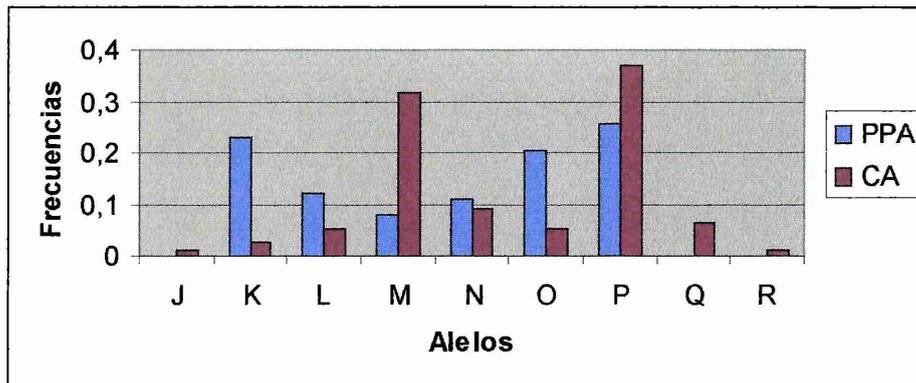


Figura nº 5. Frecuencias génicas en el sistema HMS6.

I.2.b) HMS7

En el sistema HMS 7 se detectaron 5 variantes alélicas en los CA y 6 en los PPA. En esta última raza se encontró al alelo L ($f = 0,461$) como el más frecuente, luego el alelo K ($f = 0,171$), J ($f = 0,145$), M ($f = 0,079$) y N ($f = 0,092$). O ($f = 0,053$). En los CA los alelos más frecuentes resultaron el alelo M ($f = 0,363$) y O ($f = 0,338$) luego N ($f = 0,162$), L ($f = 0,112$).

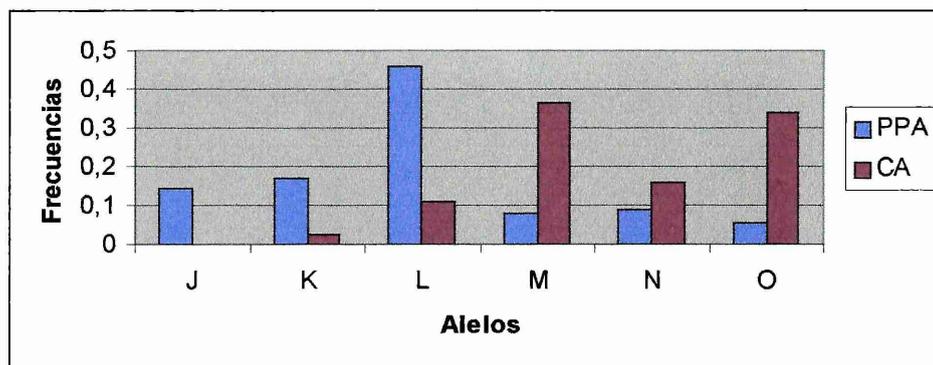


Figura nº 6. Frecuencias génicas en el sistema HMS7.

Los índices F_{ISki} resultaron positivos y significativos los siguientes alelos en los PPA para los alelos K ($0,01 > p > 0,001$), L ($0,01 > p > 0,001$), M ($0,02 > p > 0,01$) evidenciando exceso de homocigotas. En tanto en los CA tres alelos resultaron negativos y dos positivos pero ninguno en forma significativa, (tabla n° 13).

I.2.c) AHT4

En el sistema AHT 4 en tanto, se determinaron 8 alelos en los CA y 9 en los PPA. En estos últimos los alelos H (0,3) y O (0,287), fueron los más frecuente en la raza PPA, Luego J (0,188), N (0,112) y L (0,063). Los restantes alelos I, K, M y P pueden ser considerados poco frecuentes. En los CA el alelo J fue el más frecuente (0,444), luego H (0,153), K (0,097), I, M, O con 0,069. Los alelos L y N pueden ser considerados como poco frecuentes en la raza.

En el análisis de los F_{ISki} en los CA tres alelos resultaron positivos y significativos : I ($p < 0,001$), M ($0,01 > p > 0,001$) y N ($p < 0,001$) (tabla 13).

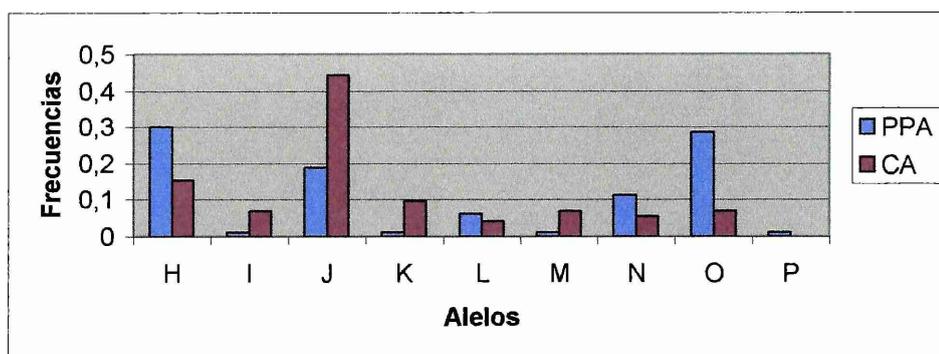


Figura n° 7. Frecuencias génicas en el sistema AHT4.

I.2.d) HTG6

En el sistema HTG6 en los caballos CA se observaron 7 alelos y 9 en los PPA. En estos el alelo más frecuente resultó N (0,308), luego J (0,205), G (0,167), O (0,128), I (0,103), los alelos H, K, L y M resultaron los alelos poco frecuentes. En CA el alelo más frecuente

resultó I (0,306); luego N (0,208); con la misma frecuencia G y O (0,139); por último J (0,111) y M (0,083). El alelo L resultó poco frecuente (0,014).

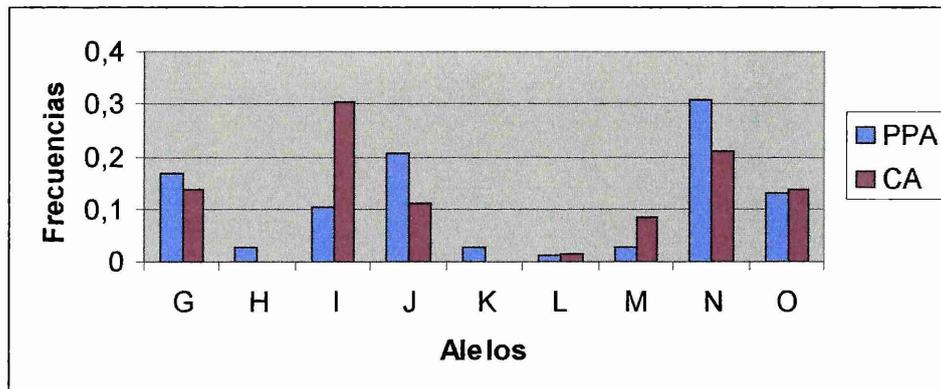


Figura nº 8. Frecuencias génicas en el sistema HTG6.

En los valores de F_{Iski} cuatro alelos resultaron positivos significativamente en los PPA; G ($0,01 > p > 0,001$), J ($0,01 > p > 0,001$), N ($0,02 > p > 0,01$) y O ($0,01 > p > 0,001$). En tanto en los CA también cuatro alelos resultaron positivos significativamente; G ($0,01 > p > 0,001$), I ($p < 0,001$), J ($p < 0,001$), M ($0,02 > p > 0,01$) y N ($p < 0,001$) (tabla 13).

I.2.e) HMS2

En el sistema HMS2 ambas razas presentaron 8 variantes alélicas. En PPA el alelo más frecuente resultó N (0,368), luego J, K y S con frecuencias respectivas 0,191, 0,162 y 0,132. El resto de los alelos resultaron poco frecuentes (L, M, O y R). En CA el alelo más frecuente al igual que en PPA resultó N (0,278), luego los alelos K y L con una frecuencia de 0,208. Luego M (0,111), J (0,083). Y los alelos O y R resultaron poco frecuentes.

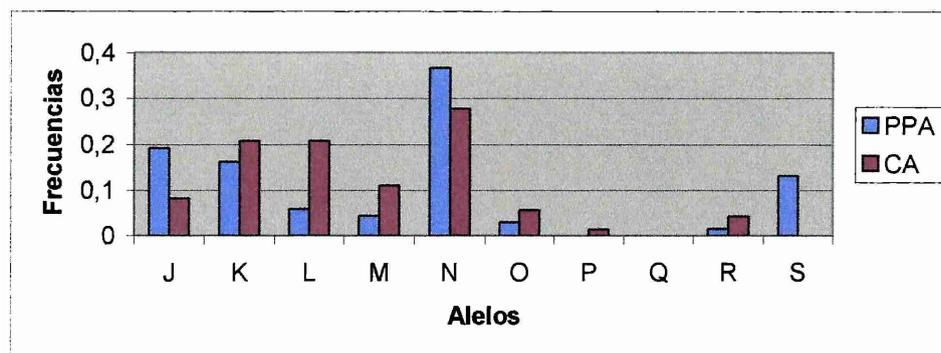


Figura nº 9. Frecuencias génicas en el sistema HMS2.

En el análisis de los valores de F_{Iski} cuatro alelos resultaron positivos en forma significativa en los PPA: K ($p < 0,001$), L ($p < 0,001$), M ($p < 0,001$) y N ($0,01 > p > 0,001$), mientras que en los CA solo tres alelos resultaron positivos significativamente K y L ($p < 0,001$), y J ($0,02 > p > 0,01$) (tabla 13).

I.2.f) AHT5

En el sistema AHT5 los CA presentaron el mayor número de variantes alélicas (10) de todos los sistemas analizados mientras que los PPA presentaron solo 6 alelos. En PPA el alelo más frecuente fue O (0,329), luego K (0,2), M (0,157), N (0,143) y P con una frecuencia de 0,057 resultó el poco frecuente. En CA K fue el alelo más frecuente con una frecuencia 0,265. Luego J (0,191), M (0,176), N y O (0,103), P (0,074). Alelos poco frecuentes resultaron G, H, I, L.

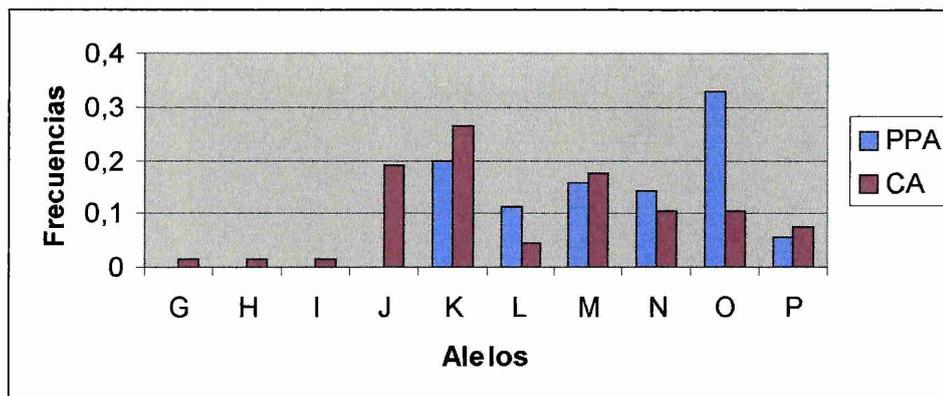


Figura nº 10. Frecuencias génicas en el sistema AHT5.

En los valores de F_{lski} en los PPA dos alelos resultaron positivos en forma significativa K ($0,02 > p > 0,01$) y P ($p > 0,001$). En los CA el alelo P resultó positivo en forma significativa ($0,01 > p > 0,001$) (tabla 13).

I.2.g) HTG4

En HTG4 ambas razas presentaron igual número de alelos (6). En la raza PPA el alelo más frecuente fue M (0,472), luego N (0,194), L (0,181), K (0,111). O y P resultaron los alelos poco frecuentes. En CA el alelo M resultó el más común (0,425), luego K (0,3), L (0,175). Mientras que J, N y O resultaron los alelos menos frecuentes.

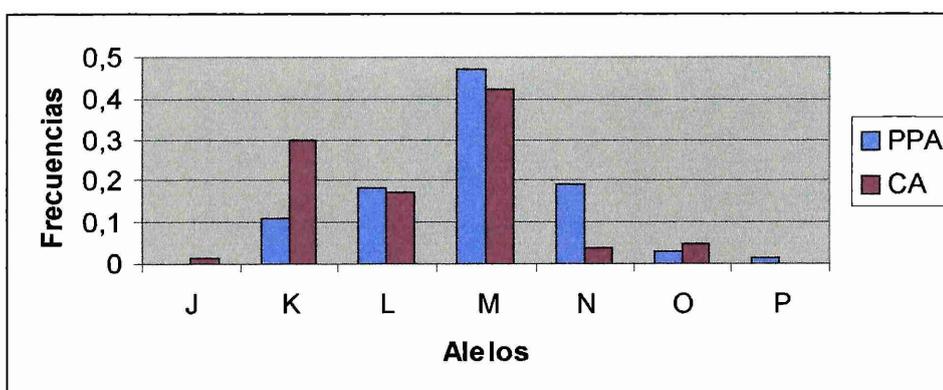


Figura nº 11. Frecuencias génicas en el sistema HTG4.

En los PPA solo un alelo resultó positivo en forma altamente significativa, el alelo O ($p < 0,001$), en los CA los alelos L ($0,01 > p > 0,001$), M ($p < 0,001$) y N ($p < 0,001$) resultaron positivos en forma altamente significativa (tabla 13).

I.2.h) ASB2

En ASB2 en la raza PPA se determinaron 7 alelos mientras que en los CA se observaron 9 alelos. En los PPA el alelo más común fue K (0,297), luego N (0,243), M (0,189), P (0,149), O (0,081), y menos frecuentes R y L. En CA O y N resultaron los más frecuentes (0,281 y 0,266 respectivamente), luego P (0,141), L (0,094), M (0,078), Q (0,063). Mientras que J y R resultaron los menos frecuentes.

En los PPA cuatro alelos resultaron positivos en forma altamente significativa: K, M, N y O todos con una probabilidad $< 0,001$. mientras que en los CA también cuatro alelos resultaron positivos en forma altamente significativa, estos fueron J, O y S ($p < 0,001$) y el alelo M ($0,01 > p > 0,001$), (tabla 13).

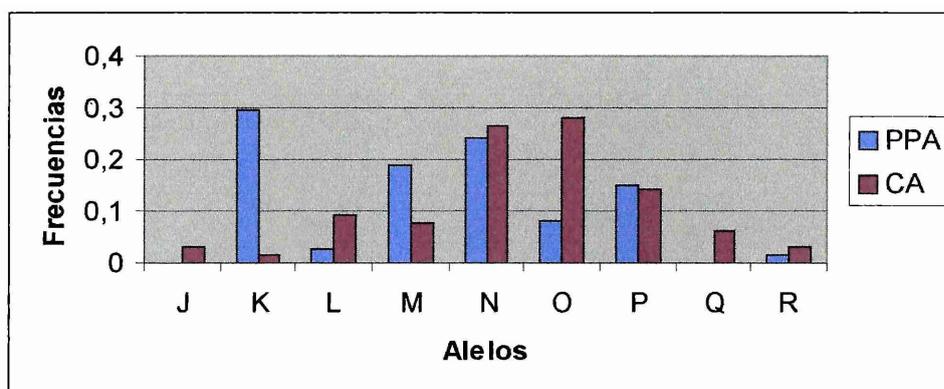


Figura nº 12. Frecuencias génicas en el sistema ASB2.

II) COMPARACION DE LOS PPA CON LOS CA

II.1) Niveles De Diversidad Genética En Los Polimorfismos Bioquímicas

Las heterocigosidades observadas en la totalidad de la muestra presentan valores extremos que van de 0,225 en el locus Xk a 0,675 en el sistema Tf en los CA.

En el análisis de las heterocigosidad promedio observadas a través de los cuatro loci para las dos razas (PPA y CA) presentaron un valor similar $0,4671 \pm 0,1061$ en PPA y $0,4125 \pm 0,1984$ en CA.

Las varianzas de las heterocigosidades promedio (Fórmula 3.3) resultaron muy bajas en PPA ($0,0008 \pm 0,0286$) y en los CA ($0,0007 \pm 0,0275$), (tabla 10).

La concordancia general entre los valores observados y esperados de heterocigosidad en los polimorfismos bioquímicos analizados en las dos razas sugiere que la mayoría se halla en equilibrio de Hardy-Weinberg, hecho que es realmente así ya que citamos en el apartado anterior que solo Tf en los PPA se encontró en desequilibrio, lo cual se refleja en la diferencia del valor esperado de h, siendo este mucho mayor que el valor observado.

Cuando se realiza el análisis en ambas poblaciones en conjunto la discrepancia entre los valores observados y esperados es mayor. Esto sería por el efecto de juntar poblaciones distintas (PPA y CA).

Por otro lado a través de la prueba de t se pudo establecer que la división entre las razas no habría producido una pérdida estadísticamente significativa de la diversidad genética en cada una de ellas con respecto a la población considerada en conjunto.

II.2) En Los Marcadores Moleculares

Las heterocigosidades observadas en la totalidad de la muestra varían entre 0,4054 en el sistema ASB2 en los PPA a 0,8235 en el locus AHT5 en los CA . Del análisis de las heterocigosidad promedio observadas surge que ambas razas presentan un valor similar $0,6369 \pm 0,1314$ en los PPA y $0,646 \pm 0,1197$ en los CA

La discordancia general entre los valores heterocigosidad observados y esperados de en las dos razas sugiere que la mayoría se halla en desequilibrio de Hardy-Weinberg, como se mencionó en el apartado referido a dicho tópico.

Cuando el análisis se realiza con ambas poblaciones juntas la discrepancia es mayor entre los valores observados y esperados fue mayor debido a que se trata de poblaciones distintas.

Tanto las varianzas de las heterocigosidades promedio así como por locus fueron muy bajas. (tabla 20). Por otro lado a través de la prueba de t se pudo establecer que la división

entre las razas no habría producido una pérdida estadísticamente significativa en la diversidad genética.

II.3) COMPARACION CON RAZAS EQUINAS RELACIONADAS ANCESTRALMENTE

II.3.1) Distancias Genéticas

En el presente trabajo se utilizó el programa DISPAN, que calcula la distancia estándar y la distancia DA de Nei (91, 92), a partir de las frecuencias alélicas. Fueron calculados árboles de distancia donde se aplicaron 1000 repeticiones de *bootstrap*, para los polimorfismos bioquímicos y para los microsatélites, además se utilizaron datos bibliográficos de frecuencias de razas relacionadas con las razas en estudio. No fue posible utilizar las mismas razas en ambos tipos de marcadores porque no se hallaron los datos publicados. En polimorfismos bioquímicos se utilizaron los datos bibliográficos de la comparación de frecuencias citada en el apartado anterior. Para los microsatélites además de los datos de los PPA y los CA, se emplearon datos de los caballos Cuarto de Milla (QH)(21), de las razas europeas Sangre Pura de Carrera (SPC) (133), Asturcón (AS)(38), y por último los asnos Zamoranos (ZA), (4) como *outgroup* (grupo externo)

En todos los árboles el número de los nodos corresponden a los valores de *bootstrap*. (Figuras 13, 14 y 15). En los tres dendogramas se observan en *clusters* (agrupamientos) separados los PRE de los CA y los PPA. Estos últimos a su vez en los árboles generados con microsatélites se observan junto a los AS formando un *cluster*.

En los polimorfismos bioquímicos las distancias estándar van de 0,1743 entre los CA y los CH a 0,0174 entre los PRE y los PF, (tabla nº 22). En tanto las distancias DA obtenidas (figura 13) fueron de 0,201 entre los PPA y los CH a la menor observada (0,0285) entre los PRE y PF. El árbol obtenido a partir de la distancia DA mostró a los CA y los PPA estos agrupados a su vez con los BE. Esto está avalado por valores de *bootstrap* elevados (69-85%) que le dan contundencia a estos resultados. En otro *cluster* se agrupan los PRE junto con los PF y estos se relacionan de manera distante con los CH. Por último, en un *cluster* aparte quedan los CH y los PF.

Con los microsatélites se realizaron dos comparaciones. En la primera se utilizaron cinco razas (PPA, CA, PRE, AS y SPC) tipificadas para seis microsatélites (HMS6, HMS7, HTG6, HMS2, HTG4 y ASB2), y en la otra se consideraron siete razas (PPA, CA, QH,

PRE, AS, SPC y ZA) analizadas con tres microsatélites (HMS6, HMS7, HTG6). Esto último fue para incorporar más razas en el análisis.

Para las distancias estándar obtenidas en el primer caso (cinco razas y seis microsatélites), el valor mayor correspondió a PRE y AS (0,7665) y el menor valor a PPA y CA (0,2964). En las distancias DA la mayor distancia también correspondió a PRE y AS (0,4012) y la menor a PPA y CA (0,152). (tabla 24). El árbol obtenido a partir de la distancia DA (92) (figura 15) agrupó a las razas estudiadas en dos cluster principales. Por un lado quedaron los PRE y los SPC y en la otra rama principal los CA y los PPA estos últimos unidos en un *cluster* con los AS. La consistencia de estos árboles surge de los valores de *bootstrap* obtenidos.

En el segundo cálculo las distancias fluctuaron entre 4,5688 entre los AS y los ZA y 0,2803 entre los QH y CA. En la distancia DA el valor más elevado también correspondió a los AS y ZA (0,923) y el menor valor a los PPA y los QH (0,1724)(tabla 23). El árbol obtenido a partir de la distancia DA (92)(figura 14) agrupó en un primer *cluster* a los ZA como *outgroup* y las restantes razas juntas. Primero se diferencia los PRE como raza ancestral a las demás, luego los SPC, en otra rama los CA y por último los PPA agrupados en un último cluster junto con los AS.

III) DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

III.1.a) Índices De Fijación En Los Polimorfismos Bioquímicos

A través de los índices F_{IS} (140) por sistema se observó la conformación en cuanto a exceso o déficit de homocigotas de las poblaciones en estudio a nivel de los loci. Así resultó que en casi todos los sistemas, en el PPA se expresan en valores positivos, (sólo Xk es negativo), mientras que en los CA dos de los sistemas resultaron negativos (Al y Xk) y dos positivos (Es y Tf). Sin embargo solo Tf en PPA resultó significativo al análisis del χ^2 (Fórmula 2.3)(tabla 8).

En el análisis del $F_{is_{ki}}$, (Fórmula 2.1), como ya fue citado anteriormente, solamente los alelos del sistema Xk en ambas razas, los alelos del sistema Al en los CA y los alelos H, O y R en Tf en los CA resultaron negativos, indicando aumento de heterocigotas. Los demás alelos resultaron todos positivos (tabla 2). De los cuales solamente el alelo I en el sistema Es y los alelos F_1 y F_2 en la raza PPA resultaron positivos en forma significativa. En los CA solo el alelo F_3 del sistema Tf resultó positivo en forma significativa para el mismo análisis.

El exceso de homocigotos encontrado para el sistema Tf en los PPA originó el desequilibrio de Hardy-Weinberg. El sistema Xk resultó en valores negativos pero no significativos reflejando el hecho que cuando se presentó el alelo S siempre fue en heterocigosis. De todas maneras ningún desvío fue significativo. En los CA también se observó exceso de heterocigotas en el sistema Xk y en el sistema Al en forma no significativa. En el sistema Tf la mitad de los alelos resultaron positivos pero ninguno en forma significativa hecho que se refleja en el equilibrio encontrado en este sistema en los CA.

En cuanto a los marcadores moleculares en los PPA numerosos alelos resultaron positivos y significativos, mientras que los que resultaron negativos ninguno lo fue en forma significativa (tabla 13), indicando claramente el exceso de homocigotas determinado en el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg. En los CA sucedió lo mismo, todos los valores de $F_{F_{iski}}$ significativos eran positivos, indicando el exceso de homocigotas ya descrito en el punto anterior.

En cuanto al índice F_{ST} para ver la diferencia entre las poblaciones para los marcadores bioquímicos en conjunto resultó del 15%, el cual está dado por los valores que toma F_{ST} en los sistemas Al (20%) y Es (27%), marcando grandes diferencias entre las poblaciones en estudio, dada por los alelos diferenciales de raza. Por esta razón fueron analizados cada alelo para el valor F_{ST1} (Fórmula 2.4) para ver de que manera contribuía cada uno de los alelos a la diferenciación citada. Dicho análisis reveló que tanto el alelo A como el B en el sistema Al contribuían de igual manera (23%), mientras que en el sistema Es el alelo I dio un valor de F_{ST1} del 50% y el alelo S del orden del 40% (este último es exclusivo de los PPA) (tabla 9). En el sistema Tf el valor de F_{ST} resultó del 6%, y el alelo que más varió en este sistema entre ambas razas fue F_1 , que está presente en los PPA ($f = 0,23$) y ausente en los CA. Otro alelo que es exclusivo en este caso de los CA, el F_3 , aunque no marca una diferencia tan importante ($F_{ST1} = 5\%$) dado que su frecuencia es baja ($f = 0,05$), encontrándose en el límite de alelo poco frecuente.

III.1.b) Índices De Fijación En Marcadores Moleculares

Mediante los índices F_{iski} (tabla 13) de cada raza se determinó la estructura en cuanto a exceso o déficit de homocigotas. Así, resultó que casi todos los sistemas en ambas razas se expresan en valores positivos, (sólo HMS7 en CA y HTG4 en PPA resultaron negativos) lo que indica elevado número de homocigotas en los animales en estudio, pero solo en algunos casos dichos valores resultaron positivos en forma significativa: Los sistemas HTG6, HMS2 y

ASB2 en los PPA ; y los sistemas HTG6 y HTG4 en los CA. Del análisis de F_{IS} de las poblaciones en conjunto resultó que todos los valores fueron positivos. Y los sistemas HTG6, HTG4, HMS2 y ASB2 en forma significativa (Tabla 18).

El valor total de F_{ST} cercano al 6,5% ($p < 0,0000$), (tabla 18) indica que ese porcentaje de variación genética se debe a la diferencia entre las razas estudiadas, el restante 93,5% es debido a diferencias entre individuos.

A través de los valores de F_{STk} se pudo determinar que el valor mayor correspondía al locus HMS7 con 17%, luego HMS6 (7,31%) y AHT4 (7,24%). Para discriminar que alelo contribuía más en cada sistema se realizó el análisis de los valores de F_{ST1} (tabla 21), para el locus HMS7 se observó que los alelos L (29%), O (25%), J (15%) contribuían en mayor grado y en menor medida K (12%). Esto es así dado las grandes diferencias entre los valores de las frecuencias génicas de las razas en estudio (ver resultados por sistemas). Así por ejemplo el alelo L que es el más común en los PPA ($f = 0,461$) resultó con una frecuencia de 0,112 en los CA. Otro tanto sucede con O (PPA $f = 0,053$ mientras que en los CA ($f = 0,338$) y J que está presente en los PPA ($f = 0,145$) y ausente en los CA.

Ambas razas presentan en promedio un déficit del 18% ($0,02 < p < 0,01$) de heterocigotas. Y en conjunto presentan un déficit del 24% ($F_{IT} = 0,2408$; $0,01 < p < 0,001$) (tabla 18).

III.2) Comparación De La Distribución De Las Frecuencias Génicas Y Genotípicas

III.2.a) Test Exacto Para Diferenciar Poblaciones En Polimorfismos Bioquímicos

Para evaluar los niveles de diferenciación génica entre los CA y los PPA se utilizaron tablas de contingencia para contrastar la hipótesis que la distribución alélica ó génica es idéntica a través de las poblaciones (H_0). Para tal fin fue utilizado el test de probabilidad ó *Fisher exact test* (105), el cual resultó altamente significativo ($p = 0,0000$) con un valor de χ^2 tendiente a infinito cuando se consideraron las razas en conjunto. Con el mismo criterio se analizó la distribución genotípica, resultando también altamente significativa al test de Fisher ($p = 0,000$) (tabla 11).

Analizando cada marcador en cada raza con las hipótesis citadas solo el sistema Xk resultó con idéntica distribución de las frecuencias génicas y genotípicas entre ambas razas ($p = 0,492$; $p = 0,449$ respectivamente). En tanto los demás marcadores resultaron altamente significativos ($p < 0,000$).

III.2.b) Test Exacto Para Diferenciar Poblaciones En Los Marcadores Moleculares

Al igual que con los marcadores bioquímicos, para evaluar los niveles de diferenciación génica entre los CA y los PPA se utilizaron tablas de contingencia para contrastar la hipótesis que la distribución alélica ó génica es idéntica a través de las poblaciones (H_0). Utilizando el test de probabilidad ó *Fisher exact test* (105), el cual resultó altamente significativo ($p < 0,0000$). Con el mismo criterio se analizó la distribución genotípica, resultando también altamente significativa ($p < 0,0000$) en el marcador HMS6, HMS7, AHT4.

En el sistema HTG6 la comparación de las frecuencias génicas entre los PPA y los CA resultó significativa ($p = 0,015$). En cambio, las frecuencias genotípicas presentaron diferencias no significativas ($p = 0,063$). Nuevamente en el sistema HMS2 las diferencias génicas y genotípicas resultaron altamente significativas ($p = 0,0006$ y $p = 0,0059$, respectivamente), al igual que en AHT5 ($p = 0,0001$ y $p = 0,0001$, respectivamente) y ASB2 ($p < 0,0000$ y $p = 0,0002$). En tanto en el sistema HTG4 surgió que existían diferencias significativas en ambos niveles ($p = 0,0028$ y $p = 0,0093$ respectivamente).

IV) MECANISMOS EVOLUTIVOS QUE DIFERENCIARON LAS RAZAS:

IV.1.a) Cálculo Del Equilibrio En Polimorfismos Bioquímicos

Para comprobar si cada población estaba en equilibrio de Hardy- Weinberg, se realizaron pruebas de χ^2 (Ji cuadrado), de contraste entre los valores observados y esperados para las diferentes clases genotípicas y el número de alelos, por raza y en conjunto en aquellos marcadores que por su número de alelos permitían aplicar este test (Al, Xk y Es). Resultando todos los polimorfismos bioquímicos en equilibrio (tabla 4).

Por otra parte se utilizó el programa Genepop 3.1(105) que permite realizar tres test distintos para chequear el equilibrio de Hardy- Weinberg: el test de probabilidad y los test exactos para exceso o déficit de heterocigotas, todos con la misma hipótesis nula (H_0 = unión al azar de las gametas) y la diferencia entre ellos es la zona de exclusión.

-El **Probability-test** se realizó a través de los loci y las poblaciones. El análisis en conjunto fue construido por el método Fisher's.

Para los sistemas Al, Xk, Es se utilizó el algoritmo de la enumeración completa. Para el sistema Tf que presentó más de 5 alelos en las dos muestras analizadas se utilizó el método en cadena de *Markov*. Los tests resultaron no significativos en todos los marcadores bioquímicos con excepción del sistema Tf en los PPA ($P = 0,022$), (tabla nº 5). Los χ^2 por

razas resultaron no significativos en ambos casos (tabla nº 5) y el mismo análisis para loci y razas en conjunto resultó significativo ($p < 0,05$).

Para ajustar los resultados en relación con las hipótesis de déficit o exceso de heterocigotas se utilizaron los test exactos, calculados con el mismo programa:

-Para el test exacto con $H_1 =$ Déficit de heterocigotas se utilizó el mismo esquema de algoritmos explicado en el punto anterior. Nuevamente el sistema Tf en los PPA resultó significativo ($p = 0,012$) y también el sistema Es en la misma raza (tabla nº 6).

-Para el test exacto con $H_1 =$ Exceso de heterocigotas, con la misma aplicación de los algoritmos, en este caso ningún sistema resultó en desequilibrio (tabla nº 7).

IV.1.b) Cálculo Del Equilibrio En Polimorfismos Moleculares

El test de probabilidad (*Probability-test*) se realizó a través de los loci y las poblaciones. El análisis en conjunto fue construido por el método Fisher's. Por el cual se pudo establecer que solo los sistemas HMS6 y AHT4 se hallaron en equilibrio, el sistema HMS7 resultó en desequilibrio significativo. En tanto HTG6, HMS2, AHT5, HTG4 y ASB2 en desequilibrio de Hardy-Weinberg altamente significativo (tabla 14).

Analizando del punto de vista de déficit o exceso de heterocigotas por F_{IS} (Genepop 3.1) (tabla 15 y 16) en el primer caso resultaron en desequilibrio en los PPA en forma significativa el sistema HMS7 ($p = 0,047$), muy significativa HTG6 ($p = 0,008$), HTG4 ($p = 0,017$), y altamente significativos HMS2 ($p < 0,000$), ASB2 ($p < 0,000$). En los CA los sistemas AHT4 ($p = 0,022$), HMS2 ($p = 0,003$) presentan desequilibrio de H-W en forma significativa, el sistema HTG4 en forma muy significativa ($p = 0,007$) y, por último, en forma altamente significativa HTG6 ($p < 0,000$), ASB2 ($p < 0,000$).

En la hipótesis de exceso de heterocigotas ningún sistema resultó significativo en ninguna de las dos razas (tabla 16).

V) GRADO DE DISCRIMINACIÓN DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS

V.1) Análisis De Parentesco

La eficiencia de la exclusión dada por cada sistema o varios en conjunto puede ser evaluada a través de la probabilidad de exclusión. La cual estima la habilidad de un marcador para determinar la exclusión al azar de un padrillo o yegua madre según sea el caso como

posible progenitor, inclusive de ambos a la vez. Esa exclusión depende de las frecuencias alélicas para cada locus.

Aplicando la fórmula de Q (Fórmula 4.0)(tabla 19) fue posible determinar para ambas razas dichos valores. Resultando mucho menores para el caso de los marcadores bioquímicos con respecto a los moleculares; en la raza PPA en el caso de la Q simple combinada para los loci bioquímicos fue de 0,6505 y la doble 0,1873 para los mismos tipo de marcadores. En tanto en la raza CA ambos valores fueron un poco más elevados 0,7626 (Q simple) y 0,3195 (Q doble). Cuando se consideraron los marcadores moleculares (microsatélites) en el caso de los PPA el valor de Q simple se elevó a 0,9988 para los ocho marcadores en conjunto mientras que la Q doble fue de 0,9864. En los CA también se observaron valores elevados 0,9989 (Q simple) y 0,9876 (Q doble).

En ambas razas considerando el set de marcadores bioquímicos y moleculares en conjunto el valor de Q se aproximó a la unidad, así en los PPA la Q simple tomo un valor de 0,9997 y la Q doble 0,9964, en tanto los CA el valor de Q simple fue de 0,9996 y la Q doble 0,9952.

V.2) Filogenia Con Individuos Como Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

El resultado fue un árbol (figura 16) que presenta 3 ramas principales para cada raza. En las primeras se agrupan 35 de los 40 caballos PPA , solo 5 caballos CA se ven entre los PPA. En el otro grupo de tres ramas hay 35 de los 40 CA y solo 5 PPA aparecen allí.

V.3) Asignación De Raza

Utilizando el programa GENECLASS y aplicando el método *bayesiano* fue posible asignar 18 de 40 (45%) individuos PPA como tales, 3 PPA (7,5%) fueron asignados erróneamente a los CA. Por ultimo 18 caballos PPA (45%) fueron clasificados en ambas razas y solo 1 quedó sin asignar.

En tanto en los CA 23 caballos fueron asignados correctamente (57,5%) y 15 animales en ambas (37,5%). Mientras que solo 2 (5%) quedaron sin clasificar.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

I) PERFIL DE LAS RAZAS ANALIZADAS

I.1) Polimorfismos Bioquímicos

Es posible trazar lo que se denomina perfil de las razas determinando los alelos más frecuentes en los distintos sistemas. Así en la raza Paso Peruano Argentino (**PPA**) en el sistema albúmina el alelo mayoritario resultó B. En el sistema esterasa, en tanto, los alelos F y S. En Post-albúmina el alelo K y por último en transferrinas los alelos D y F₁. En los Caballos Criollos Argentinos (**CA**) en el sistema AI, por el contrario que en los PPA, el alelo A resultó el más frecuente, en el sistema Es el alelo I y ausente el alelo S, en Post-albúmina (al igual que en los PPA) el alelo K resultó el más frecuente, por último en Tf los alelos más frecuentes fueron F₂ y D mientras que el alelo F₁ no se registró en esta raza.

I.1.1) Comparación Con Datos Publicados De Frecuencias Génicas En Los Marcadores Estudiados En Distintas Razas Equinas

Se realizaron comparaciones tomando datos publicados de frecuencias génicas en polimorfismos bioquímicos de razas relacionadas. Entre las americanas los Chilotes (CH) (32); Los Paso Peruano (PP) y los Paso Fino de Estados Unidos de Norteamérica (PF), (18). Y como razas europeas relacionadas con el origen de los caballos americanos los Pura Raza Español (PRE), (131) y los Berberiscos (BE), (68).

Los PP presentaron, al igual que los PPA ; los BE; los PF y los CH el alelo B como alelo mayoritario en el sistema AI. Los CA por el contrario presentaron el alelo A como más frecuente al igual que los PRE. En el sistema Xk el alelo K fue el más frecuente en todas las razas analizadas. En el sistema Es no fue posible realizar la comparación ya que los datos publicados correspondían a una técnica distinta por lo que los alelos no eran comparables. Por último en Tf los PPA, junto con los PP, PF y PRE presentaron como alelo más frecuente al alelo D luego al F₂, en el caso de los CA y los BE el alelo F₂ resultó más frecuente que el D.

I.2) En Los Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares de tipo microsatélite permitieron determinar como perfil de la raza observado en los **PPA** a los alelos K y P en el sistema HMS6, en tanto, en el sistema HMS7 el alelo L resultó característico. En el sistema AHT4 el alelo más común resultó el H y luego el O. En el sistema HTG6 el alelo N, en HMS2 el alelo N. En el sistema AHT5 el alelo O, en HTG4 el alelo M y, por último, en ASB2 el alelo K. Los alelos L del sistema HMS7 y M del HTG4 con frecuencias de 0,461 y 0,472 respectivamente resultaron los más frecuentes en la raza.

En cuanto a los **caballos Criollos Argentinos (CA)** en el sistema HMS6 los alelos P y M resultaron mayoritarios. En HMS7 los alelos M y O, en el sistema AHT4 el alelo J, (con la frecuencia más elevada observada en todos los sistemas analizados en la raza, $f = 0,444$). En el sistema HTG6 el alelo I, y en el sistema HMS2 (al igual que en los PPA) el alelo N. En el sistema AHT5 el alelo K, en HTG4 (al igual que los PPA) el alelo M. Por último en ASB2 los alelos O y N.

Al igual que en los polimorfismos bioquímicos fueron realizadas comparaciones con frecuencias de razas relacionadas publicadas por diversos autores. De dichas comparaciones surgieron los siguientes datos (tabla 22): los caballos Cuarto de Milla (QH) (21) y Sangre Pura de Carrera (SPC) (131), comparten con los CA en el sistema HMS6 los alelos mayoritarios M y P. Por otra parte los PPA en el mismo sistema presentan también mayoritariamente el alelo P luego comparten el alelo K con los Pura Raza Español (PRE) y el O al igual que los PRE y los Asturcones (AS) (38). En el sistema HMS7 el alelo O de los CA es compartido con los PRE y los SPC, el alelo M está presente en QH, PRE y SPC. En los PPA el alelo L lo presentan también los QH y AS.

En el sistema AHT4 el alelo J de los CA es presentado también como alelo mayoritario en los QH, PRE y SPC. En tanto los PPA comparten el alelo H con los SPC y el O con los SPC y los QH. En HTG6 no existe un patrón de distribución de frecuencias tan homogéneo así el alelo I de los CA está presente pero en muy baja frecuencia en los PPA, QH y AS. Mientras que los PPA comparten el alelo J con QH y SPC. En tanto el alelo N solo se presenta en los CA.

En el sistema HMS2 el alelo N fue el más frecuente en los CA, se presenta también en los PPA, PRE y AS. En AHT5 el alelo K de los CA es compartido por los QH y los PRE (en estos últimos no como alelos mayoritarios), en el caso de los PPA el alelo O presente en los CA, CU, QH y PRE. Tampoco en este caso es el alelo mayoritario.

En el sistema HTG4 los CA presentan los alelos K y M con frecuencias mayores al igual que todas las razas incluidas en la comparación, mientras que solo los PPA presentan como más frecuente al alelo M.

Por último en el sistema ASB2 el alelo K en los PPA lo comparte con los AS y SPC, mientras que los CA presenta como más frecuente el alelo O al igual que los SPC y AS.

II) EL ORIGEN DE LAS RAZAS AMERICANAS

II.1) Propuesta De La Relación Histórica De Las Razas En Estudio

Basándose en los registros históricos, el origen de las razas analizadas estaría dado por los caballos traídos por los conquistadores. De acuerdo a lo citado anteriormente, hay historiadores (2;26), que sostienen que el caballo que hoy se conoce como Pura Raza Española, (PRE), no es el antecesor común de los caballos americanos. Cabrera (26) postula la influencia del caballo Berberisco (BE) sobre el caballo español de la época de la conquista, diferenciando que no se trató de caballos Árabes sino de caballos bereberes traídos por los moros. Describe un caballo de tipo mesomorfo, cuello corto y musculoso, anca redondeada, etc., dichas características son coincidentes con el caballo actual Criollo Argentino (CA), e incluso el Paso Peruano Argentino (PPA). Altamirano (2) cita que el PRE fue creado en 1567, es decir 30 años luego de la primera fundación de Buenos Aires y que incluso resultó un caballo tan bueno que se destinó a la nobleza y el clero. Que de ninguna manera pudieron llegar en gran cantidad a América ya que era un caballo para ese grupo social exclusivamente. Otra historiadora, Von Rust Mc Cormick (134), sostiene que los conquistadores trajeron a América caballos ambladores y trotadores, y que consta en el Archivo de Indias que los caballos españoles de la época de la conquista eran una mezcla de caballos Célticos (de Galicia), Sorraia (de Portugal) y Berberiscos (de Marruecos). Y que los PPA simplemente son consecuencia de la selección intensiva que se llevó a cabo en el Perú del tipo de caballo amblador.

Con el fin de testear estas hipótesis se realizaron árboles a partir de distancias genéticas para determinar la relación que guardaban con las razas propuestas como origen. No fue posible testear con Sorraias y Frisones ya que no existen datos publicados de frecuencias génicas de estas razas en microsatélites.

En los polimorfismos bioquímicos se incluyeron los Chilotes (CH)(32), los Pura Raza Español (PRE)(131), los Paso Fino (PF)(18) y los Berberiscos (BE)(68). Para los microsatélites fueron comparadas las frecuencias génicas de los mismos sistemas de microsatélites con datos bibliográficos de los Pura Raza Español (PRE) (131), la raza de

ponies españoles Asturcones (AS)(38), que serían los representantes de los caballos célticos de Galicia. Otra raza europea como los Sangre Pura de Carrera (SPC) (131). Otra raza americana: el Cuarto de Milla (QH), (21), la cual se supone tienen el mismo origen que los CA y los PPA.

En los polimorfismos bioquímicos y en los microsatélites los árboles obtenidos agrupan a los PPA y los CA en un *cluster* distinto que el PRE. Esto corroboraría las hipótesis planteadas sobre la negación del caballo PRE como antecesor de los mismos. Por otro lado en el árbol de los polimorfismos bioquímicos los BE se asocian con los PPA, avalando una mayor relación con estos caballos.(Figura 13).

Cuando analizamos los árboles obtenidos a partir de los microsatélites (Figuras 14 y 15) podemos observar que los AS se asocian con los PPA. Esto no es menor ya que se cito a los caballos célticos, (los AS), como originarios de los caballos americanos, incluso estos caballos son ambladores, sosteniendo aun más la teoría que citaba que durante la conquista fueron introducidos caballos trotadores y ambladores. La relación con los QH estaría dada por el origen común de estos animales y por otro lado la amplia difusión de dicha raza que actualmente se encuentra en casi todos los países americanos. Por otra parte otras razas americanas que quedan diferenciadas a nivel de los polimorfismos bioquímicos (CH y PF) estaría dado por el aislamiento reproductivo en que se encuentran las mismas. Sobre todo los CH, que habitan en una isla con un aislamiento que data de 1817. Por otro lado los PF han sido sometidos a una intensa selección funcional, fundamentalmente en los países de centroamérica, evitando cruzamientos con razas foráneas y determinando un biotipo con el característico andar ya descrito.

Ouragh (97), sostiene la teoría de que los BE han contribuido a la formación de razas europeas y americanas. Hecho que es citado por otra autora (68), quien encontró una estrecha relación entre estos y los caballos criollos uruguayos (CCU). Estudios realizados en polimorfismos bioquímicos en los CA (99) ligaron a este con los BE, a través de matrices de correlación.

Por lo expuesto es posible afirmar que las razas americanas se encuentran más relacionadas con el BE y en el caso de los PPA con caballos AS, que con el PRE. Sustentando la postura de los historiadores que afirman que los PRE no son antecesores de los caballos americanos. Podemos proponer que en la época de la conquista fueron traídos diversos tipos de caballos, entre los cuales había ambladores (por ej. los AS) y trotadores. Que determinadas circunstancias de cría y aislamiento reproductivo hicieron diferenciar a unas razas americanas de otras. Por ejemplo los PP fueron sometidos a 400 años de intensa selección con un objetivo netamente funcional (andar en ambladura) y un aislamiento

reproductivo dadas las características geográficas del Perú. Los caballos PPA por tener su origen en dichos animales mantienen dicha diferenciación. En tanto los CA (sus ancestros) sufrieron un proceso de selección con diferentes objetivos de cría: básicamente utilidad para diferentes tareas rurales, rusticidad y resistencia. Además su evolución se dio en todo el territorio de nuestro país donde existen diversidad de ambientes en donde adaptarse (desde la pampa húmeda hasta la aridez de la patagonia y el norte argentino). Con extremas condiciones de clima y por ende de comida disponible. Por lo expuesto se logró un tipo de caballo funcional único y que aun hoy se cría en extensión sin requerir muchos cuidados. A diferencia de otras razas equinas que necesitan intensa asistencia.

III) COMPARACION ENTRE LAS RAZAS ANALIZADAS

III.1) Diversidad Genética

La variación dentro de los grupos fue medida como el promedio de la heterocigosidad esperada y el número de alelos observados (n_a). Mientras que entre los grupos por la distancia genética.

En el caso de los marcadores bioquímicos las variables citadas resultaron más acotadas por la naturaleza de los marcadores que presentan menos alelos que los microsatélites. Comparando las razas en estudio los n_a fueron similares en ambas razas a excepción del sistema Es que en los PPA presentó 3 alelos y en los CA 2. En cuanto de H_e en los cuatro sistemas de polimorfismos bioquímicos analizados en conjunto los PPA presentaron valores mayores que los CA (tabla 10). Al comparar los valores de H_e de ambas razas por el método de T de Student no se observaron diferencias significativas. En tanto los valores de heterocigosidad esperada por loci (h_e) los que contribuyeron en mayor medida fueron el loci más polimórfico para ambas razas: Tf ; Luego en los PPA el sistema Es, que en dicha raza presentó 3 alelos y en los CA, en cambio Al.

En los microsatélites analizando los valores de h_e observamos solo 2 sistemas (HMS6 y HTG4) que presentan valores mayores en los PPA con respecto a los CA. Todos los valores de h_e en los PPA contribuyeron en igual medida al valor de heterocigosidad promedio (fueron entre 70-80%), en tanto en los CA sucedió algo similar (h_e entre 69-85%). Los valores de H_e (diversidad génica) son semejantes, 0,7797 en los PPA y 0,7842 en los CA y similares a los obtenidos con estudios realizados en caballos criollos uruguayos (68) $H = 0,729$, en razas de caballos españoles-célticos las H_e van de 0,702 (Pottoka) a 0,760 (Caballo Gallego), (28), y al igual que estas superiores a los caballos Sangre Pura de Carrera ($H_e = 0,677$) reportados en el mismo trabajo. A pesar del aumento de individuos homocigotas observado en distintos

sistemas de los microsatélites, en las razas analizadas, los valores de h_e y de H_e se mantuvieron altos (tabla 20). El test de T tampoco reflejó diferencias significativas entre los valores de H_e halladas en los PPA y los CA. ($t = 2,327$, n.s.).

Por otra parte comparando los valores de h_o y h_e se observa una disminución de los primeros con respecto a los segundos, en los polimorfismos bioquímicos solo en TF en los PPA en tanto en casi todos los sistemas de microsatélites en las razas en estudio (PPA: en todos los loci de STR's con excepción de HTG4; en los CA: lo mismo que en los PPA pero con excepción de HMS7). Dicho hecho se ve reflejado en los desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg observado en numerosos marcadores hacia un exceso de homocigotas, como fue citado en resultados.

El análisis de la población en conjunto (PPA+CA) muestra una mayor divergencia entre la heterocigocidad observada y esperada, siendo esta última notablemente mayor. Esto podría estar dado por unir poblaciones discretas.

En las razas de animales domésticos ocurren usualmente drásticas reducciones en el tamaño efectivo de las poblaciones acompañadas de fenómenos de endocria. Los altos niveles de heterocigocidad pueden verse afectados por estos dos factores, por lo que se podría esperar que el polimorfismo decreciera. En las razas en estudio no existió una pérdida significativa de heterocigocidad. Esto es debido a que la reducción de heterocigocidad a través de un cuello de botella, como fue el momento de la introducción del caballo en América por los conquistadores, no dependió solo del tamaño poblacional, sino también de la tasa de crecimiento poblacional. Durante el cuello de botella se eliminan muchos alelos de baja frecuencia, mientras permanecen los alelos con frecuencias intermedias. Por lo tanto, la disminución de la frecuencia de alguno de los alelos más importantes ha sido compensada por alguna de las variantes intermedias, sin pérdida apreciable de la heterocigocidad.

En cuanto a la tasa de crecimiento poblacional, cuando la población crece rápidamente después de pasar por un cuello de botella, la pérdida de alelos sólo ocurre en las primeras generaciones y no es muy grande. Además, se puede suponer que va acompañada por una expansión territorial por la cual podrían ponerse en contacto subpoblaciones previamente separadas (47). Así podemos inferir que después de la época de la conquista, según registros de la época, en el 1600 se exportaban 100.000 cueros de caballos por año desde América a España (26). Por lo que se puede extrapolar que la tasa de crecimiento poblacional equino en América fue exponencial.

A pesar de haber sido introducido un número finito de caballos durante la conquista, la gran tasa de crecimiento poblacional, debido a la formación de centros de cría en América, el

surgimiento de los baguales y con ellos la expansión territorial, fueron los mecanismos a través de los cuales se mantuvo la variabilidad en ambas razas Y en la muestra de los caballos que se analizó en este trabajo, el número de alelos promedio y la H_e fueron similares con los datos publicados para otras razas indicando que no existen diferencias apreciables en los niveles de variabilidad genética.

IV) DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

IV.1) Índices De Fijación

En el análisis de las razas en conjunto en los marcadores bioquímicos el valor de F_{ST} se eleva al 15%(n.s.), considerado una gran diferencia (139), marcando una clara diferenciación entre las poblaciones en estudio. Ya se citó en el apartado de resultados que las diferencias que daban este valor estarían dadas fundamentalmente por las diferencias observadas en los sistemas Al y Es, ya que presentan alelos mayoritarios opuestos. En tanto en los marcadores moleculares dicho valor fue bastante menor $F_{ST} = 6,5\%$ ($p < 0,000$), lo que indica una moderada diferenciación entre las poblaciones en estudio. El valor observado es similar al reportado para estudios de microsatélites realizados en razas de caballos españoles célticos (8%) (28), en razas de asnos españoles ($F_{ST} = 5\%$)(4), y menor que otros reportes de razas de caballos noruegos ($F_{ST} = 12\%$)(12), en razas bovinas europeas (19%)(80), en perros (9,9%)(65), en cabras (17%) (111) y en humanos del (10-20%)(30).

Con el fin de discriminar cual de los sistemas moleculares contribuía en mayor medida en la diferenciación de las razas en estudio fueron analizados los valores de F_{ST} en conjunto (PPA+CA). Resultaron todos positivos y muchos de ellos en forma significativa (tabla 18), destacándose el sistema HMS7 como un sistema con una gran diferencia ($F_{ST} = 17,9\%$ $p < 0,0000$). Nuevamente dicha diferencia esta dada por la aparición de alelos mayoritarios opuestos entre los PPA y los CA, además la posible presencia del alelo nulo en dicho sistema en los PPA contribuiría a marcar esta diferencia tan notable entre ambas razas. Luego los sistemas HMS6, AHT4 y ASB2 con una moderada diferencia (valores entre 6-7%). En tanto en los polimorfismos bioquímicos el sistema Es aporta una gran diferencia (27%), también dado por alelos mayoritarios opuestos incluso la presencia de un alelo exclusivo de los PPA.

Bowcock (16) postuló que el valor mayor de F_{ST} observado entre poblaciones para determinados loci puede indicar una selección disruptiva (diferentes alelos favorecidos en distintos ambientes). Sin embargo este fenómeno puede ser confundido con mutación y por lo tanto su aplicación a loci del tipo microsatélite puede ser cuestionable. Incluso en el caso de

los marcadores moleculares analizados el sistema HMS7, que es el que presenta mayor valor de F_{ST} , la explicación más factible sería la posible presencia de alelo nulo en los PPA (ver análisis del equilibrio).

Los valores obtenidos de F_{ST} corroboran la división neta entre las poblaciones estudiadas, e indican un relativo bajo flujo génico entre ellas, probablemente debido al aislamiento reproductivo. El flujo génico se podría explicar por los valores de migración (Nm), los cuales pueden ser interpretados como el límite más alto de migrantes por generación que permiten mantener la diferenciación genética entre razas (28). Entre los PPA y los CA el valor medio de Nm fue 3,59 para los marcadores moleculares y de solo 0,75 para marcadores bioquímicos (tablas 18 y 8). También se calculó el valor de Nm para las dos poblaciones de los CA, en los marcadores moleculares, que resultó mayor ($Nm = 19,21$) que el observado entre los PPA y CA, lo que indica el mayor grado de relación de las sub-muestras de los CA. En estudios similares realizados en razas de ponies españoles (28), se encontraron valores entre 3 y 7 de Nm , mientras que al comparar estas razas con SPC los valores fueron de 1,4 a 2.

De todas maneras las diferencias encontradas entre las poblaciones en estudio, a partir del postulado que descenderían ambas de los caballos traídos por los conquistadores, estarían explicadas por la deriva génica. Ya fue citado el hecho de las diferentes condiciones de evolución en las razas en estudio. Además las creaciones de los registros de ambas razas en 1917 en los CA y en 1949 en los PPA. Fijando parámetros distintos para el registro de sus animales. En ambos casos se trata de registros abiertos donde existen distintas categorías de animales: los definitivos en una y otra raza son aquellos animales considerados puros, son crías provenientes de animales registrados como puros. Luego hay tres categorías de preparatorios P1, P2, P3 y los definitivos. En el primer caso sería un animal producto de un P1xP2 por ejemplo. Siempre se toma la categoría más baja del cruzamiento como categoría de la cría. La última categoría serían los animales base, los cuales solo por su fenotipo son incluidos en la raza. En el caso de los PPA estos animales ya presentan la característica de la ambladura.

En los marcadores moleculares, el déficit significativo de heterocigotas en promedio fue 18,8% ($p < 0,01$), mientras que el total de la población (F_{IT}) tuvo un 24 % ($p < 0,01$). Ya que este último estimador toma su valor a partir de F_{IS} y F_{ST} se debe considerar ambos para ver como contribuyen estos en los valores que toma F_{IT} . Los valores de F_{ST} ya fueron discutidos por lo que nos focalizaremos en los valores de F_{IS} . En el caso de los F_{ISk} (por loci), (tabla 18) cuatro sistemas resultaron con valores elevados del 17 al 30% y significativos (HMS2, HTG6

y ASB2 y HTG4). En tanto en los polimorfismos bioquímicos el déficit de heterocigotas en promedio resultó de solo 8,4%(n.s.) y el total de 22,79%($p < 0,05$). En este caso la diferencia entre F_{is} y F_{it} está dada por los valores de F_{ST} (15%) (tabla 8) y los valores de F_{isK} que en dos de los cuatro sistemas analizados resultaron valores de entre 15-17%. El exceso de homocigotas podría estar dado entre otras causas por cruzamientos no aleatorios, población subdividida, etc.

Al mostrar diferencias significativas el valor de F_{ST} y por el análisis de heterogeneidad se pueden considerar como dos razas filogenéticamente cercanos pero con rasgos genéticos distintivos.

V) ESTRUCTURA GENETICA

V.1) Análisis Del Equilibrio De H-W

Varios de los marcadores genéticos analizados en el presente trabajo no muestran concordancia entre las combinaciones genotípicas observados y esperados, resultando en desequilibrio. Los marcadores bioquímicos en general se observaron en equilibrio salvo el sistema Tf en los PPA, en tanto los marcadores moleculares (F_{is}) resultaron en desequilibrio en su mayoría. Dicho desequilibrio se observó, en todos los casos, por un exceso de homocigotas. Así en los PPA 6 de 12 sistemas analizados presentaron exceso de homocigotas, (Tf, HMS7, HTG6, HMS2, HTG4, ASB2) mientras que los CA sucede lo mismo pero los 5 sistemas son microsatélites (AHT4, HTG6, HMS2, HTG4, ASB2). Analizando las dos poblaciones en conjunto solo dos marcadores moleculares se encontraron en equilibrio (HMS6 y AHT4), el resto en desequilibrio (HMS7, HTG6, HMS2, AHT5, HTG4 y ASB2).

Entre las numerosas causas que podrían explicar lo observado podemos citar: que los loci en estudio están bajo selección, la presencia de alelos nulos en algunos de los sistemas analizados, (27, 101, 102), la consanguinidad (*inbreeding*), la presencia de sub-estructuración de la población (efecto Wahlund's), y por último la técnica empleada para la detección de los polimorfismos en los microsatélites, (tinción con nitrato de plata), la cual puede presentar el inconveniente de mostrar un individuo como homocigota cuando en realidad no lo es.

La primera de las causas no sería la que se ajusta más a explicar lo que sucede ya que los marcadores utilizados en este estudio serían neutros a la presión de selección. De todos modos no debemos olvidar que el genoma equino no se encuentra aún dilucidado por lo que podrían aparecer grupos de ligamiento que involucren a los marcadores en estudio.

La aparición de alelos nulos en microsatélites ha sido reportada en humanos, osos y equinos (21, 27, 102). Se produce por una mutación en el sitio de unión del cebador lo que produce una falla en la amplificación del alelo en cuestión, resultando el individuo en la electroforesis como falso homocigota. En equinos en particular ha sido publicado el caso del microsatélite HMS7 (21) que presentó un alelo nulo en una filiación en caballos Cuarto de Milla. En el presente estudio analizando dicho marcador para el déficit de heterocigotas dio no significativo en los CA y significativo ($p = 0,047$) en los PPA (tabla 15). Lo que podría significar que en esta última raza presentara alelos nulos en dicho marcador. No existen reportes de alelos nulos en los demás sistemas moleculares empleados, los cuales pertenecen al set de marcadores recomendados por la ISAG para la identificación de equinos. Por lo que han sido testeados en numerosas razas sin presentar inconvenientes.

El caso del *inbreeding* podría ser un factor preponderante, el hecho que numerosos marcadores den significativos y altamente significativo en ambas razas lo estaría indicando. De todas maneras no podemos pasar por alto que solo dos de los sistemas bioquímicos hayan resultado en desequilibrio por exceso de homocigotos en Tf ($p = 0,013$) y en Es ($p = 0,043$) en los PPA, mientras que 5 de 8 sistemas de microsatélites analizados dieron exceso de homocigotas en la misma raza (HMS7, HTG6, HMS2, HTG4, ASB2). En los CA sucede lo mismo en los microsatélites (AHT4, HTG6, HMS2, HTG4, ASB2). Las razas analizadas poseen la característica de poseer registros abiertos lo que permite el cruzamiento de animales no inscriptos (base), de los cuales se desconoce su *pedigree*, por lo que podría darse el cruzamiento de animales emparentados. Por otro lado la característica selección por machos que se hace en la cría de razas de caballos en general, hace que ambos sexos no estén representados en el mismo número dando una deriva génica más pronunciada.

El efecto Wahlund's puede ser definido como efecto de subdivisión de la muestra dado por la existencia de sub-poblaciones que al analizarlas en conjunto hace aparecer un déficit general de heterocigotas con respecto a los esperados. Al provenir la muestra de diferentes sub-poblaciones se puede observar un déficit general de heterocigotas (tablas 14 y 15). Lo que podría ser explicado porque las distintas poblaciones de PPA y CA podrían presentar equilibrio de Hardy-Weinberg ya que se darían apareamientos al azar. Pero al analizarlas en conjunto no se encontrarían en equilibrio porque las frecuencias alélicas en cada una son distintas y el apareamiento al azar no se da en la población en conjunto (si en las sub-poblaciones). Obviamente, cuando todas las sub-poblaciones tienen las mismas frecuencias génicas no existe varianza entre ellas no hay efecto Wahlund y el valor de F_{ST} es igual a 0. En nuestro caso la subdivisión entre los CA y los PPA queda demostrada con los valores de F_{ST} que resultaron entre 6,5-15% que corresponden a valores de diferenciación génica moderada

(139) lo cual podría avalar el hecho de que al analizar las dos poblaciones en conjunto casi todos los marcadores resulten en desequilibrio con un exceso de homocigotas. Para analizar si la subdivisión también se producía dentro de las razas fue posible estudiar la muestra de los CA, ya que provenía de dos establecimientos. Se calculó el índice F_{ST} para los marcadores moleculares dividiendo la población de los CA en las muestras que correspondían a los dos establecimientos muestreados (Chascomús y Coronel Vidal) resultando en un valor de 2,5% no significativo ($p < 0,055$). Que según Wrigth (139) los valores por debajo de 5% resultan insignificantes como indicadores de subdivisión. En cuanto al mismo análisis por loci los valores variaron entre 1-5% (todos n.s.), resultando el valor mayor en el locus HTG 6. En los PPA no fue posible realizar este análisis porque la muestra se tomó durante un concurso de la raza en donde había animales de distintos orígenes, no siendo posible discriminar grupos numerosos (los animales presentados por el mismo establecimiento eran de 1 a 4 como máximo). A pesar de no haberse demostrado a nivel intra racial la subdivisión, no es un factor a descartar. Ya citamos el hecho que en ambas razas co-existen animales de distintas categorías (Preparatorios y definitivos), lo que daría un acervo génico variable de acuerdo a la categoría de animal que se trate, además de la estructura de apareamientos que en el caso de los animales analizados en general cada criador contaba con un padrillo (a lo sumo 3) y un lote de hembras para cruzar con él.

Por último, la limitante de la técnica de la tinción con nitrato de plata ya citada hizo que surgiera una nueva metodología para la detección de los polimorfismos moleculares: el uso de los secuenciadores automáticos. Un lector láser detecta el amplificado porque el cebador (*primer*), está marcado con fluorocromos. Los resultados se analizan con un *software* especial que asigna peso molecular (incluso los alelos) por la fluorescencia emitida por cada amplificado. Dicha tecnología no estaba disponible en el momento de realización de esta tesis.

Por último en los antecedentes que existen de razas equinas autóctonas estudiadas por marcadores genéticos (68 y 133) ambas autoras encontraron desequilibrios en varios marcadores analizados.

V.1.1) Contraste De Las Metodologías Utilizadas

Las diferencias en los dos tipos de análisis (polimorfismos bioquímicos y microsatélites) en cuanto al cálculo del equilibrio se podrían explicar por los niveles de observación. En el primero de los casos se trata de genes estructurales. La tasa de mutación

establecida en bacterias, que se cree es muy similar al índice de mutación por locus por generación de los eucariotas, que inactiva la función de un gen se calcula en el orden 10^{-5} a 10^{-6} (75). Porque en este caso se trata de proteínas que deben cumplir una función. Por otra parte los microsatélites son secuencias de nucleótidos en tándem que no se transcriben ni traducen, por lo que los cambios a este nivel pueden ser mayores (del orden de 10^{-4}). Es por ello que se considera una inevitable limitación en los polimorfismos bioquímicos de detectar variación a nivel de la secuencia nucleotídica si esta no altera la secuencia de aminoácidos correspondientes. Se habla en este caso de polimorfismo silente. Por lo tanto el polimorfismo puede ser sub-estimado en los polimorfismos bioquímicos ya que la electroforesis convencional puede no detectar incluso reemplazos de aminoácidos (56).

La tendencia a la homocigosis resultante del análisis de los microsatélites podría estar indicando una tendencia que todavía no es puesta de manifiesto por los marcadores estructurales (polimorfismos bioquímicos), por las limitantes citadas.

Por último, debemos señalar que dado que se trata de poblaciones autóctonas de equinos de Argentina en el caso de los microsatélites puede que existan problemas de amplificación de los loci dados por sitios polimórficos en la zona de unión de los cebadores, amplificación preferencial de determinados alelos en detrimento de otro con la consecuente aparición de una sola banda en un individuo heterocigoto y por otro lado, el ya citado caso de los alelos nulos descritos en el sistema HMS7. Para dilucidar esto habría que secuenciar las zonas de unión al cebador aledaños al microsatélite en una serie de individuos tipificados como homocigotas. Estos análisis escapan a los objetivos del presente estudio.

VI) PARAMETROS PARA PRUEBAS DE IDENTIDAD Y FILIACION EN LOS PPA Y EN LOS CA.

VI.1) Análisis De Parentesco

El análisis de los datos de los poder de exclusión (PE), indican la clara ventaja de los sistemas de microsatélites (44-67%) sobre los sistemas proteicos(8-48%) en cuanto al poder discriminador (tabla 19). Todos ellos resultaron muy informativos en ambas razas a diferencia de los sistemas proteicos que, por ejemplo, en el sistema Xk (8%) en los CA y en los Paso Peruano Argentino (11%) resultaron poco informativos.

En los **PPA** los sistemas con mayor poder discriminador resultaron HMS6, HTG6 y AHT5 en los microsatélites, dentro de los polimorfismos bioquímicos Tf y Es, pero ambas en

mucho menor valor que los microsatélites. En tanto en los **CA** en los sistemas microsatélites AHT5, HMS2, ASB2, HTG6 en ese orden. Mientras que en los polimorfismos bioquímicos solo Tf presentó un valor cercano al 50%.

En los PPA y los CA los ocho sistemas de microsatelites presentaron en conjunto un valor de doble exclusión (Q doble) cercano al 99%, muy semejante cuando se consideran también los cuatro polimorfismos bioquímicos se llega a 99,6%, por lo que el set de marcadores analizados son adecuados para establecer filiaciones en las razas analizadas.

Los valores de PE de los marcadores microsatélites en forma individual fueron comparados con los obtenidos por diversos autores en diversas razas y publicados en la página de internet del INRA (www.jouy.inra.fr). En general resultaron ambas razas con valores similares en el sistema HMS7 y HTG4. Mientras que en los sistemas HMS2, HMS6 y AHT4 las PE resultaron mayores que las razas allí reportadas. Solo en ASB2 las razas analizadas en el presente estudio resultaron con valores intermedios (caballos árabes PE = 0,376 y los SPC australianos PE = 0,716).

En datos publicados para caballos Criollos Brasileños (134) para polimorfismos bioquímicos los valores de PE fueron similares a los datos obtenidos para PPA y CA.

VI.2) Filogenia Con Individuos Como Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

La cantidad de información generada por marcadores hipervariables como los microsatélites hizo posible determinar relaciones a nivel individual. Los microsatélites poseen numerosos alelos por lo que cada individuo puede ser definido inequívocamente.

En el presente estudio el 87,5% de los PPA se agruparon en una misma rama principal, en la cual también se ubicaron 15% de los CA. En tanto los CA se agruparon en dos ramas principales: en la mayor un 65% de los CA se agruparon junto con el 10% de individuos PPA, en la segunda solo el 20% de los CA se agruparon con 2,5% de los PPA (solo 1 individuo).

Al considerar a los individuos como último taxón se reemplaza las frecuencias alélicas por los genotipos presentes en los loci analizados para cada individuo. Considerando que aquellos ejemplares que poseen genotipos más similares provendrían de la misma población es posible evaluar la forma en que se agrupan en los *clusters* de los árboles. El resultante árbol filogenético exhibe *clusters* de individuos que pertenecen a diferentes sub-especies, poblaciones o incluso familias.

En el árbol obtenido en el presente estudio (Figura 16), se observa una clara diferenciación de agrupamiento entre las dos razas estudiadas. Con unos pocos individuos que se agrupan incorrectamente. Dichos individuos no poseen un claro perfil genético de su raza. Los PPA y los CA al poseer registros abiertos dejan margen para que individuos sin una genealogía definida sean inscriptos, con la consecuente aparición de estos individuos sin una identidad genética plena con la raza a la que pertenecen.

VI.3) Asignación De Raza

Los perfiles bien diferenciales entre las razas estudiadas permiten clasificar correctamente a aquellos animales que presentan los alelos mayoritarios para la raza en los distintos sistemas (45-57,5%). Mientras que aquellos que presentan alelos de mediana a baja frecuencia quedan sin clasificar (45-37,5 %). Mientras que aquellos que presentaban alelos de muy baja frecuencia para la raza fueron asignados incorrectamente (menos del 8%).

La cuestión de asignar un individuo a una población ha sido utilizado en numerosos estudios tales como clasificación individual de peces, abejas, evaluación de diferenciación en poblaciones de osos polares o detectar recientes corrientes migratorias en humanos (32). Tiene un potencial de utilización para estudios forenses, de conservación y de manejo de recursos. La distancia de cada individuo es tomada como un promedio de las distancias que toman todos los individuos que forman la población analizada. Por la cual se le asigna a cada individuo una probabilidad de que él pertenezca a la población en cuestión. En algunas situaciones es más importante excluir a una determinada población que designar a la que más se ajusta.

En los caballos en particular los criadores en muchas ocasiones adquieren animales identificados solamente por alguna marca a fuego o incluso sin ella y deben confiar en la filiación dada por el vendedor. También cuando aparecen animales que no responden al biotipo de la raza surge la inquietud de ver si existe algún método científico para identificar la raza de los animales. La asignación respondería dicha inquietud. Con el fin de elevar los niveles de asignación habría que analizar un set mayor de STR's y elegir aquellos sistemas que presentan alelos predominantes distintos en ambas razas.

CONCLUSIONES

- Los sistemas analizados resultaron polimórficos en ambas razas. Siendo posible establecer un perfil genético de cada una de ellas.
- Los valores de heterocigosidad y número de alelos esperados en ambas razas para los sistemas de polimorfismos bioquímicos y microsatélites fueron similares a datos publicados en razas equinas autóctonas lo que indica que no hay pérdida de la variabilidad genética en las razas analizadas.
- Las distancias genéticas establecen que las razas se diferencian entre sí y que presentan mayor relación con razas americanas. En el caso de los PPA además con los ponies españoles (AS) y los berberiscos (BE). Ambas razas se diferencian claramente del PRE avalando la postura que dicha raza no es el tipo de caballo introducido por los conquistadores en América.
- Al mostrar diferencias significativas el valor de F_{ST} y por el análisis de heterogeneidad se pueden considerar como dos razas filogenéticamente cercanos pero con rasgos genéticos distintivos.
- Las razas PPA y CA presentan un exceso de homocigotas que se ponen más aún de manifiesto cuando se analizan las poblaciones en conjunto, las posibles explicaciones a este fenómeno serían la deriva génica, el *inbreeding* y las limitaciones de la técnica empleada.
- Los poderes de exclusión de los sistemas de microsatélites resultaron más eficaces que los polimorfismos bioquímicos. Por lo que en nuestro medio los microsatélites se indican como la técnica más viable para la identificación y filiación de equinos.
- Los individuos considerados como OTUS permitieron agruparlos en general (87,5%) en las razas a las que pertenecen.
- En la asignación de raza menos de la mitad (45%) fueron asignados correctamente en los PPA y más de la mitad (57,5%) en los CA. Menos del 8% en ambas razas quedaron sin

asignar. Para elevar los niveles de asignación habría que analizar un *set* mayor de STR's y elegir aquellos sistemas que presentan alelos predominantes distintos en ambas razas. Es potencial su uso para asignar un animal a la raza a la que pertenece o descartar que pueda ser incluido en la misma.

TABLAS Y FIGURAS

TABLA N°1 .Número de animales analizados por locus en los polimorfismos bioquímicos en cada población , estimación del número observado de alelos y número efectivo de alelos.

PPA			
Loci	n	na	ne
Al	76	2	1,845
Xk	80	2	1,374
Es	74	3	2,935
Tf	72	6	3,88
Media	76	3,25	2,51
DE		1,89	1,12
CA			
Loci	n	na	ne
Al	80	2	1,724
Xk	80	2	1,249
Es	80	2	1,535
Tf	80	6	3,336
Media	80	3	1,961
DE		2	0,937

n: número de animales tipificados; *na*: número de alelos observados; *ne*: número efectivo de alelos (Kimura y Crow,1964). *DE.*: desvío estándar.

TABLA N°2. Valores de F_{iski} en cada loci en cada población y su significancia.

PPA		F_{iski}	P	CA		F_{iski}	P
AL	A	0,037	n.s.	AL	A	-0,059	n.s.
	B	0,037	n.s.		B	-0,059	n.s.
Xk	K	-0,182	n.s.	Xk	K	-0,114	n.s.
	S	-0,182	n.s.		S	-0,1143	n.s.
Es	F	0,163	n.s.	Es	F	0,152	n.s.
	I	0,327	0,01>p>0,001		I	0,152	n.s.
	S	0,107	n.s.		S	-	
Tf	D	0,375	n.s.	Tf	D	0,024	n.s.
	F1	0,236	<0,001		F2	0,092	n.s.
	F2	0,18	0,01>p>0,001		F3	0,483	<0,001
	H	0,167	n.s.		H	-0,114	n.s.
	O	0,014	n.s.		O	-0,068	n.s.
	R	0,028	n.s.	R	-0,013	n.s.	

P: probabilidad; n.s.: no significativo.

TABLA N°3. Frecuencias génicas en polimorfismos bioquímicos en los caballos PPA (Paso Peruano Argentino) y en los CA (Criollo Argentino).

PPA			CA		
Al	A	0,3553	Al	A	0,7
	B	0,6447		B	0,3
Xk	K	0,8375	Xk	K	0,8875
	S	0,1625		S	0,1125
Es	F	0,3919	Es	F	0,225
	I	0,2703		I	0,775

PPA			CA		
Tf	S	0,3378	Tf	S	0
	D	0,375		D	0,3125
	F1	0,236		F1	0
	F2	0,1806		F2	0,425
	F3	0		F3	0,05
	H	0,1667		H	0,1125
	O	0,0139		O	0,075
	R	0,0278		R	0,025

TABLA N°4. Equilibrio de Hardy-Weinberg por el método del chi cuadrado (X_2), para los marcadores bioquímicos en ambas razas.

Loci	PPA		CA		PPA + CA	
	X_2	P	X_2	P	X_2	P
Alb	0,05	n.s.	0,14	n.s.	0,86	n.s.
Xk	1,37	n.s.	0,56	n.s.	1,93	n.s.
Es	4,36	n.s.	0,95	n.s.	17,72	***

X_2 : Prueba del chi cuadrado; P: probabilidad; n.s.: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

TABLA N°5. Equilibrio de Hardy-Weinberg por el test de probabilidad (Genepop 3.1 Rousset y Raymond, 19) para marcadores bioquímicos.

PPA			
Loci	P	E.S.	Fis (Weir & Cockerham,)
Al	1	n.c.	0,037
Xk	0,564	n.c.	-0,182
Es	0,246	n.c.	0,193
Tf	0,0217	0,0025	0,265
$X_2 = 11,6$ g. de lib. = 8 p = 0,169			
CA			
Loci	P	E.S.	Fis (Weir & Cockerham,)
Al	1	n.c.	-0,059
Xk	1	n.c.	-0,114
Es	0,373	n.c.	0,152
Tf	0,052	0,0064	0,049
$X_2 = 7,9$ g. de lib. = 8 p = 0,448			

P: probabilidad, X_2 : prueba del chi cuadrado; ES: error estándar; G de lib.: grados de libertad.

TABLA N°6: Equilibrio de Hardy-Weinberg por el test exacto con H_1 = Déficit de heterocigotas para marcadores bioquímicos.

PPA			
Loci	F_{is} (Weir & Cockerham,)	P	E.S.
Al	0,037	0,546	n.c.
Xk	-0,182	1	n.c.
Es	0,193	0,043	n.c.
Tf	0,265	0,013	0,0022
CA			
Loci	F_{is} (Weir & Cockerham,)	P	E.S.
Al	-0,059	1	n.c.
Xk	-0,114	1	n.c.
Es	0,152	0,373	n.c.
Tf	0,049	0,052	0,0064

P:probabilidad; ES: error estándar

TABLA N°7. Equilibrio de Hardy-Weinberg por el test exacto con H_1 = Exceso de heterocigotas para marcadores bioquímicos.

PPA			
Loci	F_{is} (Weir & Cockerham,)	Prob.	E.S.
Al	0,037	0,722	n.c.
Xk	-0,182	0,312	n.c.
Es	0,193	0,96	n.c.
Tf	0,265	0,99	0,0017
CA			
Loci	F_{is} (Weir & Cockerham,)	Prob.	E.S.
Al	-0,059	0,228	n.c.
Xk	-0,114	0,603	n.c.
Es	0,152	0,92	n.c.
Tf	0,049	0,86	0,0073

P: probabilidad, X_2 : prueba del chi cuadrado; ES: error estándar.

TABLA N°8. Indices de fijación para los marcadores bioquímicos para ambas poblaciones en conjunto. (Wright, 1943,1951,1965,1969).

Loci	F_{is}	F_{st}	F_{it}	Nm
Al	-0,0102 n.s.	0,2031	0,195	0,98
Xk	-0,1532 n.s.	0,0001	-0,153	2500
Es	0,1782 n.s.	0,2738	0,403	0,66
Tf	0,1543 n.s.	0,0678	0,222	3,43
Todos	0,0844 n.s.	0,1567	0,2279	0,75

n.s. no significativo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Nm: deriva génica estimada a partir de F_{st} ($Nm = 0,25(1 - F_{st}) / F_{st}$).

TABLA N°9. Índices de fijación F_{stk1} como distancia genética (Mac Hugh, 1996).

Locus	Alelos	Razas		F_{stk1}	P
		PPA	CA		
Alb	A	0,3553	0,7	0,2384	***
	B	0,6447	0,3	0,2384	***
	Total		0,2031	0,2031	***
Xk	K	0,837	0,887	0,0105	ns
	S	0,162	0,112	0,0106	ns
	Total		-0,0001	-0,0001	ns
Es	F	0,392	0,225	0,0654	***
	I	0,27	0,775	0,5111	***
	S	0,338	0	0,4067	***
	Total		0,2738	0,2738	***
Tf	D	0,375	0,313	0,0085	*
	F1	0,236	0	0,2676	***
	F2	0,181	0,425	0,1410	***
	F3	0	0,05	0,0513	***
	H	0,167	0,112	0,0126	**
	O	0,014	0,075	0,0438	***
	R	0,028	0,025	0,0002	ns
	Total		0,0678	0,0678	***
TOTAL		0,1567	0,1567	***	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

TABLA N°10. Heterocigidad por sistema en cada raza en polimorfismos bioquímicos. Varianza de la heterocigidad promedio y de las heterocigidades por loci

LOCI	PPA			CA			PPA+CA	
	ho	he	Var.	ho	He	Var.	ho	he
Al	0,4474	0,4642	0,0016	0,45	0,4253	0,0016	0,4487	0,5012
Xk	0,325	0,2756	0,0013	0,225	0,2022	0,0011	0,275	0,2387
Es	0,5405	0,6683	0,0006	0,3	0,3532	0,0014	0,4156	0,6009
Tf	0,5556	0,7527	0,0006	0,675	0,7092	0,0008	0,6184	0,7572
Media	0,4671	0,5402	0,0008	0,4125	0,4225	0,0007	0,4394	0,5245
DE	0,1061	0,214	0,0285	0,1984	0,2125	0,0271	0,1411	0,2177

HO: heterocigidad observada, he: heterocigidad esperada, Var.: varianza; DE: desvío estándar.

TABLA N°11. Test exacto para diferenciar poblaciones en marcadores bioquímicos.

Loci	P	ES
Al	0,00005	0,00005
Xk	0,492	0,00389
Es	0	0
Tf	0	0
	$X_2=\infty$	
	G.de lib.=8	
Loci	P	ES
	P=***	

H_0 = la distribución alélica es idéntica entre las poblaciones.

Loci	P	ES
Al	0,0003	0,0002
Xk	0,4494	0,004
Es	0	0
Tf	0	0
	$X_2=\infty$	
	G.de lib.=8	
	P=***	

H_0 =la distribución genotípica es igual entre las poblaciones

P:probabilidad, X_2 : prueba del chi cuadrado; ES: error estándar; G de lib.: grados de libertad; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

TABLA N°12. Número de individuos analizados por marcador y número de alelos en los sistemas de microsatélites.

PPA				
Loci	n	na	ne	l
HMS6	74	6	5,18	1,71
HMS7	72	6	3,39	1,49
AHT4	80	9	4,44	1,67
HTG6	76	9	5,11	1,81
HMS2	68	8	4,5	1,71
AHT5	70	6	4,94	1,69
HTG4	72	6	3,26	1,38
ASB2	74	7	4,79	1,67
Total		57		
Media	73	7,12	4,45	1,64
DE		1,35	0,74	0,13
CA				
Loci	n	na	ne	l
HMS6	78	9	4,07	1,67
HMS7	80	5	3,5	1,36
AHT4	80	9	4,64	1,86
HTG6	76	7	5,1	1,74
HMS2	74	8	5,34	1,81
AHT5	68	10	5,89	1,95

CA				
Loci	n	na	ne	I
HTG4	80	6	3,2	1,35
ASB2	62	8	4,95	1,77
Total		62		
Media	75	7,75	4,59	1,69
DE		1,66	0,92	0,22

Na: número de alelos observados; ne: número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964). DE: desvío estándar.

TABLA N°13. Índices F_{iski} (índice de fijación correspondiente a cada alelo en cada raza) para marcadores moleculares.

HMS6		PPA		CA	
Alelos	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
157(J)			0	n.s.	
159(K)	0,325	0,01>p>0,001	-0,013	n.s.	
161(L)	0,128	n.s.	0,482	<0,001	
163(M)	-0,075	n.s.	0,039	n.s.	
165(N)	0,172	n.s.	-0,088	n.s.	
167(O)	-0,073	n.s.	0,482	<0,001	
169(P)	0,093	n.s.	-0,004	n.s.	
171(Q)			-0,057	n.s.	
173(R)			0	n.s.	
HMS7		PPA		CA	
Alelos	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
173(J)	0,057	n.s.			
175(K)	0,362	0,01>p>0,001	-0,013	n.s.	
177(L)	0,323	0,01>p>0,001	0,136	n.s.	
179(M)	0,288	0,02>p>0,01	-0,123	n.s.	
181(N)	-0,088	n.s.	0,186	n.s.	
183(O)	-0,0423	n.s.	-0,162	n.s.	
AHT4		PPA		CA	
Alelos	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
148(H)	0,06	n.s.	0,048	n.s.	
150(I)	0	n.s.	0,79	<0,001	
152(J)	0,11	n.s.	0,113	n.s.	
154(K)	0	n.s.	-0,094	n.s.	
156(L)	-0,054	n.s.	-0,0294	n.s.	
158(M)	0	n.s.	0,3675	0,01<p<0,001	
160(N)	-0,114	n.s.	0,481	<0,001	
162(O)	0,097	n.s.	-0,06	n.s.	
164(P)	0	n.s.			

HTG6		PPA		CA	
Alelos	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
84(G)	0,365	0,01>p>0,001	0,316	0,01<p<0,001	
86(H)	-0,013	n.s.			
88(I)	0,177	n.s.	0,487	<0,001	
90(J)	0,382	0,01>p>0,001	0,448	<0,001	
92(K)	-0,013	n.s.			
94(L)	0	n.s.	0	n.s.	
96(M)	-0,013	n.s.	0,286	0,02<p<0,01	
98(N)	0,29	0,02>p>0,01	0,918	<0,001	
100(O)	0,323	0,01>p>0,001	-0,147	n.s.	
HMS2					
Alelos		PPA		CA	
	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
238(J)	0,159	n.s.	0,286	0,02<p<0,01	
240(K)	0,682	<0,001	0,422	<0,001	
242(L)	1	<0,001	0,422	<0,001	
Alelos		PPA		CA	
	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
244(M)	0,66	<0,001	0,17	n.s.	
246(N)	0,318	0,01<p<0,001	0,044	n.s.	
248(O)	-0,015	n.s.	-0,044	n.s.	
250(P)			0		
254(R)	0	n.s.	0	n.s.	
256(S)	0,118	n.s.	-0,029	n.s.	
AHT5					
Alelos		PPA		CA	
	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
132(J)			0,159	n.s.	
134(K)	0,299	0,02<p<0,01	-0,043	n.s.	
136(L)	-0,115	n.s.	-0,031	n.s.	
138(M)	-0,172	n.s.	0,003	n.s.	
140(N)	0,081	n.s.	-0,1	n.s.	
142(O)	-0,086	n.s.	-0,1	n.s.	
144(P)	0,481	<0,001	0,365	0,01<p<0,001	
HTG4					
Alelos		PPA		CA	
	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
129(K)	-0,111	n.s.	0	n.s.	
131(L)	-0,207	>0,05	0,297	0,01>p>0,001	
133(M)	-0,101	n.s.	0,661	<0,001	
135(N)	0,127	n.s.	0,397	<0,001	
137(O)	1	<0,001	-0,026	n.s.	
139(P)	0	n.s.	-0,04	n.s.	
ASB2					
Alelos		PPA		CA	
	F_{iski}	P	F_{iski}	P	
238(J)			1	<0,001	
240(K)	0,62	<0,001	0	n.s.	
242(L)	-0,014	n.s.	-0,088	n.s.	

ASB2	PPA	CA		
Alelos	F _{iski}	P	F _{iski}	P
244(M)	0,655	<0,001	0,363	0,01>p>0,001
246(N)	0,569	<0,001	-0,025	n.s.
248(O)	0,645	<0,001	0,547	<0,001
250(P)	0,053	n.s.	-0,148	n.s.
254(R)	0		-0,05	n.s.
256(S)			1	P<0,001

Nota: los alelos se expresan primero en pares de base y entre paréntesis de acuerdo con la nomenclatura de la ISAG.

TABLA N°14. Equilibrio de Hardy- Weinberg por el test de probabilidad. Por el método Fisher.

Poblaciones	Loci	Fis	Prob.	E.S	X ₂	G de lib	Prob
PPA	HMS6	0,109	0,141	0,006	6,9	4	n.s.
CA		0,06	0,221	0,021			
PPA	HMS7	0,209	0,003	0,001	13	4	*
CA		-0,036	0,456	0,01			
PPA	AHT4	0,045	0,333	0,022	8,5	4	n.s.
CA		0,162	0,043	0,007			
PPA	HTG6	0,281	0,001	0,001	∞	4	***
CA		0,425	0	0			
PPA	HMS2	0,37	0	0	∞	4	***
CA		0,226	0	0			
PPA	AHT5	0,039	0	0	∞	4	***
CA		0,026	0,907	0,01			
PPA	HTG4	-0,028	0,004	0,002	23,7	4	***
CA		0,363	0,002	0,001			
PPA	ASB2	0,495	0	0	∞	4	***
CA		0,205	0	0			

*P: probabilidad; X₂: prueba del chi cuadrado; ES: error estándar; G de lib.: grados de libertad; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

Tabla n°15. Equilibrio de Hardy- Weinberg por el test exacto con H₁ = Déficit de heterocigotas para marcadores moleculares.

Loci	PPA		CA			
	Fis	Prob	E.S	Fis	Prob.	E.S.
HMS6	0,109	0,099	0,006	0,06	0,341	0,007
HMS7	0,209	0,047	0,004	-0,036	0,348	0,012
AHT4	0,045	0,422	0,026	0,162	0,022	0,001
HTG6	0,281	0,008	0,003	0,425	0	0
HMS2	0,37	0	0	0,226	0,014	0,003
AHT5	0,039	0,114	0,006	0,026	0,302	0,026
HTG4	-0,028	0,017	0,003	0,363	0,007	0,002
ASB2	0,495	0	0	0,205	0	0

Tabla nº16. Equilibrio de Hardy-Weinberg por el test exacto con $H_1 =$ Exceso de heterocigotas para marcadores moleculares.

Loci	PPA		CA			
	Fis	Prob	E.S	Fis	Prob.	E.S.
HMS6	0,109	0,897	0,006	0,06	0,965	0,007
HMS7	0,209	0,959	0,004	-0,036	0,666	0,01
AHT4	0,045	0,622	0,027	0,162	0,999	0,001
HTG6	0,281	0,993	0,002	0,425	1	0
HMS2	0,37	1	0	0,226	0,994	0,002
AHT5	0,039	0,885	0,006	0,026	0,711	0,022
HTG4	-0,028	0,982	0,003	0,363	0,988	0,003
ASB2	0,495	1	0	0,205	1	0

TABLA Nº 17 . Indices de fijación para los microsatélites.

Valores de F_{is} (Genepop 3.1)				
Loci	PPA		CA	
	F_{is}	P	F_{is}	P
HMS6	0,109	n.s.	0,0598	n.s.
HMS7	0,2089	n.s.	-0,0363	n.s.
AHT4	0,0449	n.s.	0,1623	n.s.
HTG6	0,2807	0,025>p>0,01	0,4251	<0,01
HMS2	0,3704	<0,01	0,2263	n.s.
AHT5	0,0387	n.s.	0,0263	n.s.
HTG4	-0,0277	n.s.	0,3633	<0,01
ASB2	0,4953	<0,01	0,2046	n.s.
Total		0,1878	0,02>p>0,01	

P: probabilidad; n.s.: no significativo.

TABLA Nº18. Indices de fijación para los microsatélites analizados en PPA Y CA en conjunto.

Loci	F_{st}	F_{is}	F_{it}	Nm
HMS6	0,0731***	0,085	0,1493	3,1699
HMS7	0,1795***	0,083	0,2446**	1,1427
AHT4	0,0724***	0,099	0,1695*	3,2030
HTG6	0,0295*	0,35***	0,3639***	8,2245
HMS2	0,0293*	0,29***	0,311***	8,2824
AHT5	0,0363**	0,032	0,0745	6,6371
HTG4	0,0304*	0,17**	0,2022*	7,9736
ASB2	0,059**	0,35***	0,3992***	3,9872
Total	0,06497***	0,1878**	0,2408**	3,5979

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 . Nm: deriva génica estimada a partir de F_{st} ($Nm = 0,25(1 - F_{st}) / F_{st}$).

TABLA N°19. Probabilidad de exclusión para cada sistema y en ambas razas.

Q simple						Total	
Loci	PPA	CA	Loci	PPA	CA	PPA	CA
HMS6	0,6167	0,5339	Al	0,1765	0,1659		
HMS7	0,5111	0,4672	Xk	0,1176	0,0897		
AHT4	0,5684	0,5666	Es	0,3644	0,144		
HTG6	0,6251	0,6189	Tf	0,4859	0,4623		
HMS2	0,5832	0,6306					
AHT5	0,5937	0,6715					
HTG4	0,4619	0,4471					
ASB2	0,5837	0,6324					
Q simple total	0,9988	0,9989		0,7626	0,6505	0,9997	0,9996
Q doble	0,9865	0,9876		0,3195	0,1873	0,9964	0,9952

TABLA N°20. Heterocigocidad por sistema en cada raza en los sistemas de microsatélites
Varianza de la heterocigocidad promedio y de las heterocigocidades por loci

LOCI	PPA			CA			PPA+CA	
	Ho	he	Var.	ho	he	Var.	ho	he
HMS6	0,7297	0,8182	0,0004	0,6923	0,7646	0,0007	0,7105	0,8179
HMS7	0,6111	0,7152	0,0008	0,75	0,7241	0,0008	0,6842	0,7987
AHT4	0,75	0,7848	0,0005	0,6	0,7946	0,0007	0,675	0,818
HTG6	0,6053	0,8151	0,0004	0,5263	0,8147	0,0004	0,5658	0,8257
HMS2	0,5	0,7897	0,0005	0,6486	0,8241	0,0004	0,5775	0,8203
AHT5	0,7714	0,8095	0,0005	0,8235	0,8428	0,00001	0,7971	0,8425
HTG4	0,7222	0,7031	0,0008	0,45	0,6972	0,0009	0,5789	0,7122
ASB2	0,4054	0,8023	0,0005	0,6774	0,8112	0,0004	0,5294	0,8346
Media	0,6369	0,7797	0,0003	0,646	0,7842	0,0002	0,6398	0,8087
DE	0,1314	0,0452	0,0171	0,1197	0,0512	0,0167	0,0912	0,0411

HO: heterocigocidad observada, he: heterocigocidad esperada, Var.: varianza; DE: desvío estándar.

TABLA N°21. Índices de fijación F_{st1} como distancia genética en marcadores moleculares (Mac Hugh, 1996).

Loci	Alelo	PPA	CA	F_{st1}	P
HMS6	J	0	0,013	0,0131	***
	K	0,23	0,026	0,1864	***
	L	0,122	0,053	0,0298	***
	M	0,081	0,316	0,1735	***
	N	0,108	0,092	0,0014	ns
	O	0,203	0,053	0,1008	***
	P	0,257	0,368	0,0287	***
	Q	0	0,066	0,0682	***
	R	0	0,013	0,0131	***

Loci	Alelo	PPA	CA	F _{st1}	P
HMS7	J	0,145	0	0,1563	***
	K	0,171	0,025	0,1206	***
	L	0,461	0,112	0,2979	***
	M	0,079	0,363	0,2342	***
	N	0,092	0,162	0,0221	***
	O	0,053	0,338	0,2582	***
AHT4	H	0,3	0,153	0,0617	***
	I	0,013	0,069	0,0399	***
	J	0,188	0,444	0,1516	***
	K	0,013	0,097	0,0679	***
	L	0,063	0,042	0,0044	ns
	M	0,013	0,069	0,0399	***
	N	0,112	0,056	0,0204	***
	O	0,287	0,069	0,1624	***
	P	0,013	0	0,0131	***
HTG6	G	0,167	0,139	0,0031	ns
	H	0,026	0	0,0263	***
	I	0,103	0,306	0,1266	***
	J	0,205	0,111	0,0332	***
	K	0,026	0	0,0263	***
	L	0,013	0,014	0,0001	ns
	M	0,026	0,083	0,0315	***
	N	0,308	0,208	0,0261	***
	O	0,128	0,139	0,0005	ns
HMS2	J	0,191	0,083	0,0493	***
	K	0,162	0,208	0,0071	ns
	L	0,059	0,208	0,096	***
	M	0,044	0,111	0,0314	***
	N	0,368	0,278	0,0185	***
	O	0,029	0,056	0,0089	*
	P	0	0,014	0,0141	***
	Q	0	0		
	R	0,015	0,042	0,0132	***
S	0,132	0	0,1413	***	
AHT5	G	0	0,015	0,0151	***
	H	0	0,015	0,0151	***
	I	0	0,015	0,0151	***
	J	0	0,191	0,2112	***
	K	0,2	0,265	0,0118	***
	L	0,114	0,044	0,0337	****
	M	0,157	0,176	0,0013	ns
	N	0,143	0,103	0,0074	*
	O	0,329	0,103	0,1508	***
P	0,057	0,074	0,0024	ns	

Loci	Alelo	PPA	CA	F _{st1}	P
HTG4	J	0	0,013	0,0131	***
	K	0,111	0,3	0,1094	***
	L	0,181	0,175	0,0001	ns
	M	0,472	0,425	0,0045	ns
	N	0,194	0,038	0,1187	***
	O	0,028	0,05	0,0064	ns
	P	0,014	0	0,0141	***
ASB2	J	0	0,031	0,0315	***
	K	0,297	0,016	0,2991	***
	L	0,027	0,094	0,0395	***
	M	0,189	0,078	0,0532	***
	N	0,243	0,266	0,0014	ns
	O	0,081	0,281	0,1349	***
	P	0,149	0,141	0,0002	ns
	Q	0	0,063	0,0651	***
	R	0,014	0,031	0,0066	ns

*n.s.: no significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

TABLA N° 22. Valores de distancia genética estándar de Nei en polimorfismos bioquímicos.

RAZAS	PPA	CA	PRE	CH	PF	BE
Paso Peruano Argentino		0,0876	0,0539	0,1762	0,0675	0,035
Criollo Argentino	0,1108		0,0208	0,1184	0,0731	0,1058
Pura Raza Español	0,053	0,0258		0,07	0,0146	0,0275
Chilote	0,1649	0,1743	0,0824		0,037	0,1047
Paso Fino	0,0502	0,0909	0,0174	0,0661		0,0328
Berberisco	0,0263	0,0956	0,0341	0,1471	0,0271	

Valores de distancia genética DA de Nei en polimorfismos bioquímicos.

RAZAS	PPA	CA	PRE	CH	PF
Paso Peruano Argentino					
Criollo Argentino	0,0834				
Pura Raza Español	0,0925	0,0491			
Chilote	0,201	0,1435	0,0692		
Paso Fino	0,1237	0,0785	0,0285	0,0453	
Berberisco	0,0405	0,0435	0,047	0,147	0,068

TABLA N°23. Valores de distancia genética estándar de Nei entre siete razas analizadas en 3 microsatélites.

RAZAS	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC
Paso Peruano Argentino		0,2125	0,0129	0,3376	0,2162	0,2767
Criollo Argentino	0,4413		0,1848	0,5182	0,3001	0,3955
Cuarto de Milla	0,3559	0,2803		0,5946	0,1165	0,3452
Pura Raza Español	0,8255	0,8602	1,0363		0,4183	0,5232

RAZAS	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC
Asturcón	0,3844	0,6352	0,3515	1,3833		0,5123
Sangre Pura de Carrera	0,6596	0,4103	0,3178	0,8578	0,8004	
Zamorano	2,4944	1,4831	1,7745	1,2788	4,5688	1,9588

Valores de distancia genética DA de Nei entre siete razas analizadas en 3 microsatélites.

RAZAS	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC
Paso Peruano Argentino						
Criollo Argentino	0,1764					
Cuarto de Milla	0,1724	0,1734				
Pura Raza Español	0,4007	0,4356	0,4607			
Asturcón	0,2284	0,3139	0,2172	0,5479		
Sangre Pura de Carrera	0,3556	0,325	0,2418	0,386	0,4494	
Zamorano	0,8137	0,7284	0,7326	0,6975	0,923	0,8378

TABLA N°24. Valores de distancia genética estándar de Nei entre cinco razas analizadas en 6 microsatélites .

RAZAS	PPA	CA	PRE	AS	SPC
Paso Peruano Argentino		0,1179	0,1657	0,1245	0,2203
Criollo Argentino	0,2964		0,2501	0,1782	0,208
Pura Raza Español	0,555	0,5569		0,3098	0,2377
RAZAS	PPA	CA	PRE	AS	SPC
Asturcón	0,2977	0,4374	0,7665		0,2573
Sangre Pura de Carrera	0,6674	0,396	0,4574	0,5753	

Valores de distancia genética DA de Nei entre cinco razas analizadas en 6 microsatélites .

RAZAS	PPA	CA	PRE	AS
Paso Peruano Argentino				
Criollo Argentino	0,152			
Pura Raza Español	0,3063	0,3244		
Asturcón	0,1896	0,254	0,4012	
Sangre Pura de Carrera	0,3411	0,2822	0,3064	0,35

TABLA N°25. Frecuencias génicas en sistemas de microsatélites en razas equinas relacionadas con los CA y los PPA.

		RAZAS						
Sistema	Alelos	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA
HMS6	H	0	0	0	0	0	0	0,213
	I	0	0	0	0	0	0	0,37
	J	0	0,013	0	0,205	0	0	0,38
	K	0,23	0,026	0,053	0,2	0	0,083	0
	L	0,122	0,053	0,037	0,095	0,08	0,05	0
	M	0,081	0,316	0,363	0	0,09	0,4	0
	N	0,108	0,092	0,006	0,155	0,04	0	0,032

		RAZAS						
Sistema	Alelos	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA
	O	0,203	0,053	0,064	0,345	0,23	0,017	0,005
	P	0,257	0,368	0,473	0	0,56	0,45	0
	Q	0	0,066	0,003	0	0	0	0
	R	0	0,013	0	0	0	0	0
HMS7	I	0	0	0	0	0,1	0	0
	J	0,145	0	0,2	0,055	0,02	0,142	0
	K	0,171	0,025	0,004	0,01	0,32	0	0
	L	0,461	0,112	0,224	0,14	0,35	0,208	0
	M	0,079	0,363	0,119	0,105	0,05	0,133	0
	N	0,092	0,162	0,259	0,34	0,16	0,225	0,028
	O	0,053	0,338	0,167	0,35	0	0,292	0,417
	P	0	0	0,02	0	0	0	0,417
	Q	0	0	0,008	0	0	0	0,083
	R	0	0	0	0	0	0	0,032
	S	0	0	0	0	0	0	0,023
		PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA
AHT4	AA	0	0	0	0	n.r.	0	0,005
	A	0	0	0	0	n.r.	0	0,125
	B	0	0	0	0	n.r.	0	0,005
	D	0	0	0	0	n.r.	0	0,019
	E	0	0	0	0	n.r.	0	0,046
	H	0,3	0,153	0,208	0,275	n.r.	0,2	0,245
	I	0,013	0,069	0,01	0,015	n.r.	0	0,116
	J	0,188	0,444	0,38	0,41	n.r.	0,22	0,065
	K	0,013	0,097	0,107	0,095	n.r.	0,15	0,314
	L	0,063	0,042	0,009	0,005	n.r.	0	0,046
		RAZAS						
Sistema	Alelos	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA
	M	0,013	0,069	0,002	0,03	n.r.	0	0,014
	N	0,112	0,056	0,003	0,01	n.r.	0	0
	O	0,287	0,069	0,276	0,155	n.r.	0,43	0
	P	0,013	0	0,005	0,005	n.r.	0	0
		PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA
HTG6	C	0	0	0	0	0	0	0,042
	D	0	0	0	0	0	0	0,116
	E	0	0	0	0	0	0	0,319
	F	0	0	0	0	0	0	0,292
	G	0,167	0,139	0,327	0	0,01	0	0,185
	H	0,026	0	0	0	0	0	0
	I	0,103	0,306	0,004	0	0,03	0	0,005
	J	0,205	0,111	0,343	0,15	0,17	0,267	0,009
	K	0,026	0	0	0	0	0	0,032
	L	0,013	0,014	0	0,02	0	0,517	0
	M	0,026	0,083	0,022	0,405	0,02	0	0
	N	0,308	0,208	0,011	0	0	0	0
	O	0,126	0,139	0,265	0	0,67	0	0

	RAZAS								
Sistema	Alelos	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA	
	P	0	0	0,028	0,01	0,09	0,008	0	
	Q	0	0	0	0,015	0,01	0	0	
	R	0	0	0	0,38	0	0,175	0	
	S	0	0	0	0,02	0	0,033	0	
HTG4	J	0	0,013	n.r.	0	0	0	n.r.	
	K	0,111	0,3	n.r.	0,455	0,27	0,5	n.r.	
	L	0,181	0,175	n.r.	0,085	0,13	0,008	n.r.	
	M	0,472	0,425	n.r.	0,355	0,41	0,417	n.r.	
	N	0,194	0,037	n.r.	0,065	0,08	0,042	n.r.	
	O	0,028	0,05	n.r.	0,015	0	0	n.r.	
	P	0,014	0	n.r.	0,025	0,11	0,033	n.r.	
	Q	0	0	n.r.	0	0	0	n.r.	
HMS2		PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA	
	G	0	0	n.r.	0	0	0	0,014	
	H	0	0	n.r.	0	0	0	0,037	
	I	0	0	n.r.	0	0	0,033	0,227	
	J	0,191	0,083	n.r.	0,22	0	0	0,44	
	K	0,162	0,208	n.r.	0	0,14	0,117	0,204	
	L	0,059	0,208	n.r.	0,01	0,08	0,158	0,005	
	M	0,044	0,111	n.r.	0,39	0,2	0,692	0,06	
	N	0,368	0,278	n.r.	0,225	0,18	0	0,009	
	O	0,029	0,056	n.r.	0,085	0,03	0	0,005	
	P	0	0,014	n.r.	0	0,01	0	0	
	Q	0	0	n.r.	0	0,01	0	0	
	R	0,015	0,042	n.r.	0,07	0,1	0	0	
	S	0,132	0	n.r.	0	0,25	0	0	
		PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA	
ASB2	B	0	0	n.r.	0	0,04	0,05	n.r.	
	H	0	0	n.r.	0	0	0	n.r.	
	I	0	0	n.r.	0,19	0	0	n.r.	
		RAZAS							
Sistema	Alelos	PPA	CA	QH	PRE	AS	SPC	ZA	
	J	0	0,031	n.r.	0	0,13	0	n.r.	
	K	0,297	0,016	n.r.	0,135	0,24	0,142	n.r.	
	L	0,027	0,094	n.r.	0	0,02	0	n.r.	
	M	0,189	0,078	n.r.	0,275	0,25	0,133	n.r.	
	N	0,243	0,266	n.r.	0,175	0,1	0,175	n.r.	
	O	0,081	0,281	n.r.	0,015	0,22	0,117	n.r.	
	P	0,149	0,141	n.r.	0,01	0	0,025	n.r.	
	Q	0	0,063	n.r.	0,18	0	0,15	n.r.	
	R	0,014	0,03	n.r.	0,02	0	0,208	n.r.	

PPA: Paso Peruano Argentino; CA: Criollo Argentino; QH: Cuarto de Milla; PRE: Pura Raza Español; AS: asturcón; SPC: Sangre Pura de Carrera; ZA: Zamorano. n.r.: no reportado.

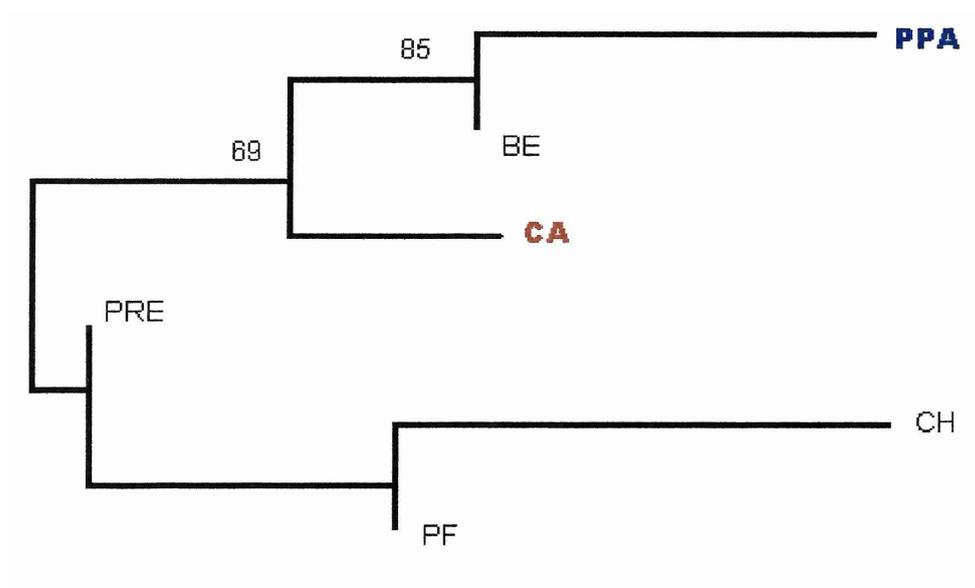


Figura n°13. Árbol filogenético obtenido a partir de la matriz de distancia D_a de los datos de los polimorfismos bioquímicos, (método del N-J). Los valores en los nodos indican los valores de *bootstrap* de 1000 repeticiones. Referencias: PPA: Paso Peruano Argentino; BE: Berberisco; CA: Criollo Argentino; PRE: Pura Raza Español; CH: Chilote; PF: Paso Fino

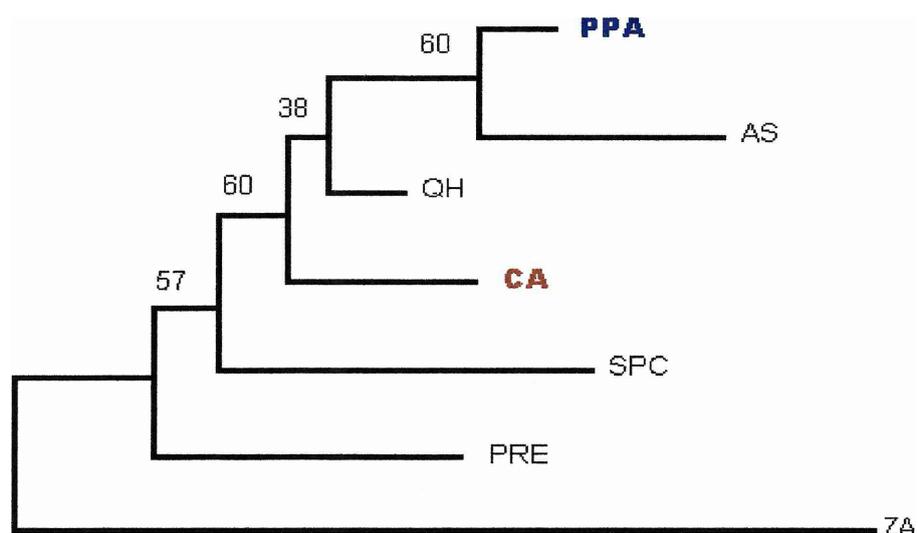


Figura n°14. Árbol filogenético obtenido a partir de la matriz de distancia D_a obtenido por el método del N-J con los datos de polimorfismos moleculares. Comparando siete razas en tres sistemas de microsatélites (HMS6, HMS7, HTG6). Los valores en los nodos indican los valores de *bootstrap* de 1000 repeticiones. Referencias: PPA: Paso Peruano Argentino; BE: Berberisco; QH; Cuarto de Milla; CA: Criollo Argentino; SPC: Sangre Pura de Carrera; PRE: Pura Raza Español; ZA: Asnos Zamoranos.

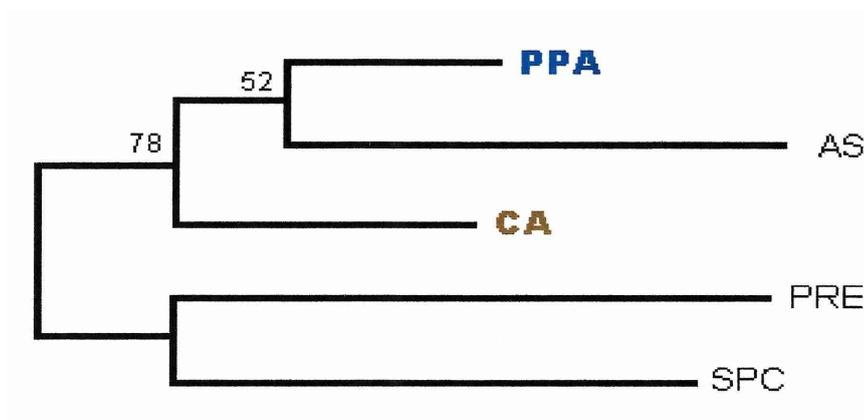


Figura n°15. Árbol filogenético obtenido a partir de la matriz de distancia Da obtenido por el método del N-J con los datos de polimorfismos moleculares. Comparando cinco razas en seis sistemas de microsatélites (HMS6,HMS7,HTG6,HMS2, HTG4 y ASB2). Los valores en los nodos indican los valores de *bootstrap* de 1000 repeticiones. Referencias: PPA: Paso Peruano Argentino; AS: Asturcones; CA: Criollo Argentino; PRE: Pura Raza Español; SPC: Sangre Pura de Carrera

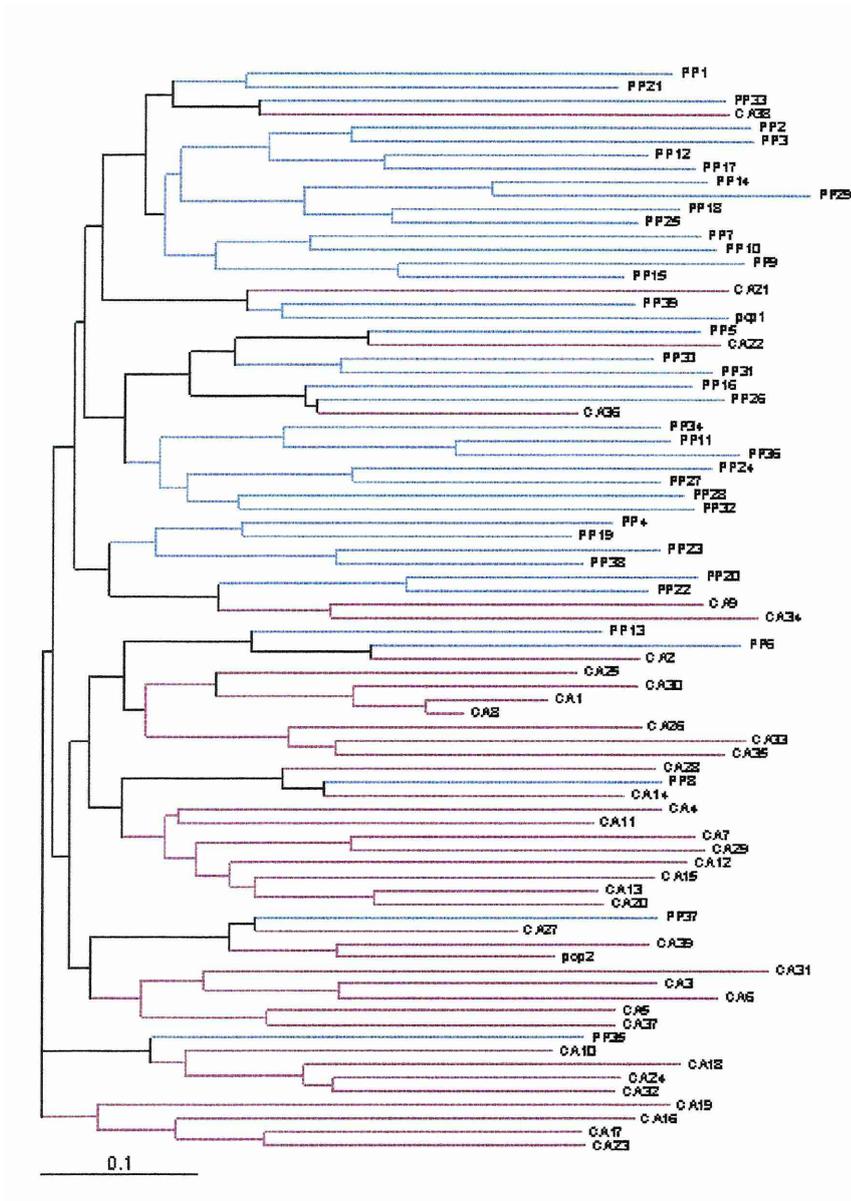


Figura n°16. Árbol filogenético obtenido a partir de la matriz de distancia DAS obtenido por el método del N-J con los datos de polimorfismos moleculares empleando a los individuos como unidades taxonómicas. Ref.: PPA: Paso Peruano Argentino; CA: Criollo Argentino.

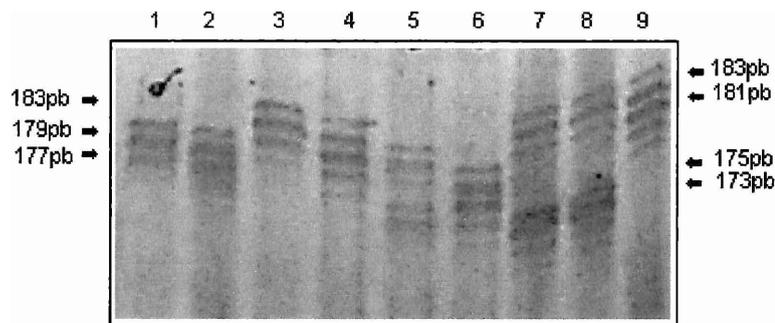


Figura nº17. Fotografía de un gel con el sistema HMS7. Ref.:Calles1:LM;2:LM; 3:0; 4:MN; 5:KN; 6:LM; 7:JO; 8:JO; 9:NO. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

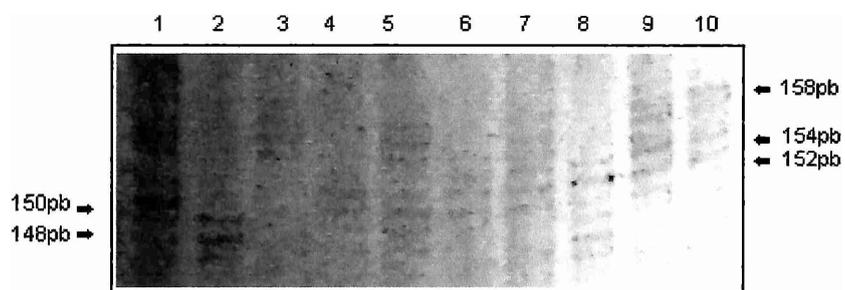


Figura nº18. Fotografía de un gel con el sistema AHT4. Ref.:Calles1:II;2:HH; 3:NN; 4:JM; 5:JM; 6:JJ; 7:JK; 8:KK; 9:KM; 10:KM. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

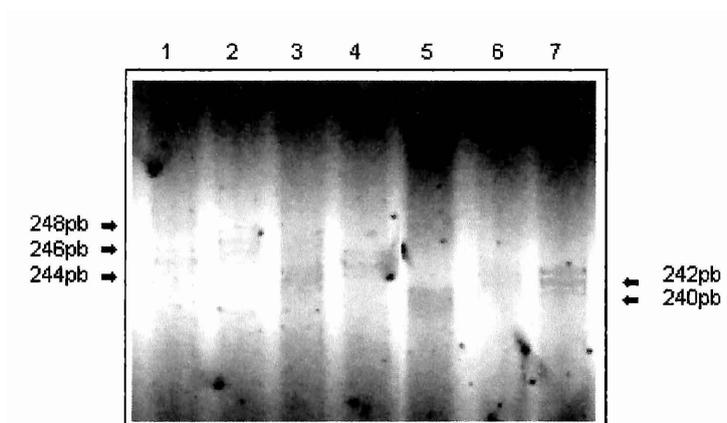


Figura n°19. Fotografía de un gel con el sistema ASB2. Ref.:Calles1:NN;2:OO; 3:MM; 4:NN; 5:KK; 6:LL; 7:LL. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

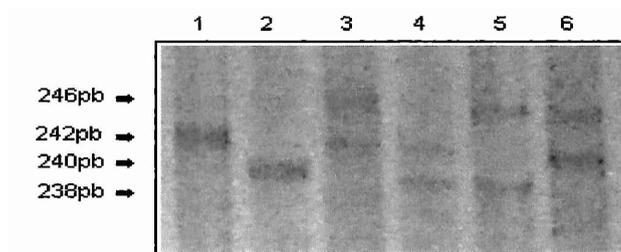


Figura n°20. Fotografía de un gel con el sistema HMS2. Ref.:1:LL; 2:KK; 3:NL; 4:LJ; 5:NJ; 6:NL. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

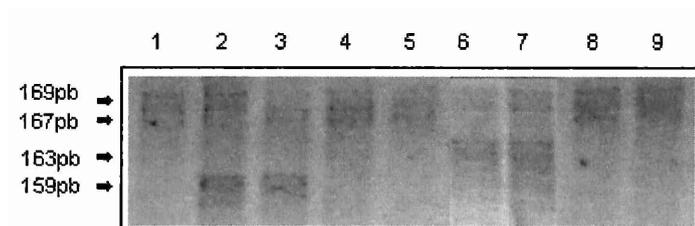


Figura n°21. Fotografía de un gel con el sistema HMS6. Ref: Calles 1: PP; 2: KP; 3:KO; 4:OO; 5:OO; 6:MP; 7:MP; 8:OP; 9:OP. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

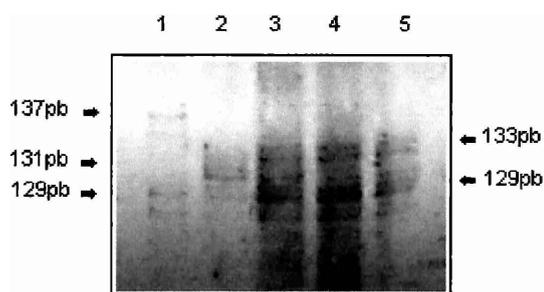


Figura n°22. Fotografía de un gel con el sistema HTG4. Ref::1:KO; 2:KL; 3:KM; 4:KM; 5:KM. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

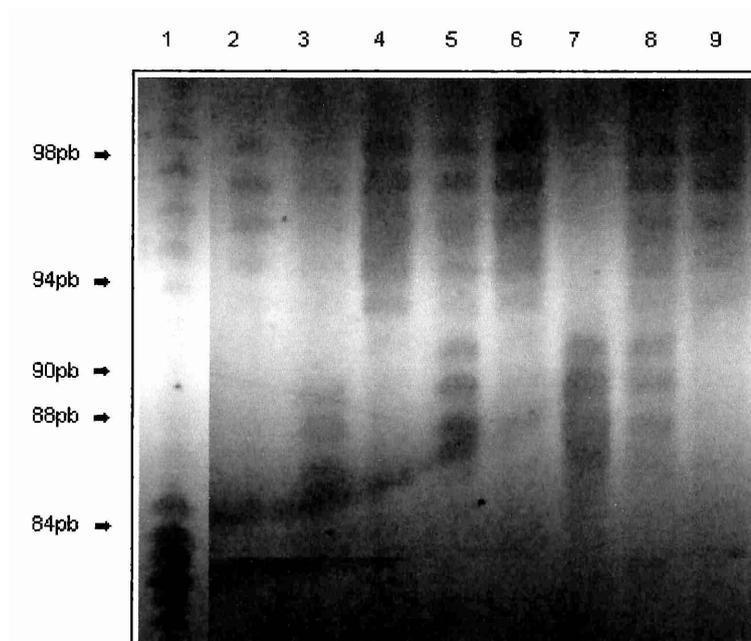


Figura n°23. Fotografía de un gel con el sistema HTG6. Ref: Calles 1: GN; 2:NN; 3: IN; 4: LN; 5: JN; 6:NN; 7:JJ; 8:JN; 9:NN. A los costados de la misma se indican los alelos por peso molecular expresados en pares de bases

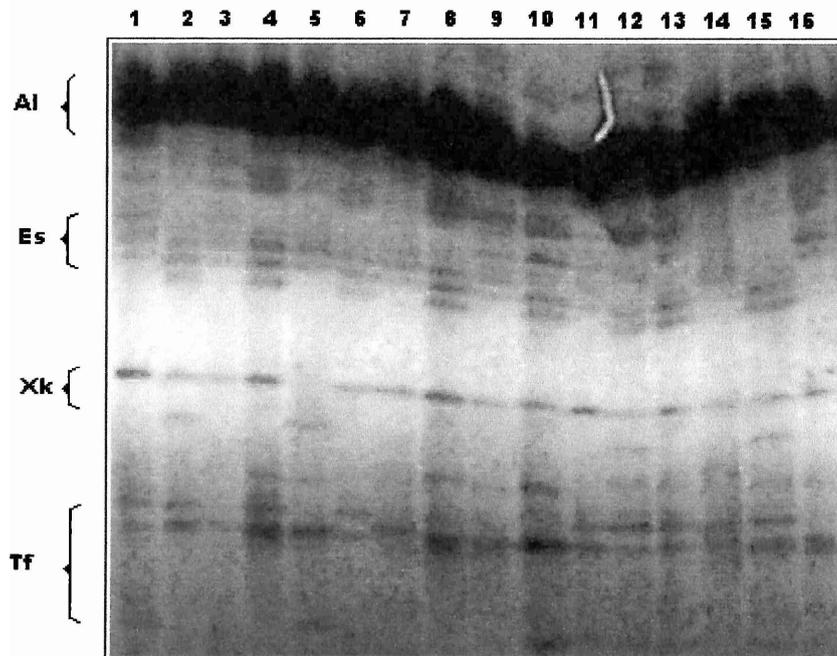


Figura nº 24. Fotografía de un gel de poliacrilamida básica (PAGE), con los sistemas Albúmina (Al), Esterasa básica (Es), Post-Albúmina (Xk) y Transferian (Tf). Ref.: Calle 1: Al: BB; Es: FI; Xk: KK; Tf: DR. Calle 2: Al: AB; Es: IS; Xk: KS; Tf: DF2. Calle 3 Al: AB; Es: FI; Xk: KK; Tf: F2F2. Calle 4 Al: AB; Es: IS; Xk: KK; Tf: DF2. Calle 5 Al: AB; Es: II; Xk: SS; Tf: F2O. Calle 6 Al: BB; Es: IS; Xk: KK; Tf: DF2. Calle 7 Al: BB; Es: II; Xk: KK; Tf: F1F1. Calle 8 Al: AB; Es: IS; Xk: KK; Tf: F2H. Calle 9 Al: AB; Es: FI; Xk: KK; Tf: F2H. Calle 10 Al: BB; Es: FS; Xk: KK; Tf: F2R. Calle 11 Al: BB; Es: FI; Xk: KK; Tf: DF2. Calle 12 Al: AA; Es: FS; Xk: KS; Tf: DF2. Calle 13 Al: AB; Es: SS; Xk: KK; Tf: DF2. Calle 14 Al: AB; Es: II; Xk: KK; Tf: DF2. Calle 15 Al: AB; Es: SS; Xk: KS; Tf: DF2. Calle 16 Al: AB; Es: FF; Xk: KK; Tf: F2F2.



Figura n° 25. Fotografía de un ejemplar de la raza Paso Peruano Argentino (PPA).



Figura n° 26. Fotografía de ejemplares de PPA en movimiento, se puede observar en el caballo zaino el movimiento característico de la raza que realiza con el miembro anterior denominado término.



Figura nº27. Fotografía de yeguas madres con sus crías de la raza Criollo Argentino (CA).

BIBLIOGRAFIA

1. ALBRIGTH,V.R.(1976). The Peruvian Paso: and his classic equitation. Caballus Publishers. Ft. Collins, CO.
2. ALTAMIRANO,J.C.(2001). Historia y origen del caballo español. 3era. Ed. Autor Editor, Madrid.
3. ANDRES CARA, D. and KAMINSKI, M. (1967). The inheritance of transferrin J in Andalusian horse breed. Anim. Genetics 18: 51-52.
4. ARANGUREN-MENDEZ, J.; JORDANA, J.; GOMEZ, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microstellite DNA markers. Genet. Sel. Evol. 33(4):433-442.
5. ARRANZ SANTOS, J.; (1994). Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y de ADN (variaciones puntuales y microsatélites). (Tesis doctoral), Universidad de León. España.
6. ASCASUBI,M. (1968). El caballo de paso y su equitación. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
7. BAILEY, E.; GRAVES, K.; COTHRAN, E.; REID, R.; LEAR, T. y R. ENNIS (1995). Syntenymapping horse microsatellite markers using a heterohybridoma panel. Animal Genetics 26: 177-170.
8. BARENDSE ,W.; ARMITAGE, S.M.; KOSSAREK, L. M.; SHALOM, A.; KRIKPATRICK, B.W.; RYAN,A. M.; CLAYTON, D.; LI, L.; NEIBERG,H.L.; ZHANG, N.; GROOSE,W.M.; WEISS, J.; CREIGHTON, P.; Mc CARTHY, F.; RON,M.; TEALE, A. J.; FRIES, R.; Mc GRAW, R. A.; MOORE, S. S.; GEORGES, M.; SOLLER, M ; WOMACK, J. E . and HETZEL, D.J.S. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. Nature genetics 6: 227-235.
9. BELL, K; POLLITT, C.C.; PATTERSON,S.D.(1988). Subdivision of equine Tf into H₁ and H₂. Animal Genetics 19: 177-188.
10. BINNS, M.M.; HOLMES N.G.; HOLLIMAN, A y 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.

11. BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KELLE, J. D.; STONE, R. T. ; SUNDEN, S. L. F.; HAWKINS, G. A.; SOLINAS TOLDOS, S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J. and BEATTIE, C. W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
12. BJØRNSTAD G., GUNBY, E., RØED, K. H. (2000). Genetic structure of Norwegian horse breeds. *J. Anim. Breed Genet.* 117:307-017.
13. BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
14. BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. (1997). A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1866-1971.
15. BOUZAT, J. L.; GIOVAMBATTISTA, G.; GOLIJOW, C.; LOJO, M. M.; DULOUT, F. (1998). Genética de la conservación de razas autóctonas: El Ganado Criollo Argentino. *Interciencia.* 23:151-157.
16. BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
17. BOWLING, A.; SUZUKI, Y. (1978). Identity of Xk and Pa systems in equine serum. *Animal blood. Groups biochem. Genet.* 9:127-128.
18. BOWLING, A. T.; CLARK, R. S. (1985). Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Animal blood groups bioquim. Genet.* 16: 93-108.
19. BOWLING, A. T.; RYDER, O. A. (1987). Genetic studies of blood markers in Przewalskii's horse. *J. Heredity* 78:75-80.
20. BOWLING, A. T. (1994). Population genetics of Great Basin feral horses. *Animal Genetics* 25: 67-74.
21. BOWLING, A. T.; EGGLESTON-STOTT, M. L.; BYRNS, G.; CLARK, R. S., DILEANIS, S.; WICTUM, E. (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics* 28:247-252.
22. BOWMA, G. J. A. (1979), "A short history of the Friesian Horse and the Original Friesian Studbook" [en línea] "Het Friese Paard". Friesse Pers Boekerij.

Drachten, The Netherlands. Last revision: February 08,2000.Friesian Horse Association of North America. <<http://www.friesianhorse.nh> >[Consulta:5 de noviembre de 2002].

23. BRAEND, M. ; STORMONT, C. (1964). Studies on hemoglobin and transferrin types of horses. Nord. Vet-Med.16: 31-37.
24. BREEN,L.(1994).An equine tetranucleotide repeat microsatellite MPZ2001. Animal Genetics 25: 123.
25. BREEN,L.; LINDGREN,G.; BINNS,M.M. (1997). Genetical and physical assignments of equine microsatellite-first integration of anchored markers in horse genome mapping. Mammalian Genoma 8:267-273.
26. CABRERA, A. (1945). Caballos de América. Editorial Sudamericana, Buenos Aires, Argentina.
27. CALLEN D.F.; THOMPSON A.D.; SHEN y PHILLIPS H.A.; RICHARDS R.I.; MULLEY J.C.; SUTHERLAND G.R.(1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. Am J Hum Genet, 52(5): 922-927.
28. CANON, 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.
29. CATANESI, C.J.(2001). Análisis de marcadores microsatélites en poblaciones humanas. (Tesis doctoral). Fac. Cs. Natl. Y Museo, La Plata, Buenos Aires, Argentina
30. CAVALLI-SFORZA, L.L. y BODMER, W.F.(1981). Genética de las poblaciones humanas. Ed. Omega, Barcelona, España.
31. CAVALLI-SFORZA, L.L.; CAVALLI-SFORZA F.(1996). The great human diasporas. The History of Diversity and Evolution. Addison-Wesley Publishing Company. USA.
32. CORNUET,J.M.; PIRY,S.; LUIKART,G.; ESTOUP,A.; SOLIGNAC,M.(1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics 153:1989-2000.

33. COTHRAN, G.; MANCILLA, R.; OLTRA, J.; ORTIZ, M.(1993). Análisis genético del caballo Chilote de la Isla de Chiloé-Chile. Arch. Med. Vet. XXV,n°2: 137-146.
34. CUNNINGHAME GRAHAM, R.(1997). Los caballos de la conquista.1era. ed. Ed. El Elefante Blanco, Bs. As., Argentina.
35. CHAKRABORTY,R.; MEAGHER,T.R.; SMOUSE,P.E.. (1988). Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. Genetics 118:527-536.
36. CHAKARARABORTY,R.; DANKER-HOPFE, H.(1991). Analysis of population structure : a comparative study of different estimators of Wright's fixation indices. In: Handbook of Statistics. Elsevier Ed.. Amsterdam vol.8: 204-254
37. CHATFIELD,C.(1982). A GUIDE TO STATISTICS.PHYSIOTHERAPY. 10;68(7):227-230.
38. CHECA,M.L.; DUNNER,S.; MARTIN,J.P.; VEGA,J.L.; CAÑON,J.(1997). A note on the characterization of a small Celtic pony breed. J. Anim. Breed. Genet. 115: 157-163.
39. CHESSER,R.K.(1983). Genetic variability within and among populations of the Black Tailed prairie dog. Evolution 37:320-331.
40. DIETRICH,W. ; KATZ,H.; LINCOLN,S.E.; SHIN,H.S.; FRIEDMAN,J.; DRACOPOLI,N.C Y E.S.LANDER (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses.Genetics,131: 423-447.
41. EDWARDS,A.; HAMMOND,H.A.; JIN,L.; CASKEY,C.T.; CHAKRABORTY,R.(1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats. Am. J. Hum. Genet. 49:746-756.
42. ELLEGREN,H. (1991). DNA typing of museum birds. Nature 354: 113.
43. ELLEGREN,H.; JOHANSSON,M.; SANDBERG,K. y ANDERSSON,L. (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. Animal Genetics 23: 133-142.
44. ERLICH, H.A. (1989). PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. Ed. Stockton press, New York,USA.
45. FISHER,R.A.(1936). The use of multiple measurements in taxonomic problems. Ann. Eugen. 7:179-188.

46. FISHER, R.A.; SCOTT, A.M.(1978). Isoelectric focusing of horse serum esterasa isozymes and detection of new phenotypes. *Animal blood groups biochem. Genet.* 9:207-213.
47. FONTDEVILLA, A. y MOYA, A..(1999). *Introducción a la genética de poblaciones.* Editorial Síntesis. Buenos Aires, Argentina.
48. FORD, E.B. (1965). *Polymorphism Biol. Rev.* 20:73-88.
49. FRIES,R.; EGGEN, A. y G. STRAZINGER (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomic* 8: 403-406.
50. GHANE, B; JUNEJA, R.K.; GROLMUS, L.(1977). Horizontal polyacrilamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood of cattle. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 8:127-137.
51. GODARD, S.; SCHIBLER, L., ;OUSTRY, A.; CRIBU, E.P. y G. GUERIN.(1998). Construction of a horse BAC library and cytogenetical assignment of 20 type I and type II markers. *Mammalian Genome* 9:633-637.
52. GUERIN, G.; BERTAND,M y G. STROZNGER (1994). Characterization of seven new horse microsatellite, HMS1 , HMS2 , HMS3 , HMS5 , HMS7 Y HMS8. *Animal Genetics* 25: 62.
53. GUERIN, G.; BAILEY, E.; BERNOCO, D.; ANDERSON,I.; ANTCZAK, D.F.; BELL, K.; BINNS, M.M.; BOWLING,A.T.; BRANDON, R.; CHOLEWINSKI,G.; COTHRAN, E.G; ELLEGREN,H.; FORSTER, M; GODARD,S; HORIN,P; KETCHUM,M; LINDGREN,G; MAC PARTLAN,H; MERIAUX, J.C.; MICKELSON,J.R.; MILLON, L.V.; MURRAY, J; NEAU,A.; ROED, K.;ZIEGLE,J et al.(1999). Report of the International Equine Gene Mapping Workshop: male linkage map. *Animal Genetics* 30(5):341-54.
54. GUO,S.W. and THOMPSON,E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
55. HABERFELD, A.; CAHANER, A.; YOFFE,O.; PLOTSKY,Y.; HILLEL, J.(1993).DNA fingerprinting of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Animal Genetics* 22(3): 299-306.

56. HART, D.; CLARKE, A.G.(1989). Principles of population genetics. Third edition. Ed. Sinawer, Sunderland. Canada.
57. HEDRICK, P.W., (1983). Genetics of populations. Eds Boston Jones and Bartlett.USA.
58. HILBERT, P.; LINDPAINTER, K.; BECKMAN, J.S.; SERIKAWA,T.; SOUBRIER, F.; DUBAY, C.; CARTWRIGHT, P.; DE GOUYON, B.; JULIER, C.; TAKAHASI, S.; VINCENT, M.; GANTEN, D.; GEORGES, M. Y G.M.LATHROP (1991). Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. Nature 353: 521-529.
59. HUNTER, R.L. & MARKET,C.L.(1957).Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125:1294-5.
60. INNIS, M.A.; GELF, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.. (1990). PCR: protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California.
61. JACOBH, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLM, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J. Y E.S.LANDER (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Cell 67: 213-224.
62. JAIN, N.C.(1993). Essential of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger. USA.
63. JAMIESON, A.; TAYLOR, St. C.S.(1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics 28:397-400.
64. JEFFREYS, A.J.; NEUMANN, R. & WILSON,V.(1990). Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. Cell 60:473-485.
65. JORDANA, J.; PIEDRAFrita, J.; SÁNCHEZ, A.; PUIG, P.(1992).Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds. J. Hered. 83:367-374.
66. JUNEJA,R.K. ;GHANE,B.; STRATIL,A.(1987). Polymorphic plasma post albumins of some domestic animals identified as homologous of human plasma a.1.b-glycoprotein. Animal Genetics 18: 119-123.

67. KANEKO, J.J. (1997). Serum proteins and the dysproteinemias. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Edited by Kaneko, J.J. San Diego, Academic Press.
68. KELLY, L.(1999). Análisis de marcadores genéticos en caballos criollos del Uruguay, comparación con otras razas equinas.(Tesis de doctorado). Montevideo. Uruguay.
69. KIMURA, M.(1968). Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626.
70. KIMURA, M. (1983). The neutralist theory of molecular evolution. Cambridge Univ. Press. UK.
71. KINGSBURY, N.; MASTERS, C.J. (1972). Heterogeneity, molecular weight interrelationships and developmental genetics of the esterase isoenzymes of the rainbow trout. Biochim Biophys Acta. Feb 28;258(2):455-65.
72. KWIATKOWSKI, D.J.; HENSE, E.P.; WEIMER,K.; OZELIUS,L.; GUSELLA, J.F.; HAINES,J. (1992). Construction of a GT polymorphism map of human 9q. Genomics 12: 229-240.
73. LANDSTEINER, K.(1901). Ueber heterogentisches antigen und haptén. Biochem. Z. 119: 294-306.
74. LEAR T.L.; BRANDON,R.; BELL,K. (1999). Physical mapping of ten equine dinucleotide repeat microsatellites. Animal Genetics 30(3):235.
75. LEWIN, B.(1997). Genes VI. Oxford University Press, New York. USA.
76. LINDGREN,G.; PERSSON,H., ELLEGREN,H. (1999). Five equine dinucleotide microsatellite loci HTG17, HTG20,HTG21, HTG28 and HTG31. Animal Genetics 30(1):70-1.
77. LINDGREN, G.(2000).Ten equine dinucleotide repeats HTG18-19, HTG 22-24, HTG26-27, HTG29-30 and HTG32. Animal Genetics 31(2):145-6.
78. LOUIS, E.J.; DEMPSTER, E.R. (1987)An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. Biometrics. Dec;43(4):805-11.
79. LUCOTTE, G.(1977). Le polymorphisme et les facteurs de son maintien. Masson,París. Francia.

80. MAC HUGH, M. (1996). Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. (Thesis for the degree of Doctor of Philosophy). University of Dublin. Ireland.
81. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. Y. J. SAMBROCK (1982). Molecular cloning. molecular manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N.Y.
82. MARIAT, D.; OUSTRY-VAIMAN, A.; CRIBIU, E.P.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY B.P.; GUERIN, G.(2001). Isolation, characterization and FISH assignments of horse BAC clones containing type I and II markers. *Cytogenet. Cell Genet.* 92(1-2):144-8.
83. MARKLUND, S.; ELLEGREN, H.; SANDBERG, K. Y. L. ANDERSSON (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25:19-23.
84. MATTEHUS, A.G.(1979). The nature of the prealbumin "esterases" of horse serum. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 10: 181-184.
85. MAXAM, A.M.; GILBERT, W.(1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:560.
86. MESELSSON, M.; YUAN, R.(1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114.
87. MIROL, P.M.; PERAL GARCIA, P; VEGA PLA, J.L.; DULOUT, F.N.(2002). Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. *Animal Genetics* 33:356-363.
88. MOORE, S.; SARGEANT, L.; KRING, T.; MATTICK, J.; GEORGES, M. Y. J. HETZEL (1991). The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primers pairs in closely related species. *Genomic* 10: 654-660.
89. MULLIS, K. Y. FALLONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 155: 335-350.
90. NEI, M & ROYCHOUDHURY, A.K. (1974). Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
91. NEI, M. (1977). F-statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225-33.

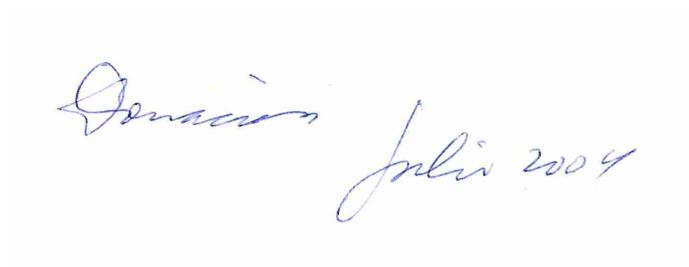
92. NEI, M. (1978). Estimation of average heterocigosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
93. NEI, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University press. New York. USA.
94. OHTA, T.; KIMURA, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22:201-204.
95. OHTA, T. (1985). In: *Lecture notes in biomathematics. Cap.2: Some models for treating evolution of multigene families and other repetitive DNA sequence*. Ed. Kimura, M.; Kallianpur, G.; Hida, T.. Springer Verlag, Tokyo, Japan.
96. OLTRA, J.; ORTIZ, M.; de la BARRA, V.; STANGE, E. (1993). Tipificación de polimorfismos bioquímicos sanguíneos en equinos fina sangre de carrera y fina sangre chilena y su eficacia en pruebas de exclusión de paternidad. *Arch. Med. Vet.* XXV. n°2: 147-153.
97. OURAGH, L. (1988). Les marqueurs génétiques sanguins chez le cheval Barbe. *Magreb Vétérinaire* 3 (14): 24-26.
98. OURAGH, L.; MERIAUX, J.C.; BRAUN, J.P. (1994). Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Morocco. *Animal Genetics* 25: 45-47.
99. PAGES LARRAYA, F.; WYLLER DE CONTARDÍ, N.; SERVY, E. (1978). Marcadores genéticos de la población aborigen del Chaco Argentino. *Rev. Instituto de Antropología. Univ. Nac. De Córdoba* VI:217-241.
100. PERAL GARCIA, P. (1994). Caracterización racial de equinos de pura raza criolla. Su comparación con los equinos de pura raza española mediante el análisis de sus polimorfismos genéticos. (Tesis de Doctorado). Fac. Cs. Natl. Y Museo, La Plata, Bs. As., Argentina.
101. PERAL GARCIA, P.; KIENAST, M.; VILLEGAS CASTAGNASSO, E.; DIAZ, S.; DULOUT, F. (1996). Estudio de relaciones genéticas entre razas equinas mediante el análisis multivariado. *Agro Sur* 24(1): 39-47.
102. PAETKAU, D.; STROBECK, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Mol Ecol* 4,(4): 519-520.

103. PEMBERTON JM, SLATE J, BANCROFT DR, BARRETT JA.(1995). Non amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4 (2):249-252.
104. RAUDSEPP, T.; FRONICKEL, L.; SCHERTHAN, H.; GUSTAVSSON, I.; CHOWDHARY,B.P.(1996). Zoo-FISH delineates conserved chromosomal segments in horse and man. *CHROMOSOME Res.* 4:218-225.
105. RAYMOND, M. & ROUSSET, F.(1995). GENEPOP (version 3.1): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
106. REUSSER, H.(2002). The Peruvian Paso horse.[en linea]Conquistador The world of Spanishhorse.HorseQuest.com.<<http://www.horsequest.com/bredshow/perupaso/perupaso.htm>> [Consulta: 17 de abril de 2002].
107. RIPOLI, M.V. (2000). Detección de QTL'S (quantitative traits loci) para la producción lechera a través del uso de marcadores genéticos bovinos criollos argentinos y criollos saavedreños. Su aplicación en programas piloto de selección asistida por marcadores (MAS). (Tesis doctoral). Fac. Cs. Natl. Y Museo, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
108. RIBEIRO DOS SANTOS, A.K.; SANTOS,S.E.; MACHADO,A.L.; GUAPINDAIA,V.; ZAGO, M.A.(1996). Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian native of the Amazon region. *Am. J. Phys. Anthropol.* 101:29-37.
109. RODERO, E. Y HERRERA, M. (2000). El concepto de raza. Un enfoque epistemológico. *Arch. Zootec.* 49:5-16.
110. RODRIGUEZ-GALLARDO, P.P; SANCHEZ, P.A.(1991). Marcadores genéticos (MG) en el caballo: III. Aplicaciones. *M.M.* 45: 502.508.
111. ROY, M.S.; GEFFEN, E.; SMITH, D.; OSTRANDER, E.A.; WAYNE, R.K.(1994). Patterns of differentiation and hybridization in north American wolf like canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* 11:553-570.
112. SAITBEKOVA, N.; GAILLARD, C.; OBEXER-RUFF, G.; DOLF, G.(1999). Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Anim. Genet.* 30(1):36-41.
113. SANCHES DO AMARAL GURGUEL. (1998). Caracterización de caballos cuarto de milla. (Tesina de maestrado). Fac. Cs. Vet. Santa Maria, RS, Brasil.

114. SANDBERG, K. (1974). Blood typing horses: current status and application to identification problems. 1st World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.
115. SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R.(1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
116. SEAN WALSH, P. ; DAVID, H.; METZGER Y RUSSEL HIGUCHI (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - Based Typing from Forensic Material. Cetus Corporation. Emeryville, C. A.
117. SERIKAWA, T.; KURAMOTO, T.; HILBERT, P.; MORI, M.; YAMADA, J.; DUBAY,C.J.; LINDPAINTER,K.; GANTEN,D.; GUENET,J-L.; LATHROP,G.M. Y J.S. BECKMAN (1992). Rat gene mapping using PCR-Analyzed microsatellite. Genetic 131:701-721.
118. SHIUE Y-L.; MILLON,L.V.; SKOW,L.C.; HONEYCUTT D.; MURRAY, J.D.; BOWLING,A.T.(2000). Synteny and regional marker order assignment of 26 type I and microsatellite markers to the horse X and Y chromosomes. Chromosome Res. 8(1):45-55.
119. SHRIVER, M.D.; JIN,L.; BOERWINKLE, E.; DEKA,R.;FERREL,R.E.; CHAKRABORTY,R. (1995). A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. Mol. Biol. Evol. 12(5): 914-920.
120. SIBLEY, C.G. & AHLQUIST, J.E. (1990). Phylogeny and classification of birds. New Haven, CT: Yale University Press.
121. SLATKIN, M.(1983). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution. 47:264-279.
122. STALLING, R.L. (1992). CpG suppression in vertebrate genomes does not account for variety of (CpG)_n microsatellite repeats. Genomics 17: 890-891.
123. SWINBURNE,J.; GERSTENBERG,C.; BREEN, M.; ALDRIDGE,V.; LOCKHART,L.; MARTI,E.; ANTCZAK,D.; EGGLESTON-STOTT,M.; BAILEY,E.; MICKELSON,J.; ROED,K.; LINDGREN,G.; VON HAERING,W.; GUERIN,G.; BJARNASON,J.; ALLEN,T.; BINNS,M..(2000). First comprehensive low-density horse linkage map based on two 3-generation, full-sibling, cross-bred horse reference families. Genomics 66:123-34.
124. TAUTZ,O. Y M.RENZ (1984).Simple sequences repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic acids Res.12: 4127-4138

125. TEVFIK DORAK,B.A.(2002). Common Terms in Evolutionary Biology and genetics [en línea]<<http://www.tevfikdorak.molecular>> [Consulta: 7 de noviembre de 2002]
126. TOMASWESKA-GUSZKIMICS,K ; KAMINSKI,M.(1980). Genetic blood polymorphism of Polish primitive horse. *Genet. Polonica* 21:201-203.
127. TODD,J.A.; AITMAN,T.J.; CORNALL,R.J.(1991). Genetic analysis of autoimmune type I diabetes mellitus in mice. *Nature* 351:542-547.
128. TOZAKI, T.; INOVE, S.; MASHIMA, S.; OHTA, M.; MIURA, N.; TOMITA, M.(2000). Sequence analysis of trinucleotide repeat microsatellites from an enrichment library of the equine genome. *Genome* 43(2):354-365.
129. TOZAKI, T.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; MIURA, N; CHOI-MIURA, N.H.; TOMITA, M. (2001). Characterization of equine microsatellite and microsatellite-linked repetitive elements (eMLREs) by efficient cloning and genotyping methods. *DNA Res.* 28,8(1):33-45.
130. TROMMELEN, G.J.J.M.; DEN DASS,J.H.G.; VIJG,J.; UITTERLINDEN,A.G.(1993). DNA profiling of cattle using micro and minisatellite core probes. *Animal Genetics* 24: 235-241.
131. VAN HAERING,M.; BOWLING,A.T.; SCOTT, M.L.; LENSTRA,J.A.; ZWAAGSTRA,K.A.(1994). A highly polymorphic horse microsatellite locus VHL20. *Animal Genetics* 25:207.
132. VEGA PLA, J.L.; RODRIGUEZ GALLARDO, P.P.(1998). Investigación biológica de la paternidad en caballos con secuencias microsatélites de ADN. *Med. Mil. (Esp)* 54(3): 143-147
133. VILA,C.; LEONARD,J.A.; GOTHERSTROM, A.; MARKLUND, S.; SANDBERG,K.; LINDEN,K.; WAYNE,R.K.; ELLEGREN,H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* (5503):474-477.
134. VINOCOUR,M.E..(1999). Grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos en caballos de raza criolla en Rio Grande del Sur. Tesis de maestría. Universidad Federal de Santa María. Rio Grande del Sur. Brasil.
135. VON RUST MC CORMICK,A.. (1992). History of the Peruvian Paso. *Caballo Magazine* 64:78-81.

136. WALSH,P.S.; METZGER,D.A.; HIGUCHI,R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques* 10(4): 506-513.
137. WEIR, B.S.(1990). *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. USA.
138. WEIR,B.S. and COCKERHAM,C.C.(1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
139. WEITKAMP,L.R.; MAC CLUER, J.W.; GUTTORMSEN,S.; MC KNIGHT ,J.; WERT,N.; WITMER, J.; BOYCE,P.; EGLOFF, J.(1982). Genetic of Standardbred stallion reproductive performance. *J. Reprod. Fert.* 32:135-142.
140. WRIGHT,S.(1978). *Evolution and the genetics of populations:Vol.4. Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press.
141. XU, A.M.; VAN EIJK, M.J.T.; PARK,C.; LEWIN,H.A.(2000). Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *The J. Immunology* 151(12): 6977-6985.
142. ZUCKERLAND,E. & PAULING,L.(1962). *Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity*. In: M.Kasha and B. Pullman(Eds.), *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York. USA.



Genavio
Julio 2004