

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

"Estudio de la variabilidad genética de razas
bovinas criollas, europeas e índicas de Argentina y
Bolivia. Su aplicación en identificación individual y
paternidad"

Trabajo de tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Naturales

Licenciado Juan Pedro Lirón

Director Doctora Pilar Peral García
Codirector Doctor Guillermo Giovambattista

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata

2004

A mis padres Alicia y Pedro

A mi hermana y sobrinos Florencia, Feli y Sarita

A mi amor Silvana

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a aquellas personas que de una u otra forma han intervenido en la realización del presente trabajo y que a lo largo de mi carrera me brindaron su colaboración, comprensión intelectual y humana para que este trabajo pudiera ser realizado.

A Guillermo Giovambattista, quien durante todo este tiempo supo ser mi consejero y amigo en la difícil tarea de guiarme en los primeros pasos de esta hermosa profesión y por brindarme todo lo que estaba a su alcance para la realización de este trabajo. Deseo agradecerle principalmente su confianza y por sobre todo su constante compañía durante la redacción de este escrito.

También deseo manifestar una sincera gratitud a mi Directora de tesis doctoral, Dra. Pilar García por haberme guiado en el desarrollo de este trabajo a través de sus invaluables consejos y sugerencias.

Al Director del Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada, Ing. Fernando Dulout, por darme la oportunidad de ingresar en su equipo de investigación donde también desarrollé la tesis de Licenciatura en Genética.

A todas las personas que integran el CIGEB, en especial a todo el grupo de animales domésticos: Vero, Egle, Silvina, Mariana, Patricia y Julio, quienes contribuyeron con el aprendizaje cotidiano de técnicas, interpretación de resultados, etc. y por la ayuda recibida en todas las ocasiones en que la he requerido, por compartir su espacio y por permitir que la vida cotidiana sea más llevadera. A Carlos Golijow por sus consejos y por los gratos momentos compartidos en el laboratorio.

A Martín, quien me brindó su amistad y con quien compartí innumerables momentos dentro y fuera del laboratorio, ayudándome en muchas ocasiones a superar momentos difíciles

A Luis Cancela, Julio De Luca, a los integrantes de la cátedra de Zootecnia y a todas las personas que contribuyeron en este trabajo facilitando la obtención de las muestras, indispensables en la realización del mismo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata.

Un agradecimiento muy especial al amor de mi vida, mi novia Silvana, quien me brindó todo su amor, ternura y comprensión y que además participó activamente en la redacción y composición de esta Tesis.

A Juan y Elena por su invaluable paciencia y por hacerme sentir como un miembro más de su familia.

Finalmente a mi familia que me aguantó todos estos años y esperaron ansiosos este momento. A mis padres Pedro y Alicia, a mi hermana Florencia y a mis sobrinitos Felipe y Sara.

A todos, muchísimas gracias!.

INDICE

Página

RESUMEN.....	<i>ix</i>
 I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Revisión histórica.....	1
1.1.1 Clasificación de los bovinos.....	1
1.1.2 Domesticación de los bovinos.....	1
1.1.3 Origen del ganado europeo	2
1.1.4 Origen del bovino criollo americano.....	3
1.1.5 Razas bovinas domésticas.....	6
1.1.6 Razas de origen europeo.....	8
Aberdeen Angus.....	8
Hereford.....	8
Holando Argentino.....	9
Jersey.....	9
Retinta.....	10
1.1.7 Razas de origen índico.....	10
Nelore.....	10
Brahman.....	11
1.1.8 Razas criollas americanas.....	11
Criolla Argentina.....	11
Criolla Chaqueña Boliviana.....	13
Criolla Saavedreña.....	13
Criolla Yacumeña.....	14
1.2. Polimorfismos.....	14
1.2.1 Historia de los polimorfismos	14
Polimorfismos bioquímicos.....	15
Polimorfismos de ADN	16
1.2.2 Antecedentes en el estudio de los polimorfismos genéticos en razas bovinas criollas latinoamericanas	20
1.2.3 Microsatélites	20
Mecanismos de mutación	23
Modelos de evolución de los microsatélites	24

1.3. Genética forense e identificación animal	29
1.3.1 Identificación individual y paternidades	29
1.3.2 Abigeato o cuatrismo	31
1.3.3 Determinación de la raza de origen de los individuos	32
 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis de trabajo	34
2.2 Objetivo general y objetivos particulares	35
 3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Metodología experimental general	36
3.1.1 Selección y extracción de muestras	36
3.1.2 Poblaciones analizadas	37
3.1.3 Muestras de paternidades - casos forenses analizados	37
3.1.4 Toma de muestras	37
3.1.5 Extracción de ADN	38
Método de extracción de ADN a partir de sangre con CHELEX™	39
Método de extracción de ADN partiendo de sangre con DNAzol™	39
Extracción de ADN a partir de músculo y otros tejidos blandos	40
Método rápido de extracción de ADN a partir de pelos	40
3.1.6 Tipificación de los marcadores moleculares	40
3.1.7 Corridos electroforéticos	41
Geles de poliacrilamida no desnaturizantes	41
Geles de poliacrilamida desnaturizantes	41
3.1.8. Tinción con plata	41
3.1.9. Análisis del tamaño molecular	42
3.2 Metodología experimental específica	42
3.2.1. Microsatélites	42
Multiplex N° 1: <i>BM2113 (D2S26)</i> , <i>BM1824 (D1S34)</i> y <i>SPS115 (D15)</i>	43
Multiplex 2: <i>INRA023 (D3S10)</i> y <i>ETH225 (D9S1)</i>	44
Multiplex 3: <i>TGLA122 (D21S6)</i> y <i>TGLA227 (D28S1)</i>	45
Multiplex 4: <i>MGTG7 (D23S5)</i> y <i>TGLA53 (D16S5)</i>	45
<i>INRA124 (DYS6)</i>	46
<i>INRA189</i>	46
3.2.2 <i>BoLA-DRB3</i>	47

3.3 Metodología estadística	52
3.3.1. Frecuencias génicas y genotípicas	52
3.3.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).....	52
3.3.3 Diversidad genética.....	55
Número de alelos	55
Número de alelos observados (N_a ob)	55
Número de alelos esperados (N_a esp)	55
Heterocigosidad esperada o diversidad alélica (h_e)	55
3.3.4 Estructura poblacional	56
Tests de diferenciación genética	56
Indices de fijación (estadísticos F)	57
Análisis molecular de la varianza (AMOVA)	58
3.3.5 Análisis filogenético	59
Distancias genéticas	59
Construcción de árboles filogenéticos	61
3.3.6 Análisis multivariado	62
3.3.7 Cálculo del porcentaje de mezcla genética	63
3.3.8 Determinación de la raza de origen de los individuos	64
Métodos de distancias genéticas entre individuos	65
Métodos de frecuencias	66
Métodos bayesianos	68
3.3.9 Estadísticos forenses	68
Poder de exclusión	68
Probabilidad de exclusión combinada simple y doble	70
Índice forense o “likelihood ratio” (L)	71
Metodología de asignación de paternidades en situaciones de apareamiento múltiple	73
Metodologías estadísticas empleadas para la resolución de casos de abigeato	75
3.3.10 Programas de computación utilizados	77
 4. RESULTADOS	
4.1. Frecuencias génicas y genotípicas	78
4.2 Medidas de diversidad genética	85
4.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento	87

4.4 Estructura poblacional	91
4.4.1 Test de diferenciación poblacional	91
4.4.2 Coeficientes de subdivisión poblacional (estadísticos F)	91
4.4.3 Análisis molecular de la varianza (AMOVA)	92
4.5 Distancias génicas y árboles	94
4.6 Análisis multivariado	98
4.7 Estimación de los niveles de introgresión de genes índicos en las razas criollas	101
4.8 Asignación poblacional	102
4.8.1 Árboles filogenéticos de individuos	102
4.8.2 Método de frecuencias	105
4.9 Estadísticos forenses	108
4.9.1 Poder de exclusión	108
4.10 Resumen de los casos analizados.....	110
4.10.1 Asignación de paternidades en situaciones de apareamiento Múltiple.	110
4.10.2 Identificación individual en casos de abigeato	112
 5. DISCUSIÓN	
5.1 Análisis de la diversidad genética	115
5.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento	118
5.3 Estructura poblacional y relaciones filogenéticas entre las razas	121
5.3.1 Diferenciación genética	122
5.3.2 Estructura genética. Índices de fijación y análisis de la varianza	123
5.3.3 Árboles filogenéticos y análisis multivariado	127
5.4 Introgresión de genes índicos en las razas criollas sudamericanas	132
5.5 Asignación de los individuos a sus razas de origen	136
5.6 Estadísticos forenses	139
5.6.1 Poder de exclusión	139
5.6.2 Resumen de los casos analizados.....	143
Asignación de paternidades en situaciones de apareamiento múltiple	143
Identificación individual en casos de abigeato	144
 6. CONCLUSIONES	148
 7. BIBLIOGRAFÍA	150

RESUMEN

En el presente trabajo se tipificaron cinco razas taurinas europeas (Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Jersey y Retinta), dos cebuinas (Nelore y Brahman) y cuatro criollas de Argentina y Bolivia (Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Yacumeña y Criolla Saavedreña) mediante el análisis de nueve microsatélites autosómicos y dos del cromosoma Y. Además, se analizaron un total de 108 muestras correspondientes a 35 casos de robo de ganado (abigeato) ocurridos en la provincia de Buenos Aires y un caso complejo de paternidad. Estos resultados permitieron estimar la diversidad genética, la estructura poblacional y las relaciones filogenéticas de las razas antes mencionadas. Por otra parte, se evaluó la capacidad del juego de marcadores autosómicos utilizados para resolver casos de identificación individual, paternidades y asignación de individuos a sus razas de origen.

Los resultados obtenidos evidenciaron niveles superiores o intermedios de variabilidad genética en las razas criollas, a pesar de la hipotética formación de estas poblaciones a partir de un reducido grupo fundador y a la drástica reducción poblacional sufrida durante los últimos cien años. La comparación de los marcadores autosómicos, holándricos y mitocondriales sugiere que el acervo genético de los bovinos criollos se habría formado principalmente por genes de origen taurino europeo y, en menor medida, africanos, presentando algunas de estas poblaciones hasta un 10% de genes de origen índico. Esta comparación revela que la introgresión de genes cebuinos ocurrió recientemente y por vía paterna. El cálculo de los niveles de diferenciación genética entre las razas bovinas estudiadas evidenció un limitado flujo genético entre ellas. La mayor parte de la variabilidad observada se explica mediante la separación antigua de los linajes índicos y taurinos. A pesar que dentro del grupo taurino no existió una estructuración tan evidente, las razas criollas y europeas pudieron diferenciarse en dos grupos diferentes. Esto sería consecuencia de un origen simultáneo y más reciente de las razas pertenecientes a este grupo.

El juego de marcadores utilizado permitió asignar, con un bajo nivel de error, individuos a sus poblaciones de origen en las principales razas bovinas de la provincia de Buenos Aires. Los marcadores más eficientes para dicho propósito resultaron ser aquellos que presentaron un mayor número de alelos y en menor medida los que mostraron valores superiores de F_{ST} . La asociación entre el número de alelos y la exactitud en la determinación de la raza de origen de los individuos revela la importancia de seleccionar marcadores genéticos, como por ejemplo los microsatélites, que presenten un número elevado de alelos. El poder de exclusión calculado para los casos de identificación individual y las paternidades superó el valor de 0,99 en todas las razas estudiadas, excepto en las

paternidades donde no se dispuso de la información genética de la madre. En este último caso sería necesario incluir al menos 12 microsatélites para obtener valores aceptables de probabilidad. Las metodologías experimentales y estadísticas utilizadas junto a la información producto de la caracterización de las poblaciones locales permitieron resolver casos de abigeato y de paternidad complejas, aportando evidencias concretas para la resolución de este tipo de disputas judiciales. Dada la estructuración poblacional presente en la especie bovina, un buen criterio para el cálculo del índice L sería la selección de la raza con mayor valor de probabilidad. En este contexto, las técnicas de asignación racial serían de gran utilidad para la elección de dicha raza. La aplicación de este criterio conservador permite optimizar la valoración de la evidencia genética en la resolución los casos de hurto de ganado.

1.1 Revisión histórica

1.1.1 Clasificación de los bovinos

Los bovinos pertenecen al orden de los Artiodáctilos, familia Bovidae, subfamilia Bovinae, género *Bos*. La familia Bovidae se habría originado hace unos veinte millones de años, desarrollando una rápida radiación e intensa cladogénesis. Estos hechos fueron probablemente favorecidos por la emergencia de la sabana africana hace unos 18 a 23 millones de años.

Quizás la característica diagnóstica más útil de los bóvidos sea la presencia de cuernos ahuecados y no ramificados. Evidencias de tipo molecular, sugieren que la actual familia Bovidae tiene un origen parafilético (Gatesy *et al.*, 1992).

Actualmente se diferencian dos tipos principales de bovinos domésticos, el tipo cebú y el tipo taurino, que se diferencian principalmente por la presencia en el primer tipo de una joroba de tejido muscular, conectivo y grasa en posición torácica o cervico-torácica. Ambos tipos son nombrados como especies separadas, *Bos indicus* y *Bos taurus*, pero debido a que son completamente fértiles entre sí, se consideran más frecuentemente como subespecies.

1.1.2 Domesticación de los bovinos

Hoy en día, es ampliamente aceptado que el ancestro salvaje de las razas bovinas domésticas actuales fue el extinto *Bos primigenius* denominados como Ox salvaje, *aurochs*, *Uro*, toro salvaje (Grigson, 1980; Epstein y Mason, 1984; Payne, 1991). Este animal ocupó una gran extensión geográfica, como lo demuestra el hallazgo de fósiles en sitios tan distantes como las islas británicas y China. El amplio rango de distribución de *Bos primigenius* condujo a la diferenciación de distintas razas geográficas o subespecies. Actualmente, se reconocen al menos tres subespecies del Ox salvaje: *Bos primigenius namadicus* (Asia), *Bos primigenius opisthonomus* (norte de África) y *Bos primigenius primigenius* (Europa). Las subespecies africana y asiática se habrían extinguido hace poco más de 2000 años; mientras que el Ox europeo habría existido en una reserva en Polonia hasta el año 1625.

Uno de los puntos de vista más aceptado sobre el origen de los bovinos actuales es que las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus* se originaron a partir de *B. primigenius namadicus* en un único centro de domesticación situado en el cercano oriente hace 8.000-10.000 años. Según esta perspectiva, el ganado cebú se habría originado como una adaptación local al sub-continente indio de animales taurinos pre-domesticados (Epstein,

1971; Epstein y Mason, 1984; Payne, 1991). Una explicación alternativa es que el tipo *Bos indicus* fue domesticado en forma independiente, probablemente en algún lugar de la India (Grigson, 1980; Meadow, 1984).

Estudios previos basados en polimorfismos de proteínas, grupos sanguíneos, RFLPs y microsatélites han demostrado una gran divergencia entre las dos subespecies bovinas (Brend, 1972; Naik, 1978; Manwel y Baker, 1980). El análisis de secuencias correspondientes a la región de control del ADN mitocondrial sugiere una divergencia mínima de 275.000 años para los dos taxa (Loftus *et al.*, 1994a; Bradley *et al.*, 1996). Por otra parte, MacHugh y colaboradores (1997) estimaron un tiempo de divergencia de 610.000-850.000 años utilizando marcadores de tipo microsatélite. Estos datos son apoyados por estudios basados en haplotipos del cromosoma Y (Bradley *et al.*, 1994).

Generalmente, se acepta que las primeras poblaciones de bovinos africanos fueron exclusivamente de origen taurino y que habrían migrado desde el cercano oriente hace unos 7000 años (Epstein, 1971; Payne, 1991). Recientes hallazgos arqueológicos, han cuestionado este punto de vista, sugiriendo que el bovino salvaje africano (*Bos primigenius ophistonomus*) se habría domesticado independientemente en algún lugar del continente africano (Wendorf y Schild, 1994). Varios trabajos realizados con animales taurinos de Europa, África y Cercano Oriente a partir de la región de control del ADN mitocondrial de animales, demostraron la presencia de cuatro haplotipos principales. Mientras que tres haplotipos fueron encontrados en Europa y el Cercano Oriente, el restante correspondió solamente a los animales de África, con excepción de algunos individuos de Portugal que tendrían un origen africano. Estos datos junto a la evidencia de una filogenia en forma de estrella, avalan la hipótesis de una domesticación independiente en África (Bradley *et al.*, 1996; Troy *et al.*, 2001).

Si bien el ganado cebuino se habría introducido en África hace unos 4000 años, comienza a dispersarse ampliamente desde el año 700 AC con la migración de los árabes hacia el norte y el este de dicho continente. Actualmente, África presenta un mosaico de morfologías cebuinas, taurinas y formas intermedias. Estudios llevados a cabo con marcadores mitocondriales, autosómicos y holándricos han demostrado una marcada introgresión de genes índicos en las poblaciones africanas por vía paterna (Bradley *et al.*, 1994; Loftus *et al.*, 1994a; Teale *et al.*, 1995; MacHugh *et al.*, 1997).

1.1.3 Origen del ganado europeo

Las razas bovinas europeas se clasifican en tres grupos diferentes: *Red convex*, *Brown concave* y *Black orthoide*. Dichos bovinos han arribado a Europa siguiendo las

principales migraciones humanas. Una de las rutas de inmigración de bovinos provino del Medio Oriente y atravesó Europa; estas poblaciones están hoy representadas por las razas del grupo *Brown concave*. Otra ruta procedió probablemente de África, a través del estrecho de Gibraltar y estaría representada en la actualidad por los bovinos del grupo *Red convex* (Feliuss, 1995). A este último grupo pertenecen la raza Alentejana de Portugal y la raza andaluza Retinta (Feliuss, 1995; Cañon *et al.* 2001). El tercer grupo, el *Black orthoide*, también denominado Ibérico, es considerado como un ejemplo de los antiguos bovinos salvajes que existieron en la península Ibérica antes de la llegada de las otras razas (Sanchez-Belda, 1984). Según otra hipótesis, el grupo Ibérico sería descendiente del Lonhorn Hamítico, introducido por los berberiscos de África del Norte, quienes invadieron la península Ibérica en tiempos prehistóricos (Feliuss, 1995)

El ganado bovino Ibérico descendería de los antiguos bovinos Hamíticos, caracterizados por sus largos cuernos, domesticados en Egipto hace unos 4.000 años A.C. Éstos habrían sido introducidos, procedentes de África del Norte, en el sur de España con las migraciones que poblaron la región meridional de la península Ibérica (Inchausti y Tagle, 1980). Según Rouse (1977), el ganado bovino español descendería directamente del *Bos primigenius*, domesticado en la zona de los Pirineos a partir del paleolítico. Más tarde estos animales se fueron adaptando durante cuatro siglos al ambiente semiárido y caluroso en su paso por Castilla hacia Andalucía.

Cymbron y colaboradores (1999) analizaron secuencias del *D-loop* mitocondrial en razas bovinas portuguesas y demostraron la existencia de haplotipos africanos y europeos, lo que evidenciaría una mezcla génica intercontinental en el origen de las razas Ibéricas.

En conjunto, los bovinos ibéricos incluyen a las razas españolas: Asturiana, Gallega, Pasiaga, Campo, Tudanca, Toros de Lidia, Castellana, Sayaguesa, Morucha y Andaluza; y a las razas portuguesas: Barrosa, Maronesa, Arouquesa, Preta, Mertolenga y Alentejana.

1.1.4 Origen del bovino criollo americano

Cuando se descubrió América no existían bovinos en el nuevo continente. Hecho demostrado por la ausencia de fósiles y la inexistencia de palabras indígenas para denominar esta especie. Los primeros bovinos fueron introducidos al continente americano por Cristóbal Colón durante su segundo viaje en 1493. Estos animales eran comprados generalmente en los alrededores de los puertos de embarque, es decir Andalucía e Islas Canarias. Los puertos utilizados eran: Sevilla o Córdoba, sobre el río Guadalquivir, y Cádiz, Palos o Sanlúcar de Barrameda, sobre el mar.

Los vacunos llegaron inicialmente a La Española, Puerto Rico, Jamaica y Cuba. En 1513 llegaron a Panamá y en 1521 a México y desde allí se extendieron a los Estados Unidos, dando origen a la raza Longhorn. Desde Panamá llegaron a Perú, Bolivia y Chile (Figura 1).

Según Corcuera (1982), los barcos que se dirigían desde la península hacia América hacían escalas en las Islas Canarias. Dichas escalas eran utilizadas para proveerse de ganado bovino. El ganado de las islas Canarias habría sido introducido veinte años antes desde Andalucía y las islas de Cabo Verde. Estas últimas islas habrían sido pobladas con bovinos por los portugueses unos años antes, con animales provenientes tanto de la península, como de las islas Madeiras (África). Además, existen registros que confirman la existencia de expediciones que habrían introducido bovinos a América desde la región de Galicia.

Todos los animales traídos por los españoles llegaron entre 1493 y mediados del siglo XVI y habrían consistido en unos pocos cientos con una proporción de 5 ó 6 hembras por cada toro, lo que daría un tamaño efectivo de 200 animales. Se sostiene que todos los antepasados del vacuno criollo que poblaron América Latina y el sudeste de los Estados Unidos, llegaron durante los primeros cincuenta años de la colonización y totalizaban menos de mil cabezas (Wilkins, 1982).

Por lo tanto, las razas Criollas Americanas (de origen Español) derivarían directamente de los bovinos existentes en estas regiones durante fines del siglo XV y principio del XVI, cuyos descendientes actuales serían las razas ibéricas Lidia, Retinta, Negra Andaluza y Cacereña (Primo, 1992).

Simultáneamente, cuando los portugueses iniciaron la colonización de Brasil, comenzó la introducción de ganado ibérico en las costas brasileñas, tanto desde la península como desde las posesiones portuguesas en África y Asia. Las introducciones portuguesas al Brasil fueron tres: desde las islas Madeira a Bahía, por Tomé de Souza (1550); desde las islas de Cabo Verde (posesiones portuguesas en el océano Atlántico, al oeste del Senegal, África) a Pernambuco, por Duarte Coelho (1534 o 1554) y desde las islas de Cabo Verde a Sao Vicente por Ana Pimentel (1534-1538). En esa época existían en Portugal cinco razas bovinas: Alentejo, Galega, Mirandesa, Brava, Moroneza, además de la raza Turina de origen holandés (Neves, 1918).

Algunos autores consideran que el ganado desembarcado en las costas brasileñas por los portugueses habría tenido sangre Cebú, pues en el sur de la península Ibérica existían dichos animales a causa del comercio con la India. Por otra parte, se supone que los esclavos traídos del oeste de África y de la India fueron acompañados por animales domésticos, los cuales habrían contribuido al acervo genético de las razas criollas

brasileñas. Actualmente, se pueden diferenciar cinco razas criollas en el Brasil: Caracú, Mocho Nacional, Curraleiro, Pantaneiro y Criollo Lageano.

Debido a la ausencia de barreras naturales y políticas, las poblaciones descendientes de los bovinos introducidos por los portugueses se habrían mezclado, en parte, con los descendientes de los bovinos transportados por los conquistadores españoles.

Los animales introducidos en las islas del Caribe se multiplicaron rápidamente y desde allí se dispersaron en América, con tal éxito que ya en 1524 se informó sobre la existencia de bovinos en todos los países de América del Sur. De esta manera llegaron a todos los confines del continente, adaptándose rápidamente a las diversas condiciones climáticas y desarrollando aptitudes de rusticidad y fertilidad que les permitieron multiplicarse de manera asombrosa, hecho mencionado por numerosos y prestigiosos naturalistas, tales como Darwin y Félix de Azara.



Figura 1. Rutas principales de introducción de los bovinos en América por parte de los conquistadores españoles y portugueses. Además se incluyen las rutas migratorias más importantes hacia Argentina y Bolivia.

1.1.5 Razas bovinas domésticas

Usualmente, se considera a las razas domésticas como el resultado de la intervención humana mediante el empleo de distintas prácticas de selección artificial y aislamiento reproductivo.

Las diferencias encontradas en el ganado actual pueden ser parcialmente atribuidas a las variaciones genéticas que poseían los bovinos en los tiempos de domesticación, como consecuencia del aislamiento reproductivo causado por barreras geográficas naturales como el mar, montañas, etc. Esta diferenciación natural fue posteriormente complementada y acelerada por el hombre mediante la elección de ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos y de comportamiento. Sin embargo estas características, objeto de selección, no fueron las mismas con el correr de los tiempos. En principio, es probable que se hayan favorecido caracteres comportamentales, como la docilidad y facilidad de captura, continuando luego con características de tipo productivas (Clutton y Brock, 1989).

En el siglo XIX comenzaron a formarse en Europa las asociaciones de cría, las cuales se encargaron de manipular y definir las características de las razas modernas. Estas definiciones fueron realizadas en principio y en parte, sobre la base de criterios subjetivos como color de capa, forma de cuernos y origen geográfico. Este tipo de demarcación continúa hasta hoy en día en diversos países del mundo, donde continuamente se definen nuevas razas asociadas a criterios ambiguos como límites políticos, pertenencia a determinadas tribus u otros grupos étnicos, etc.

Es difícil entonces dar una definición única de "raza", que sea de utilidad a la hora de clasificar los rodeos bovinos de las diferentes regiones del mundo. Sin embargo, Mac Kechnie y Meyn (1991) establecen tres conceptos alternativos de raza bovina:

- Poblaciones de bovinos pertenecientes a un área determinada con grado variable de uniformidad.
- Expresa uniformidad en unos pocos caracteres como color de capa, forma de cabeza, forma de cuerno, caracteres de producción, etc.
- Resultado de la aplicación sistemática de distintos programas de manejo reproductivo con énfasis en caracteres de producción.

En la siguiente sección se describen brevemente las razas estudiadas en el presente trabajo (Figura 2).

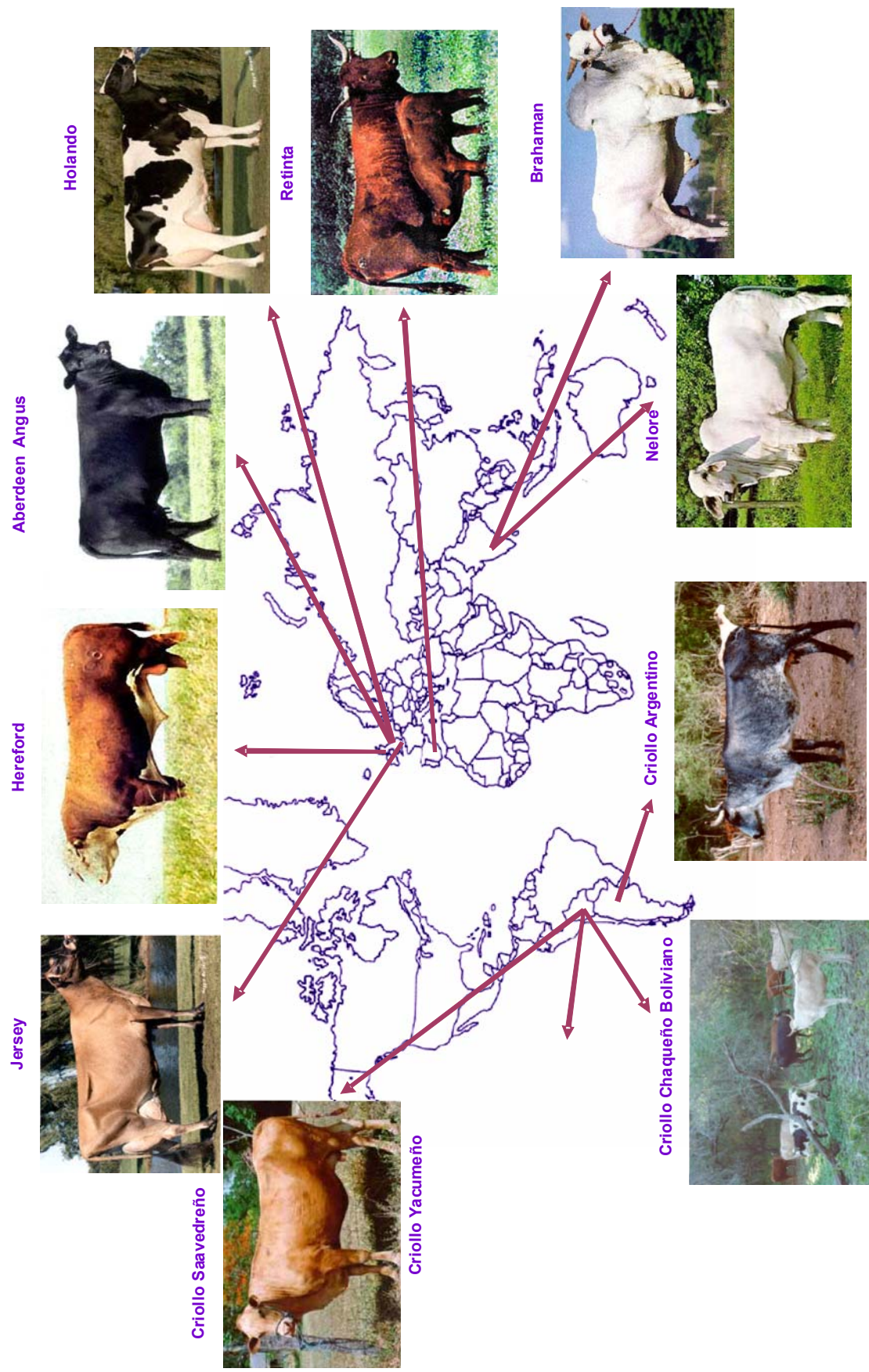


Figura 2. Origen geográfico de las razas bovinas estudiadas. Las razas Nelore y Brahman se formaron en Brasil y Estados Unidos, respectivamente a partir de animales provenientes de la India.

1.1.6 Razas de origen europeo

Aberdeen Angus

La raza Aberdeen Angus se originó a principios del siglo XVIII en el noreste de Escocia, en los condados de Aberdeen, Kincardine y Angus. Aunque poco se sabe sobre el origen del ganado vacuno primitivo que antecedió a esta raza, hay referencias escritas del año 1523 que en esa zona existía un ganado mocho, de distintos colores, entre ellos el negro y el colorado. La raza fue reconocida oficialmente en 1835, pero el registro genealógico de animales comenzó en 1862, formándose la primera asociación de cría en 1879.

La raza fue desarrollada en principio como respuesta a un incremento en la demanda de leche y carne; sin embargo hoy en día se la utiliza sólo para la producción de esta última. Se caracteriza principalmente por la falta de cuernos y un pelaje de color negro o colorado. Este último color se debe a la presencia de un gen en estado recesivo, lo que facilita el mantenimiento del ganado uniforme para este color.

Carlos Guerrero la importó por primera vez al país en 1879, abriéndose el libro de registro argentino en 1901. Desde sus inicios, se ha difundido ampliamente en todo el país, siendo la raza más abundante, dada su rusticidad y adaptabilidad a climas rigurosos.

Hereford

La raza fue originada en Herefordshire, región que limita con el condado de Hereford en el sur de Inglaterra. Se cree, que esta raza proviene de la cruce de animales de pelaje colorado de esta región con los antiguos bovinos blancos de Gales. A mediados del siglo XVIII, unos pocos ganaderos, comenzaron el mejoramiento de este ganado buscando primordialmente un mejor rendimiento en la producción de carne. En 1846, fue establecido el primer libro genealógico y posteriormente en 1876 se originó la asociación de criadores de esta raza. Siete años después, se cerró el registro a todos los animales cuyos progenitores no estuviesen previamente inscriptos.

Los animales de la raza Hereford son colorados con la cara y vientre blancos, generalmente poseen pequeños cuernos de color amarillo aunque existen algunos representantes sin cuernos. La carne es de buena calidad, pero es el ganado británico con menor producción de leche.

La primera importación en Argentina la realizó, en 1860, Leonardo Pereyra con el toro Niágara. Posteriores importaciones realizadas por Pereyra y otros cabañeros afianzaron

la raza en el país. En 1888 la Sociedad Rural Argentina (SRA) abre el libro de registros de la raza. El Hereford está ampliamente difundido en toda la zona ganadera del país.

Holando Argentino

Estos ejemplares provenían de los Países Bajos, más específicamente de las actuales provincias de Frisia y Holanda del Norte. En estas regiones, hace 2000 años, ya existía un ganado de producción láctea superior a lo normal de esa época. Después de la caída del Imperio Romano, pueblos de pastores, empujados por los bárbaros invasores del oeste, lo llevaron a la zona de la actual Holanda. Algunos autores proponen que estos animales se habrían originado de una variedad de *Uro* denominada *Bos primigenius hollandicus* (Inchausti y Tagle, 1980).

Al principio este ganado fue explotado con doble propósito, leche y carne. Luego se lo utilizó solamente para producción láctea. Se caracterizan por su tamaño relativamente mediano, aspecto anguloso, ubre desarrollada, pelaje overo negro bien definido, con manchas negras repartidas en el cuerpo y extremidades blancas y cuernos medianos. Es la raza lechera que tiene el menor porcentaje de grasa, pero la mayor producción total.

Los primeros animales pertenecientes a esta raza fueron introducidos a nuestro país en 1883, por el entonces presidente de la Nación Julio Argentino Roca. En la actualidad, el ganado Holando Argentino constituye la raza productora de leche más importante en nuestro país.

Jersey

La raza Jersey se originó en la isla de Jersey, una pequeña isla británica ubicada en el canal de La Mancha frente a las costas de Francia. Es una de las razas lecheras más antiguas y permanece aislada desde 1734, donde se prohibió mediante un acta de estado la importación de animales en la isla. Antiguamente todas las razas de las islas del canal eran conocidas como Alderney, hasta que en 1833 se forma la Asociación de Agricultura y Horticultura de Jersey, la cual determinó formalmente el inicio de la raza. Sin embargo, el libro genealógico se formó recién en 1866.

En relación a su tamaño es una excelente productora de leche y se destaca por la elevada concentración de grasa butirométrica. Posee un esqueleto fino y delgado con cuernos cortos y puntas negras. El color de capa es variable desde el gris hasta el marrón oscuro, predominando en nuestro país el bayo arratonado. Alrededor del morro poseen característicamente un aro de pelo blanco, lo mismo que en el contorno de los ojos. Tiene facilidad al parto y da terneros de poco peso al nacimiento. Por ello se está empleando en el primer servicio de vaquillonas Holando Argentino y de razas de carne.

Retinta

La raza Retinta es la más numerosa en España, concentrada especialmente en Andalucía y Extremadura, lugar donde se habría originado. Derivaría del *Bos primigenius*, hallado en Egipto, extendiéndose por el sur de la península Ibérica en sucesivas migraciones procedentes del norte de África. En sus comienzos la raza se explotó como animal de trabajo, y desde principios de siglo se comenzó a seleccionar con fines de producción de carne.

Posee un pelaje de color rojo que varía desde un oscuro (retinta) a un claro (colorada y rubia). Es una raza rústica, adaptada a serranías y climas áridos. Se caracteriza además, por su longevidad y facilidad de parto.

Algunos autores consideran la raza Retinta, entre otras, como representante actual de los bovinos de origen español que habrían contribuido al origen de las razas criollas Americanas (Primo, 1992).

1.1.7 Razas de origen indico

Nelore

La raza Nelore es un representante del ganado tipo *Bos indicus*, y descende de la raza Ongole que se habría originado en la provincia de Madrás, en el oeste de la India. La historia del ganado Ongole data desde antes de la era cristiana, hace más de 2000 años. Es en Brasil, donde comienza a popularizarse el nombre Nelore como sinónimo de Ongole.

La importación de Nelore en dicho país comenzó en 1868, con dos animales desembarcados en Salvador de Bahía. La creación del libro de registro se produce en el año 1938 en Uberaba, siendo de gran importancia en la formación de la raza. La última introducción de animales autorizada por el gobierno brasileño se realizó en 1962. Si bien algunas hembras fueron incluidas en los envíos, la gran mayoría de los animales fueron machos. Éstos fueron cruzados con hembras de razas taurinas nativas, principalmente criollas. La contribución de razas taurinas en la formación del Nelore, se manifiesta en el polimorfismo genético a nivel del ADNmt descrito por Meirelles y colaboradores (1999), donde un 79% de los haplotipos mitocondriales estudiados poseían un origen taurino.

Entre las características principales del Nelore se destacan su rusticidad, gran adaptación a condiciones extremas en medios tropicales y la habilidad para nutrirse de pastos groseros y poco abundantes. Poseen cuernos cortos, gruesos y puntiagudos, aunque existe la variedad mocha. El pelaje varía desde el blanco hasta el gris y negro. Poseen temperamento activo, pero carácter tranquilo y un marcado instinto gregario.

Desde principios de siglo, dada la vecindad con Brasil y Paraguay, se han introducido en el norte argentino ejemplares de esta raza. En 1943, en sucesivas importaciones desde Brasil, se incorpora en cantidad y se difunde como raza pura o en cruas por buena parte del territorio argentino, especialmente en Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, norte de Santa Fe, Salta, Jujuy, Santiago del Estero y Tucumán.

Brahman

A partir de 1848 comienza a introducirse ganado cebú en Estados Unidos, procedente primero de la India, luego de Brasil y algo de Sudáfrica. Se importaron las razas Nelore, Guzará y Gir entre otras. Este conjunto de razas cebuinas se amalgaman con la designación genérica de Brahman, que luego fue aceptada oficialmente por el Departamento de Agricultura. En los registros que se abrieron se permitió también el ingreso de animales que, habiendo tenido sangre británica, fueron continuamente servidos por toros importados y eran no menos de 15/16 sangre cebú. Los registros genealógicos en Estados Unidos permanecen abiertos y continuamente se incorporan sangres nuevas.

El ganado Brahman posee un gran desarrollo muscular, especialmente en los cuartos posteriores. Se diferencian de los Nelore por poseer orejas grandes y pendulosas. El color del pelaje varia desde el blanco al gris oscuro, casi negro. Es una raza rústica y con gran adaptación a zonas tropicales, aunque no tan tolerable a climas extremos como el Nelore. Posee variedades mochas que se inscriben en registros separados como *Polled Brahman*.

En Argentina se importa por primera vez en 1941, desde Estados Unidos. Como el libro es abierto, se han realizado cruas absorbentes con ganado taurino, considerándose luego de cuatro generaciones como ganado Brahman.

1.1.8 Razas criollas americanas

Criolla Argentina

Definimos al bovino Criollo Argentino como un descendiente puro y directo de los vacunos que trajeron los conquistadores en la época de la colonización americana. En la evolución del ganado criollo suelen establecerse tres etapas: la primera es la anterior al virreinato y se inició con la introducción de los primeros planteles seguida por su gran

proliferación. La segunda, se extendió hasta la introducción del alambrado y la modernización del país sufrida a fines del siglo XIX y la tercera se extiende hasta la fecha.

Paraguay fue el principal centro de dispersión; desde Asunción, así como desde distintos lugares del Alto Perú y Chile, el ganado se fue propagando a través del territorio argentino (Gilberti, 1961).

A causa de las buenas condiciones ecológicas los bovinos pudieron multiplicarse rápidamente, especialmente en las praderas de la región pampeana, la mesopotamia y la Banda Oriental. Tan sorprendente fue la adaptación y proliferación de la especies domésticas introducidas, que estos fenómenos fueron mencionados por prestigiosos naturalistas, tales como Charles Darwin y Félix de Azara.

Como consecuencia de la introducción durante el siglo XIX de bovinos de razas europeas, el ganado bovino Criollo Argentino fue desplazado hacia zonas marginales, especialmente al noroeste argentino (NOA), en donde el calor, las enfermedades y el monte obstaculizaron el avance de las razas europeas. De esa manera, el ganado Criollo Argentino tuvo en el NOA un santuario casi inviolable, hasta que en el presente siglo comenzó a difundirse masivamente la cría de de las razas índicas y sus derivados.

Actualmente la población de bovinos criollos es de unas 300.000 cabezas, siendo el NOA el lugar donde está el relicto más importante con aproximadamente 200.000 individuos. Además, se encuentran rodeos de ganado bovino Criollo Argentino distribuidos en gran parte del territorio nacional. Estos animales están actualmente divididos en miles de pequeños rodeos aislados entre sí. El tamaño de los grupos varía entre unos pocos animales hasta algunos cientos de cabezas.

El Criollo Argentino presenta todos los colores de capa descriptos para la especie (negro, blanco, colorado, bayo, chispeado, salpicado, porotillo, yaguané, overo, panza blanca, etc.) (Rabasa *et al.*, 1977). Un alto porcentaje de individuos presentan pigmentación en las mucosas externas (hocico, región palpebral y perianal) y en las pezuñas. La presencia de cuernos de tonalidad blanca o blanco amarillenta en la base con la punta negra es característica de la raza.

Los toros son menos agresivos y poseen una mayor actividad en el servicio que los británicos. Debido a la conformación de la pelvis (canal de parto alto) y a las características del ternero (flaco y largo), no presentan distocia. Otras características corresponden a la adaptación a climas rigurosos, dietas forrajeras ricas en fibras, tolerancia a los ectoparásitos, fertilidad de sus rodeos y longevidad de sus vacas.

Criolla Chaqueña Boliviana

Actualmente, pueden diferenciarse cuatro razas bolivianas de bovinos criollos: Saavedreña (Departamento de Santa Cruz de la Sierra), Yacumeño (Departamento del Beni), Criollo del Altiplano (Departamento de Oruro) y Criollo Chaqueño (Departamento de Chuquisaca). Las razas mencionadas corresponden a cuatro estados provinciales de Bolivia que se corresponden a cuatro regiones biogeográficas diferentes: llanura subtropical, llanos tropicales, altiplano y chaco, respectivamente.

Esta raza se hallaba, en otras épocas, ampliamente distribuida en el monte espinoso semiárido del chaco. Actualmente, dicho ganado se encuentra principalmente ubicado en la Estación Experimental del Chaco El Salvador (Boyube, departamento de Chuquisaca), con un tamaño poblacional de aproximadamente 1200 animales, y en establecimientos privados de la región.

Al igual que el Criollo Argentino, presenta todos los colores de capa descritos para la especie. Las características fenotípicas son en general similares a las mencionadas anteriormente para la raza Criolla Argentina.

Criolla Saavedreña

En la década del setenta, se estableció la estación Experimental de Saavedra (Santa Cruz de la Sierra, Bolivia), para seleccionar ganado bovino Criollo lechero. El plantel fundador se formó a partir de animales pertenecientes a las razas Criolla Yacumeña (región de El Beni, Bolivia), Criolla Chaqueña (Chaco boliviano), Caracú lechero (Mina Gerais, Brasil), Criolla Nicaragüense y Criolla Cubana.

Como consecuencia de más de 25 años de selección, se logró obtener ganado criollo que produce, en climas tropicales húmedos, más de 1000 litros de leche en la primera lactancia, sin desmedro de los altos niveles de fertilidad característicos de los bovinos criollos.

La población censada en 1992 fue de 920 animales. El color de capa es uniforme, variando entre castaño y colorado. Los animales son registrados en la Asociación Boliviana de Criadores.

Criolla Yacumeña

Durante el siglo XVI fueron introducidos siguiendo el curso del río Beni (noreste de Bolivia), criollos de origen español provenientes del Paraguay y criollos de origen portugués provenientes del Brasil, los que dieron origen al bovino Criollo del Beni. Esta raza fue mantenida pura hasta el siglo XX. Más tarde el desarrollo de las comunicaciones abrió nuevos mercados para la carne, lo que trajo como consecuencia la cruce de los bovinos del Beni con animales cebuinos para aumentar la calidad y cantidad de carne producida. Este hecho produjo la casi extinción de esta raza.

La raza Criolla Yacumeña fue seleccionada durante 25 años para producción de carne y actualmente es criada cerca del río Yacuma en el Beni. Los animales poseen colores de capa que van desde el colorado al marrón.

1.2. Polimorfismos

1.2.1. Historia de los polimorfismos

Las definiciones propuestas acerca del concepto de polimorfismo han sido muy variadas y entre ellas se destaca la de Ford (1965): "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". Para Cavalli - Sforza y Bodner (1981), "El polimorfismo bioquímico - genético es la existencia en una misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia apreciable". Según Lucotte (1977), se puede considerar un determinado locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0,99. Esta definición es arbitraria, y no hay razón para distinguir entre loci polimórficos y monomórficos a frecuencias de 0,95, 0.995 o valores similares. Además, en la práctica este valor puede variar dependiendo del tamaño de la muestra. Por ejemplo, en muestras de menos de 50 individuos de una población, alelos con frecuencias menores a $1/2N$ pueden no estar representados.

El estudio de los polimorfismos intra e interpoblacionales ha sido realizado por medio de diferentes metodologías, con el fin de evaluar la estructura genética y distancia genética, el flujo génico, la deriva, así como también, la historia evolutiva de las especies y poblaciones. A continuación se describen brevemente los principales tipos de marcadores moleculares que se han utilizado en genética de poblaciones, evolutiva y forense.

Polimorfismos bioquímicos

Lucotte (1977) distingue tres tipos de polimorfismos bioquímicos: los grupos sanguíneos (revelados mediante técnicas serológicas); los sistemas de histocompatibilidad (puestos de manifiesto por reacciones inmunitarias); y los polimorfismos bioquímicos propiamente dichos (identificados mediante técnicas electroforéticas).

El primer estudio sobre polimorfismos genéticos fue llevado a cabo por Landsteiner en el año 1901, quien describió la variabilidad presente en los grupos sanguíneos humanos. Así, por primera vez los individuos se podían agrupar en base a un criterio objetivo y se acuñó el término de marcadores genéticos, definido sencillamente como caracteres heredables con múltiples estados (alelos) en cada carácter (locus). A pesar de que los trabajos sobre polimorfismos genéticos comenzaron a principios del siglo XX, fue recién en la década del sesenta que los estudios basados en marcadores genéticos se hicieron sistemáticos. Varios autores desarrollaron el método de electroforesis en almidón, lo que permitió estudiar las distintas formas (electromorfos) que presenta una proteína dada (Smithies, 1955); Lewontin y Hubby, 1966; Harris 1966). Esta simple técnica revolucionó el estudio de la sistemática, la sociobiología, la evolución, la genética de poblaciones, etc. Combinando la electroforesis con métodos de tinción histoquímicos, Hunter y Market (1957) desarrollaron la técnica de zimograma para identificar enzimas en extractos de tejidos.

Durante la década de 1970 comienza la caracterización del genoma bovino por métodos inmunogenéticos (Bensaid *et al.*, 1989) o bioquímicos (Tabel *et al.*, 1990; Andersson - Eklund *et al.*, 1991; Irvin *et al.*, 1992). Los primeros estudios de caracterización genética y de índole genético-poblacional en animales domésticos se realizaron mediante el análisis de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos (Baker y Manwell, 1980; Manwell y Baker, 1980).

En el ganado bovino se han descripto polimorfismos bioquímicos a nivel de diversos órganos, tejidos y líquidos orgánicos como leche, plasma seminal y principalmente sangre. Esta última constituye el fluido orgánico analizado con mayor frecuencia, debido principalmente a su accesibilidad y al elevado nivel de polimorfismos detectados en las enzimas y otras proteínas sanguíneas.

Durante varias décadas en las razas bovinas se han estudiado, los polimorfismos bioquímicos y los grupos sanguíneos con el fin de detectar las diferencias y similitudes entre las razas y analizar la variación genética dentro y entre poblaciones. Dichos estudios se han llevado a cabo en gran escala, analizando poblaciones de diferentes regiones del mundo (Braend, 1972; Baker y Manwell, 1980; Manwell y Baker, 1980; Medjugorac *et al.*, 1994). Asimismo, se han realizado estudios a nivel regional utilizando poblaciones estrechamente relacionadas (Kidd y Pirchner, 1971; Kidd y Cavalli-Sforza, 1974; Kidd *et al.*, 1980; Astolfi *et*

al., 1983; Arranz Santos, 1994; Arranz Santos, 1996). Una de las principales conclusiones de estos estudios consistió en la demostración de una extensa divergencia a nivel proteico entre el ganado de tipo taurino y tipo cebuino (Braend, 1972; Manwell y Baker, 1980; Von Graml, 1986). Por otra parte, estos datos permitieron construir árboles filogenéticos y superponerlos con mapas geográficos para de esta manera desarrollar teorías biogeográficas sobre el origen de las razas bovinas.

Los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos en cuanto a su aplicación en genética de poblaciones y en la identificación individual poseen algunas desventajas (Giovambattista *et al.*, 1997):

- Se limitan a la observación de polimorfismos a nivel fenotípico, ya que se tipifican proteínas, las cuales corresponden a loci estructurales que abarcan aproximadamente el 5% del genoma.
- Poseen relativamente baja variabilidad, debido fundamentalmente a la función que cumplen las proteínas. En identificación individual, se consideran pruebas de exclusión (donde se descarta o excluye pero no se puede confirmar una paternidad discutida).
- Las muestras tienen que ser frescas ya que las proteínas se deterioran con facilidad.
- En el caso de los grupos sanguíneos es necesario mantener rodeos de animales para la producción de antisueros.

Polimorfismos de ADN

La primera técnica para estimar diferencias a nivel de ADN se desarrolló en la década del '60 (Britten y Kohne, 1968). Esta técnica, conocida como hibridación ADN-ADN, se basa en las propiedades termodinámicas de reasociación de las cadenas simples de ADN, y se aplicó en estudios de sistemática y de evolución molecular (Sibley y Ahlquist, 1990; Avise, 1994).

En la década de los '80, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante no solo complementó las técnicas inmunogenéticas y de polimorfismos bioquímicos (Bensaid *et al.*, 1989; Tabel *et al.*, 1990; Andersson - Eklund *et al.*, 1991) sino que permitió en los últimos años grandes avances en la cartografía y caracterización de un gran número de genomas (Fries *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1997). La utilización de dichas técnicas es de gran utilidad tanto para la caracterización de razas y determinación de parentesco como para el estudio de enfermedades genéticas y polimorfismos asociados a caracteres de producción (Shuster *et al.*, 1992; Georges *et al.*,

1993; Glowatzki-Mullis *et al.*, 1995; Usha *et al.*, 1995; Charlier *et al.*, 1996; Grobet *et al.*, 1997; Jamieson y Taylor, 1997).

El descubrimiento de las enzimas de restricción, proteínas bacterianas que digieren al ADN de doble cadena al reconocer un determinado motivo (Meselson y Yuan, 1968), posibilitó el estudio a nivel poblacional de los polimorfismos a nivel del ADN. Inicialmente, los trabajos se basaron en la utilización de la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y *Southern blot*, cuyo fundamento es la detección de sitios de restricción (presencia o ausencia) mediante la utilización de una sonda (Botstein *et al.*, 1980; Haberfeld *et al.*, 1993; Trommelen *et al.*, 1993). Estas variaciones se deben a cambios moleculares como delecciones, inversiones, cambios de bases, o reordenamientos. Cualquiera de estos eventos puede crear, eliminar o translocar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Por lo tanto, con la sonda adecuada pueden detectarse las diferentes variantes en base a la longitud y al número de fragmentos de restricción (Theilmann *et al.*, 1989; Damian *et al.*, 1990; Ferreti *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1990; Barenese *et al.*, 1991; Sigurardottir *et al.*, 1990; 1991). Estos cambios pueden suceder tanto en regiones codificantes como no codificantes, por lo que aportan un mayor grado de información y amplían los límites de los estudios.

El descubrimiento de secuencias repetidas heterodispersas en el genoma (Gerbi, 1975; Richardson *et al.*, 1986; Gerard *et al.*, 1990; Lenstra *et al.*, 1993) permitió el desarrollo de sondas capaces de hibridar con secuencias altamente repetidas del ADN denominadas minisatélites. Dichas secuencias tienen una longitud de 0,1 a 2 Kb y se caracterizan por estar constituidas por una unidad de repetición de entre 9 y 24 pb que se repite un número variable de veces. El uso de sondas correspondientes a secuencias repetidas de este tipo posibilitó el desarrollo de la técnica de *fingerprinting*, la que permite estudiar simultáneamente distintos sectores del genoma (Jeffreys *et al.*, 1985a; 1985b; 1991; Kirby, 1990). Teniendo en cuenta que la unidad de repetición se localiza en diferentes loci del genoma, la sonda se comporta como un marcador multilocus. Sin embargo, en condiciones estrictas de hibridación se pueden utilizar como sondas para locus simple.

Esta metodología permitió por primera vez contar con una prueba de inclusión, donde se puede afirmar la paternidad discutida, debido a que las secuencias analizadas son altamente polimórficas. Por otra parte, el gran número y tipos de minisatélites presentes en el genoma hacen que no haya limitaciones en cuanto a la cantidad de marcadores que potencialmente podrían utilizarse. Estas virtudes, permitieron pensar que ya se contaba con la herramienta que reemplazaría a los polimorfismos bioquímicos y los grupos sanguíneos en la identificación individual (Georges *et al.*, 1988; 1990; Kirby, 1990; Haberfeld *et al.*, 1991; Dolf *et al.*, 1992; Mannen *et al.*, 1993). Sin embargo, una serie de limitaciones hacen que,

por lo menos en animales domésticos, no se haya cumplido con las expectativas. Las principales dificultades para su aplicación son (Giovambattista *et al.*, 1997; Sunnucks, 2000):

- Se necesita ADN de alto peso molecular.
- La técnica es laboriosa, tiene baja repetibilidad, demanda mucho tiempo de realización y es de difícil automatización en el laboratorio.
- En el caso de las sondas multilocus, no pueden ser identificados los loci individualmente, sino que se trabaja con un conjunto de bandas o fragmentos.

Debido a estos inconvenientes metodológicos y analíticos sumados al hecho que los datos son de limitada comparación entre estudios, son escasos los trabajos poblacionales realizados en animales domésticos (Botstein *et al.*, 1980; Haberfeld *et al.*, 1993; Trommelen *et al.*, 1993).

En 1986, el desarrollo del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha simplificado y revolucionado los estudios genéticos poblacionales debido a que puede analizarse un gran número de individuos en forma fácil y económica (Mullis *et al.*, 1986; Erlich, 1989; Innis *et al.*, 1990). Esta técnica 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). Como resultado de 25 ciclos de amplificación se obtienen aproximadamente un millón de copias del fragmento deseado por cada secuencia inicial.

La técnica de PCR es una herramienta útil para el estudio de la variación genética en poblaciones naturales o domésticas. Dado que dicha metodología puede realizarse a partir de poca cantidad de ADN y que es poco exigente en cuanto a la calidad de la muestra, puede aplicarse tanto a muestras frescas como a colecciones de museo (Herrmann y Hummel, 1994). Estas características permiten el estudio de la diversidad genética de las poblaciones a lo largo del tiempo (Kirby, 1990; Westemeier *et al.*, 1998; McHugh *et al.*, 1999; Bouzat *et al.*, 1998).

Las técnicas de ADN, no sólo se han aplicado al estudio de loci autosómicos, sino también resultan de gran utilidad para el estudio de ADN no nuclear como el ADN mitocondrial (Ron *et al.*, 1992; 1993; Suzuki *et al.*, 1993; Loftus *et al.*, 1994a; 1994b; Cymbron *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999; Meirelles *et al.*, 1999) y para el análisis de los polimorfismos del cromosoma Y (Bradley *et al.*, 1994; Gwaisa *et al.*, 1994; Kemp *et al.*, 1994; Teale *et al.*, 1995; Hanotte *et al.*, 1997; 1998; Nijman *et al.*, 1999). El ADN mitocondrial, y en particular el segmento de la región control *D-loop*, tiene una alta tasa de evolución, presentando un alto poder de resolución para estudios microevolutivos. Además, no sufre recombinación y se hereda únicamente por línea materna. El desarrollo de

marcadores mitocondriales y holándricos ha permitido estudiar linajes maternos y paternos respectivamente, así como también evaluar el grado de introgresión génica, identificar los centros de domesticación y estimar el tiempo de divergencia entre los bovinos taurinos y cebuinos.

La gran versatilidad de la técnica de PCR permitió el desarrollo de diferentes variantes de esta metodología. El método de PCR-RFLP *-Restriction Fragment Length Polymorphism-* se basa en la detección de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción en la secuencia del genoma amplificada mediante PCR (Damiani *et al.*, 1990; Denicourt *et al.*, 1990; Pinder *et al.*, 1991). No todos los fragmentos de ADN, incluyen dianas de restricción polimórficas, por lo que éstas pueden ser creadas a través del método PCR-ACRS *-Amplification Created Restriction Site -* (Park *et al.*, 1995), permitiendo de esta manera la discriminación de las distintas variantes alélicas mediante RFLP. Otro método de análisis es el denominado AS-PCR *-Allele Specific-* (David y Deuch, 1992), el que se basa en la utilización de cebadores específicos para cada alelo. La técnica PCR-ASO *-Allele Specific Oligonucleotide-* permite la discriminación de las variantes mediante la hibridación del fragmento amplificado con sondas específicas de alelos (Jadot *et al.*, 1992). La denominado PCR-SSCP *-Simple Strand Conformational Polymorphisms-*, se emplea para detectar variaciones puntuales sobre la base de las diferencias en la conformación de las cadenas únicas del ADN (Hart *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1993; Niebergs *et al.*, 1993). Finalmente, cabe mencionar que el método de PCR ha sido utilizado satisfactoriamente para la secuenciación directa (Damiani *et al.*, 1992).

En los últimos años, otra técnica desarrollada para el análisis de variación genética es la amplificación al azar de secuencias de ADN *-Random Amplification Polymorphism DNA, RAPD-* (Williams *et al.*, 1990). Esta metodología consiste en la amplificación al azar de secuencias arbitrarias del genoma utilizando pequeños cebadores de aproximadamente 10 pb. Este método genera polimorfismos de tipo dominancia-recesividad, y suele ser criticado por la falta de repetibilidad entre distintos laboratorios (Hedrick, 1992). Sin embargo, es una técnica de mucha utilidad en la evaluación de poblaciones naturales de animales y vegetales, donde no se cuenta con los datos de secuencias de ADN necesarios para el diseño de los cebadores.

El uso de la técnica de PCR no sólo se limitó al análisis de genes estructurales, sino que también permitió la amplificación de secuencias repetidas del tipo microsatélites *-short tandem repeat, STR-* (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Estas secuencias consisten en repeticiones en tandem de motivos de entre uno y seis nucleótidos. En el caso de estos loci, la diferencia entre los alelos está dada por variaciones en el número de repeticiones. Como los microsatélites son los marcadores genéticos utilizados en la presente tesis, serán descritos con más detalle en la sección 2.4.

1.2.2 Antecedentes en el estudio de los polimorfismos genéticos en razas bovinas criollas latinoamericanas

Los primeros estudios de caracterización del ganado bovino criollo sudamericano se realizaron mediante marcadores fenotípicos, como por ejemplo color de capa, grado de pigmentación del hocico, etc. (Rabasa *et al.*, 1977; Sal Paz, 1986).

En la década del setenta comienza la descripción de los polimorfismos de los grupos sanguíneos en el ganado bovino Criollo Argentino a través de métodos inmunogenéticos (Quinteros *et al.*, 1973; 1981; 1983). Posteriormente, se continuó la caracterización de esta raza mediante el uso de técnicas electroforéticas de proteínas sanguíneas y de la leche (Fernandez *et al.*, 1986; Poli, 1986; Poli y Antonini, 1992).

En 1995, comienzan los estudios sobre variabilidad genética a nivel del ADN en la raza Criolla Argentina (Giovambattista *et al.*, 1995; 1996; 1996b; Golijow, 1996; 1996b; Bouzat *et al.*, 1998). Estos estudios incluyeron el análisis de la variabilidad presente en los loci de algunas proteínas de la leche (α_{S1} -caseína, β -caseína), de la prolactina y del gen de clase II de histocompatibilidad *BoLA-DRB3*. Por otra parte, De Luca y colaboradores (1997) estudiaron el polimorfismo de la morfología del cromosoma Y en la raza antes mencionada.

Cabe mencionar que, en menor medida, otras razas de bovinos criollos americanos han sido estudiadas a través de marcadores genéticos. Así por ejemplo, se analizaron los grupos sanguíneos en razas de Brasil y Uruguay, microsatélites en razas colombianas y bolivianas, y genes estructurales a nivel de ADN en razas criollas de Brasil, Uruguay y Bolivia (Postiglioni *et al.*, 1998, 2002; Moreno Osorio, 1998; Carvajal-Carmona, 1998; Miretti *et al.*, 1998; Kemenes *et al.*, 1999; Lirón, 2002; Rípoli, 2002). Estudios de este tipo también se llevaron a cabo en razas cebuinas criadas en América. Así por ejemplo, se analizaron los polimorfismos presentes en el ADN mitocondrial y en los loci (α_{S1} -caseína, β -lactoglobulina) y hormona de crecimiento (Del Lama y Zago, 1996; Kemenes *et al.*, 1999; Meirelles *et al.*, 1999).

Estudios recientes basados en la región *D-loop* del ADN mitocondrial en varias razas Criollas americanas de Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia e islas del Caribe han revelado la existencia de haplotipos característicos de *Bos taurus* africanos (Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Carvajal-Carmona, 2003; Mirol *et al.*, 2003).

1.2.3 Microsatélites

Los microsatélites se definen como repeticiones en tandem de secuencias de ADN de 1-6 pb. A lo largo del tiempo, este tipo de secuencias repetidas han recibido varias denominaciones como:

- STR, *short tandem repeats* (Edwards *et al.*, 1991).
- VNTR, *variable number of tandem repeats* (Nakamura *et al.*, 1987). El término fue introducido inicialmente por Nakamura para los minisatélites (secuencias repetidas en tandem pero con unidades de repetición mayores a 10 pb), aunque luego se aplicó indistintamente a ambos tipos de arreglos.
- Secuencias simples, *simple sequences* (Tautz, 1986). Denominación que incluye todas las secuencias formadas por repeticiones cortas, como los minisatélites, los microsatélites y las secuencias crípticas (secuencias compuestas de unas pocas unidades repetidas interrumpidas en su extensión por otros nucleótidos).

Los STRs se detectaron inicialmente en los genomas eucariotas a comienzos de los ochenta (Hamada *et al.*, 1982; Tautz y Renz, 1984). Aunque al principio se consideraron como secuencias de poco interés, no fue hasta el fin de esa década donde gracias al desarrollo del PCR se convierten en uno de los marcadores genéticos más valiosos encontrados hasta estos tiempos (Lit y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Los microsatélites se han utilizado ampliamente como marcadores moleculares en programas de mapeo genético, en estudios de biología de poblaciones y evolución, en genética forense y se han asociado a diversas enfermedades.

El avance realizado en los proyectos de secuenciación y caracterización del genoma de varios organismos: numerosas bacterias, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), nematodo (*Caenorhabditis elegans*), mosca (*Drosophila melanogaster*), ratón (*Mus musculus*), y humano (*Homo sapiens*) entre otros, ha permitido un estudio sistemático de la distribución de microsatélites a lo largo de sus genomas (Buldyrev *et al.*, 1995; Bell y Jurka, 1997; Bachtrog *et al.*, 1999; Dokloyan *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2002).

La comparación de los microsatélites presentes en diversos taxones revela una extensa divergencia en cuanto a la cantidad y al tipo de secuencias repetidas (Hancock *et al.*, 2002). Se han formulado diversas hipótesis sobre el origen de tales diferencias, entre ellas se puede mencionar a la selección natural, la deriva genética, variaciones en los mecanismos bioquímicos que producen mutaciones, sistemas de reparación, etc. Así por ejemplo, las bacterias patógenas presentan una mayor diversidad de secuencias repetidas que los eucariotas, lo que se ha atribuido a un posible mecanismo generador de variabilidad en los genes que codifican proteínas de superficie como respuesta al sistema inmunológico de sus huéspedes (Moxon *et al.*, 1994; Sauders *et al.*, 2000). Igualmente, un aumento relativo en la cantidad de microsatélites se ha observado en dos eucariotas patógenos, *Leishmania major* y *Plasmodium falciparum*. En el genoma del ratón se ha encontrado una mayor cantidad y número de repeticiones en tandem de la secuencia CAG que en el

humano (Hancock *et al.*, 2001), asignándose dicha variación a una relativa ineficiencia en los mecanismos de reparación (Hart y Setlow, 1974). En *D. melanogaster* se ha descrito la existencia de extensivas repeticiones del aminoácido glutamina (Albá *et al.*, 2001), sugiriéndose mecanismos especiales que intervendrían en su mantenimiento dado que se ha observado en esta especie una tasa reducida de *slippage* (Schug *et al.*, 1997).

La distribución de los microsatélites en el genoma humano y del ratón es bien conocida debido a su extensa aplicación en la construcción de mapas de ligamiento y mapeo de genes, observándose a gran escala una distribución al azar de las secuencias repetidas a lo largo del genoma (Dib *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1996). Sin embargo, mapeos de alta resolución revelan algunas regiones poco representadas y otras con alta densidad. Así por ejemplo, se ha descrito que las regiones teloméricas poseen en promedio una mayor cantidad de STRs (Dib *et al.*, 1996). Contrariamente, se ha sugerido que el cromosoma X tendría una baja densidad con respecto a los autosomas (Dietrich *et al.*, 1996; Jarne *et al.*, 1998). Bachtrog y colaboradores (1999) detectaron una gran variación en la densidad de repeticiones de dinucleótidos entre diferentes regiones del genoma de *D. melanogaster*. Además, y opuesto a lo hallado en mamíferos, reportaron una mayor densidad de secuencias repetidas en el cromosoma X.

A un nivel de análisis más detallado, los microsatélites son raros en las regiones codificantes, y en especial aquellos que no están constituidos por repeticiones de trinucleótidos (Hancock, 1995; Dokholyan *et al.*, 2000). Esto último se debería a que las mutaciones en las secuencias repetidas de di o tetranucleótidos dentro de los genes producen corrimientos en el marco de lectura, como se ha visto en muchas enfermedades de origen genético (Cooper y Krawczak, 1993). Aunque se han propuesto varias hipótesis, aún es poco lo que se conoce acerca de los factores que intervienen en el origen y distribución de los STRs en las regiones no codificantes del genoma.

La tasa de mutación de secuencias no repetidas en el genoma de los eucariotas es aproximadamente 10^{-9} por nucleótido por generación. Sin embargo, los microsatélites mutan a una frecuencia varios órdenes de magnitud superior, siendo de tasa de mutación entre 10^{-3} a 10^{-4} por locus por generación. Sin embargo, existen variaciones entre las distintas especies analizadas (Ellegren, 1993). Por ejemplo, la tasa media de mutación en *D. melanogaster* es notablemente inferior -6×10^{-6} a 9×10^{-6} (Schug *et al.*, 1998). Se desconoce la causa de esta variación entre especies.

Debido a sus características, los microsatélites rápidamente se convirtieron en los marcadores de elección por la comunidad científica para la construcción de mapas de ligamiento en varias especies. En 1992, aparecen publicados los primeros mapas de ligamiento de alta densidad de humanos y ratón (Weissembach *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1992). A comienzos de la década de los noventa, se inician los primeros estudios

moleculares intensivos del genoma bovino. En 1992, se establece en Europa el Proyecto de Mapeo del Genoma Bovino (*BovMap*). Desde aquellos tiempos, se ha producido un gran avance en el conocimiento de la organización del genoma bovino y el mapa genético se ha convertido en una poderosa herramienta en la identificación de genes que juegan un rol importante en la determinación de caracteres cuantitativos de interés productivo -QTLs- (Switonsky, 2002). Con esta información, los valores de cría pueden ser incrementados mediante la tipificación de QTLs conocidos o de marcadores genéticos fuertemente ligados a estos últimos. Al presente, se conoce la ubicación de mas de 3800 loci en el mapa genómico bovino (<http://locus.jouy.inra.fr>). La densidad del mapa se estima como la distancia promedio entre dos loci vecinos, y es actualmente de 2,5 cM (Kappes *et al.*, 1997).

Mecanismos de mutación

Se han formulado dos modelos alternativos aunque no excluyentes que explican los procesos bioquímicos que conducen al origen de la extensa variabilidad existente en los microsatélites. El primero de ellos propone que la inestabilidad de los microsatélites se produce por una tasa elevada de entrecruzamiento desigual, causado por una alineación imperfecta de los cromosomas homólogos durante la recombinación (Smith, 1976; Jeffreys *et al.*, 1994). Según este modelo la presencia de secuencias repetidas incrementaría la probabilidad de estos apareamientos incorrectos. El modelo alternativo propuesto por Levinson y Gutman (1987) sostiene que las mutaciones en los microsatélites son causadas por una disociación y posterior apareamiento desfasado (*slippage*) del ADN durante el proceso de replicación. Si una unidad de repetición del extremo 3' de la cadena naciente se hibrida nuevamente con otra situada río abajo en la cadena molde, se forma un bucle en la primera pudiendo entonces la cadena naciente aumentar en tamaño. Recíprocamente, si el bucle se forma en la cadena molde, la cadena naciente reduce su tamaño (Figura 3).

Los resultados reportados por varios estudios avalan el modelo de *slippage* en la replicación como principal mecanismo generador del polimorfismo observado en los microsatélites. Brevemente se enumeran algunas de las evidencias en favor de este mecanismo:

- La estabilidad de los microsatélites no es afectada por defectos en los genes que intervienen en la recombinación (Levinson y Gutman, 1987), mientras que sí es alterada por los genes que intervienen en las vías de reconocimiento y reparación de los bucles de ADN producidos por *slippage* durante la replicación (Bishop *et al.*, 1989).
- Los nuevos alelos son generalmente no recombinantes para marcadores que los flanquean, descartando en estos casos a la recombinación (Morrall *et al.*, 1991).

- La tasa y el patrón general de mutación de los microsatélites que se encuentran en los cromosomas autosómicos, al parecer, no difiere de aquellos localizados en cromosomas hemigotas como por ejemplo el Y. Esto sugiere que el evento mutacional no requiere del contacto entre cromosomas homólogos (Heyer *et al.*, 1997).

Estos y otros resultados, revelan que el modelo de *slippage* es un importante componente del mecanismo generador de inestabilidad en los STR. Sin embargo, este modelo no provee un cuadro completo del proceso mutacional. Se han descrito al menos dos vías de reparación de errores producidos por el apareamiento incorrecto del ADN en la replicación (Armour *et al.*, 2001). Mutaciones en el gen que codifica una de las enzimas implicadas en la reparación se han asociado a una expansión incontrolada de repeticiones, una observación común en varios tipos de cáncer (Ionov *et al.*, 1993; Kunkel, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994). Por lo tanto, el polimorfismo encontrado en los microsatélites estaría producido por un balance entre los mecanismos que producen errores en la replicación y los mecanismos de reparación.

Modelos de evolución de los microsatélites

En los últimos años, los microsatélites están reemplazando o complementando a otros marcadores moleculares en numerosos trabajos de genética de poblaciones y evolución. Para optimizar la información que proveen estos marcadores es necesario un conocimiento profundo acerca de los eventos mutacionales que dan forma a la evolución de los microsatélites. Las mutaciones en los microsatélites generalmente producen cambios en una unidad de repetición, pero con menor frecuencia pueden involucrar a más de una unidad (Weber y Wong, 1993; Di Rienzo *et al.*, 1994; Primmer *et al.*, 1996). Se han propuesto varios factores que afectan la evolución de los microsatélites, incluyendo el tamaño de los alelos (Weber, 1990; Chung *et al.*, 1993), la presencia de interrupciones dentro de las secuencias repetidas (Richards y Sutherlands, 1994; Pepín *et al.*, 1995; Santibáñez-Koref *et al.*, 2001), un sesgo hacia el aumento en unidades de repetición (Amos *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 1996) y limitaciones en el tamaño que los STRs pueden alcanzar (Bowcock *et al.*, 1994; Garza *et al.*, 1995). Sin embargo, los datos acumulados son insuficientes para la construcción de modelos teóricos adecuados de mutación, los cuales son necesarios para una estimación eficaz de los parámetros genéticos poblacionales.

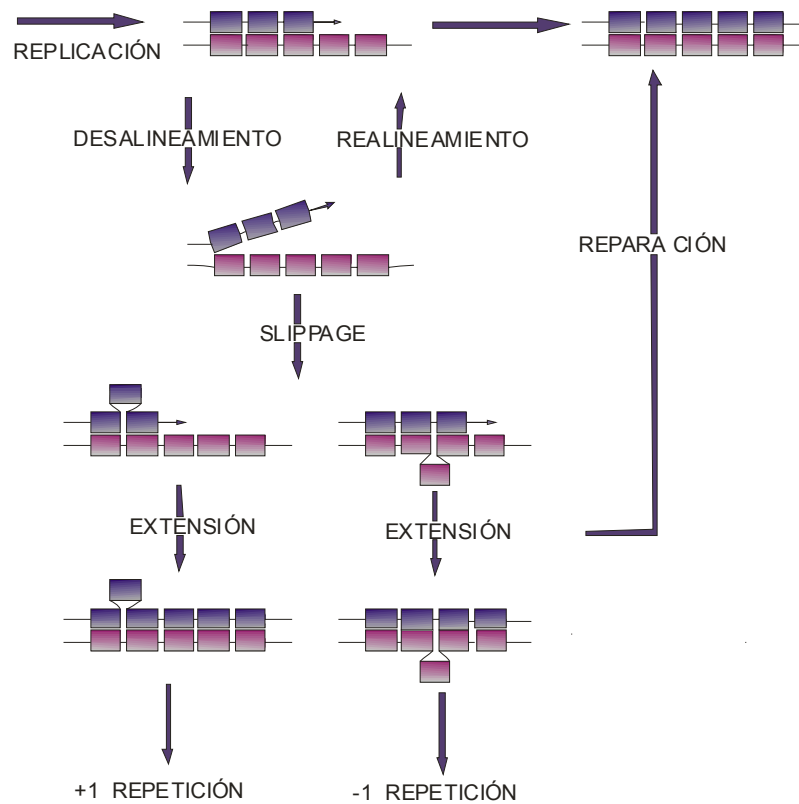


Figura 3. Modelo general del mecanismo mutacional de los microsatélites propuesto por Levinson y Gutman (1987). Las mutaciones en los STR serían causadas, según este modelo, por una disociación y posterior apareamiento desfasado (*slippage*) del ADN durante el proceso de replicación. Los errores en la replicación podrían ser corregidos por sistemas de reparación inespecíficos o específicos de STRs.

Usualmente, se han considerado dos modelos teóricos extremos de mutación para los microsatélites (Deka *et al.*, 1991): el modelo de alelos infinitos *-infinite allele model*, IAM- (Kimura y Crow, 1964) y el modelo de mutaciones de a pasos *-stepwise mutation model*, SMM- (Kimura y Ohta, 1978). El SMM describe las mutaciones como un proceso de ganancia o pérdida de sólo una unidad de repetición, donde los alelos de una población pueden mutar hacia estados adyacentes a las variantes presentes. En contraste bajo el IAM, las mutaciones involucran cambios en cualquier número de repeticiones en tandem y siempre originan alelos nuevos, que no están presentes en la población. Más recientemente, Di Rienzo y colaboradores (1994) introdujeron el modelo de dos fases *-two phase model*, TPM-, donde las mutaciones pueden implicar cambios en una repetición o en menor medida provocar cambios en varias unidades. A la ganancia o pérdida de una única repetición se le asigna una probabilidad P , y las mutaciones de más de una unidad, una probabilidad igual a $1 - P$. En el caso particular donde P es igual a 1, el modelo TPM se corresponde con el

SMM, es decir que sólo se esperan cambios en una unidad de repetición. Otro modelo de evolución, intermedio entre el IAM y el SMM, es el modelo de K alelos –*k-allele model*, KAM- (Crow y Kimura, 1970). Este modelo define K estados alélicos posibles, cada uno con una probabilidad constante de mutación $P = \mu / (K-1)$, siendo μ la tasa de mutación. El KAM corresponde al IAM cuando existen infinitos K estados posibles.

El estudio de la distribución de los alelos detectados en las poblaciones y la observación directa de los eventos mutacionales en los análisis de pedigríes, pueden utilizarse para realizar inferencias sobre el modelo teórico de mutación que mejor se ajusta a los datos. La información obtenida en la mayoría de tales estudios concuerda con los modelos SMM o TPM, debido a que la mayoría de las variaciones comprenden una sólo unidad de repetición (Weber y Wong, 1993). Sin embargo, con menor frecuencia se observan mutaciones de más de una unidad. Primmer y colaboradores (1996) analizando la segregación de los alelos de un tetranucleótido en pedigríes de la golondrina *Hirundo rustica* encontraron un total de 34 mutaciones, de las cuales 6 (18%) correspondieron a cambios en más de una repetición (rango = 2-5 repeticiones, promedio de repeticiones = 2,7). Estos resultados son incompatibles con un estricto SMM y se ajustan mejor al modelo TPM.

Se han desarrollado varias metodologías con el fin de evaluar la eficacia de los modelos teóricos de mutación para explicar la distribución alélica de los microsatélites en las poblaciones. Sin embargo, es bueno aclarar que tales distribuciones no sólo dependen del proceso mutacional, sino también de distintos factores demográficos. Una forma de sortear esta dificultad se basa en el estudio de poblaciones con historia demográfica conocida. Por ejemplo, poblaciones que han sufrido cuellos de botella recientes seguidos de un rápido aumento del tamaño poblacional, o que han mantenido constante el número de individuos, etc. Utilizando la teoría de genética de poblaciones es posible derivar varios parámetros poblacionales esperados bajo los distintos modelos de mutación y contrastarlos con los datos observados en las poblaciones.

Una de las metodologías utilizadas, se basa en la comparación de la heterocigosidad y el número de alelos observados con los esperados bajo los modelos IAM y SMM en poblaciones con equilibrio entre mutación y deriva genética (Deka *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1992; Shriver *et al.*, 1993; Estoup *et al.*, 1995). La mayor parte de los loci estudiados en estos trabajos se ajustaron mejor al SMM, aunque algunos microsatélites basados en repeticiones de 1-2 pb concordaron con el modelo IAM (Deka *et al.*, 1991; Shriver *et al.*, 1993). Un método alternativo descrito por Di Rienzo y colaboradores (1994) utiliza la varianza en el número de repeticiones, la cual bajo el SMM es igual a $M/2$ (en una población cerrada en equilibrio entre mutación y deriva genética, $M = 4N_e\mu$; donde N_e es el tamaño efectivo y μ es la tasa de mutación). La varianza observada en el número de repeticiones es utilizada para construir, mediante simulaciones en computadoras basadas en la teoría de la

coalescencia, un intervalo de confianza para la homocigosis y para la frecuencia del alelo mayoritario (Hudson *et al.*, 1990; Valdes *et al.*, 1993; Donnelly y Tavaré, 1995). La mayor parte de los 10 dinucleótidos humanos estudiados por Di Rienzo en una población de Cerdeña, donde asume un modelo demográfico de rápido crecimiento poblacional y baja mezcla genética, se ajustaron mejor al modelo de dos fases (TPM) que al SMM.

En resumen, todavía es necesario evaluar el poder estadístico que poseen estas herramientas analíticas para confirmar o rechazar un determinado modelo de mutación en poblaciones con diferentes historias demográficas (Estoup y Cornuet, 1999). La aplicación de estas metodologías en estudios poblacionales ha arribado frecuentemente a resultados no concluyentes o contradictorios. Esto refleja presumiblemente la existencia de un escenario mucho más complejo acerca de los mecanismos de mutación de los microsatélites que el asumido por los modelos teóricos propuestos. Otro factor que influye en los resultados obtenidos es la dependencia de estas técnicas sobre ciertas asunciones sobre varios parámetros poblacionales que no siempre se cumplen, como por ejemplo la ausencia de equilibrio entre mutación y deriva debido a fluctuaciones en el tamaño poblacional. A continuación se enumeran algunos de los factores más relevantes que afectan el proceso mutacional y la evolución de los microsatélites:

- Homoplasia: es una consecuencia del proceso de mutación de los microsatélites que produce alelos idénticos en estado (alelos con igual cantidad de repeticiones) sin ser idénticos por descendencia (alelos que provienen del mismo antecesor). En un contexto evolutivo, la homoplasia se considera “ruido” en oposición a la homología, que es la “señal” de evolución (Scotland, 1992). Si este factor no es tenido en cuenta, puede conllevar un sesgo en el cálculo de la divergencia entre poblaciones. Esto puede ser especialmente problemático bajo el modelo SMM, donde se espera que ocurra una cantidad considerable de homoplasia, la que depende de la tasa de mutación y del tiempo de divergencia de las poblaciones.
- La tasa de mutación y por ende el nivel de polimorfismo de los microsatélites varía considerablemente entre distintos loci. Varios estudios se han realizado con el fin de establecer los factores que determinan las diferencias encontradas. El parámetro principal que influye en la estabilidad de los STRs es su longitud, presumiblemente porque los loci de mayor tamaño tendrían una mayor probabilidad de formar alineamientos incorrectos en la replicación (Weber, 1990; Gastier *et al.*, 1995; Goldstein y Clark, 1995). Un elemento importante que limita los niveles de polimorfismo es la “pureza” de la secuencia repetida. Esto se refiere al hecho de que los STRs suelen estar formados por más de un tipo distinto de unidades de repetición (microsatélites

compuestos) o poseen interrupciones en su extensión (microsatélites imperfectos). Las interrupciones estabilizan los microsatélites, reduciendo la posibilidad de alineamientos imperfectos y provocando una disminución relativa de la tasa de mutación con respecto a las secuencias no interrumpidas. Otro factor implicado en la evolución de las secuencias repetidas es la estructura de los núcleos de repetición. Chakraborty y colaboradores (1997) encontraron una asociación inversa entre el tamaño de los motivos repetidos (di, tri y tetranucleótidos) y la tasa de mutación. Por último, se han observado diferencias en los niveles de polimorfismo entre loci con diferente composición de nucleótidos (Gastier *et al.*, 1995; Sheffield *et al.*, 1995).

- Asimetrías en el proceso mutacional, limitaciones en el tamaño y selección. Además de la homoplasia y las diferencias en la tasa de mutación entre loci, recientemente se han identificado varios factores de relevancia en la evolución de los microsatélites y que aún no han sido considerados por los modelos teóricos de mutación. Varios estudios en pedigrís humanos demuestran que las mutaciones en los microsatélites envuelven más ganancias que pérdidas en el número de repeticiones (Weber y Wong 1993; Banchs *et al.*, 1994; Amos *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 1996). A pesar de estas observaciones, los mecanismos moleculares que promueven esta asimetría aún se desconocen. Un proceso de mutación que depende del tamaño de los microsatélites sumado a una tendencia a la ganancia en el número de repeticiones, puede promover teóricamente una expansión virtualmente infinita en el tamaño de los STRs. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los microsatélites posee una longitud que raramente excede las treinta repeticiones, sugiere la existencia de mecanismos que limitan el crecimiento en el tamaño de estas secuencias. En teoría, la selección podría encargarse de depurar los alelos de gran tamaño (Garza *et al.*, 1995). Sin embargo, los microsatélites se encuentran típicamente dentro de regiones de ADN no codificantes y no existen datos que demuestren que la selección actúa limitando su longitud. Se han propuesto varios mecanismos alternativos que restringen la elongación de los STRs. Varios estudios indican que las pérdidas de unidades de repetición y las deleciones son más comunes en los alelos de mayor tamaño que en los más pequeños (Primmer *et al.*, 1996; Ellegren, 2000; Harr y Schlöterer, 2000).

En resumen podemos concluir que en los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento de los distintos factores que influyen en la evolución de los microsatélites y paulatinamente esta información se ha incorporado progresivamente a los modelos de evolución. Sin embargo, el nivel de conocimiento actual sobre los procesos de mutación de

los STRs es aún insuficiente para permitir una adecuada representación de los factores antes mencionados en dichos modelos teóricos.

1.3. Genética forense e identificación animal

Como se expuso anteriormente, la disponibilidad de varias técnicas de análisis de la variabilidad genética como los polimorfismos bioquímicos, los grupos sanguíneos y especialmente los marcadores de ADN, ha permitido su aplicación como herramientas de utilidad en la identificación individual, en el control de filiación y en la determinación de la raza de origen de los individuos. Algunos de los problemas de incumbencia de estas metodologías son los siguientes:

- *Resolución de paternidades dudosas:* se analiza el polimorfismo genético de varios loci correspondientes a la cría y a los padres con el fin de determinar el parentesco. Se pueden encontrar varias situaciones:
 - Determinación del parentesco del padre o madre putativo/a con la información del genotipo de la cría y del otro progenitor.
 - Determinación del parentesco de un progenitor putativo (generalmente el padre) sin la información genética del otro progenitor.
 - Determinación de la filiación de ambos padres. En genética humana corresponden a casos de sustitución de prole o robo de niños.
- *Identificación individual, abigeato o robo de ganado:* se determina si el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia) corresponden con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia).
- *Asignación de individuos a su raza de origen:* Se establece la pertenencia de un animal a una raza determinada sobre la base de un conjunto de marcadores genéticos, los que presentan diferentes distribuciones de frecuencias alélicas.

1.3.1 Identificación individual y paternidades

En los tiempos anteriores al desarrollo de las técnicas moleculares, la identificación de un individuo sólo podía realizarse mediante el empleo de tatuajes o descripciones

fenotípicas (siluetas, marcas, manchas, color de capa, etc.). De la misma manera, la determinación de la paternidad debía resolverse de acuerdo al parecido fenotípico entre los supuestos padres y la cría. Estos criterios son subjetivos, ambiguos, escasamente informativos, de herencia poco conocida o bien su expresión depende de la acción de un gran número de genes. Es por esta razón que desde principios del siglo pasado se ha intentado desarrollar una metodología más objetiva que cumpla con los siguientes requisitos básicos (Giovambattista *et al.*, 1997):

- Analizar loci correspondientes a caracteres cualitativos.
- Dichos caracteres no deben estar influenciados por el ambiente.
- Deben poseer herencia mendeliana simple.
- Deben expresarse en el individuo desde su nacimiento.
- Que su análisis no conlleve riesgo para el animal.
- Que sean informativos.
- Que la metodología sea repetible y pueda ser estandarizada fácilmente.

Las nuevas metodologías se basan en la búsqueda y análisis de polimorfismos genéticos con el fin de desarrollar marcadores genéticos. Las características principales de los marcadores genéticos se describen en la sección 2.1 *Polimorfismos*.

Desde sus comienzos las diferentes asociaciones de criadores de animales domésticos se han preocupado en llevar registros genealógicos o de pedigríes de sus animales con el fin de mantener la pureza y el tipo de la raza. No es un hecho poco común que ocurran errores o cambios de filiación en el momento de la inscripción de determinadas crías en los registros de las diferentes asociaciones. Es por ello que actualmente, previo a la inscripción de un animal, es obligatoria la realización de la denominada “Cédula de Identificación Genética”. Posteriormente, se comparan los resultados genéticos obtenidos para la cría en cuestión con los datos correspondientes a los progenitores alegados. De la misma manera, se puede certificar la identidad de pajuelas de semen y embriones. Esta política es seguida por las asociaciones de criadores de numerosos países.

Desde el inicio de esta práctica hasta la actualidad, la identificación se ha llevado a cabo mediante polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos. Sin embargo, durante los últimos años, países como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y la Comunidad Europea, han implementado planes nacionales para el estudio de los genomas de las diferentes especies de animales domésticos. Como consecuencia de estos estudios ya se han reportado un sinnúmero de microsátélites en las principales razas domésticas. En bovinos, se han descrito más de 3800 loci (<http://locus.jouy.inra.fr>).

Con el auspicio de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG), se han seleccionado y estandarizado un conjunto de microsatélites para varias especies de animales domésticos (bovino, equino, cerdo, perro, oveja, cabra), los que se han utilizaron en los Test de Comparación Internacional realizados bianualmente desde 1995. Basados en los resultados de estas pruebas, los comités de estandarización de la ISAG han presentado en las reuniones de trabajo (*Workshop*) propuestas de paneles de microsatélites para ser usados como estándares internacionales para la identificación individual entre 9 y 18 marcadores según la especie. Gracias a este esfuerzo conjunto de laboratorios de todo el mundo abocados a realizar la tipificación de animales domésticos, ya se cuenta con una batería de marcadores a nivel molecular.

Si bien hasta el momento, la tipificación de los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos siguen siendo los estándares internacionales para la certificación de paternidad en la mayoría de las razas en la República Argentina, la mayoría de los países utilizan de forma única la certificación mediante microsatélites. Una aplicación importante de los marcadores genéticos en lo que respecta a la identificación individual y a la determinación de paternidades es el control de pedigríes en los proyectos de mapeo génico, y en especial en los estudios de segregación de caracteres cuantitativos. Pequeños errores en la confección de los pedigríes pueden tener gran influencia sobre los resultados (Geldermann *et al.*, 1985; Kinghorn *et al.*, 1993; Ron *et al.*, 1996; Israel y Weller, 2000). Por último, los microsatélites han demostrado su utilidad en estudios de fertilidad y comportamiento sexual de toros en montas colectivas. La determinación inequívoca de la proporción de hijos de cada toro sujetos a este tipo de manejo reproductivo permitiría evaluar la importancia de varios parámetros reproductivos.

1.3.2 Abigeato o cuatrismo

La substracción de ganado es un hecho frecuente en la República Argentina. En la provincia de Buenos Aires según la Dirección General de Investigaciones Jurídicas del Ministerio de Seguridad bonaerense entre los años 2001 y 2002 se habría denunciado el robo de 16.260 animales, que representan aproximadamente 9.760.000 pesos de pérdidas como consecuencia de la inseguridad rural.

Los animales robados son generalmente faenados en el lugar del hecho, dejando restos biológicos que se pueden emplear como material periciable. A su vez, cuando los sospechosos son detenidos con la posible carne robada, ésta también se tipifica del mismo modo que las muestras anteriores. Los casos de abigeato se resuelven analizando las

muestras obtenidas en ambos sitios y realizando el estudio comparativo mediante las tipificaciones del ADN.

En las denuncias de abigeato, los restos biológicos (evidencias de robo), como consecuencia de haber estado a la intemperie sufren distintos grados de descomposición, ya que inmediatamente después de la muerte comienzan los procesos de autólisis. Esta primera etapa de descomposición de los tejidos es seguida por la acción de los microorganismos, hongos y, en un estado más avanzado, por la intervención de insectos y vertebrados. Los factores ambientales (la humedad y el oxígeno) y biológicos reducen considerablemente la calidad y cantidad del ADN obtenido (Herman *et al.*, 1994). Otros factores que inciden en la calidad de la muestra son la forma de conservación y el tiempo de remisión al laboratorio. Es evidente que, debido al tipo de muestras que se analizan y a su relativo estado de conservación, las técnicas de análisis empleadas se basan en la utilización de marcadores de ADN y en la aplicación de la reacción de PCR.

1.3.3 Determinación de la raza de origen de los individuos.

La disponibilidad de una gran cantidad de marcadores genéticos polimórficos ha ofrecido la oportunidad de utilizar la información de los genotipos de cada individuo para determinar su población o raza de origen. Los métodos de asignación se han utilizado para resolver diferentes problemáticas como por ejemplo, la demarcación poblacional (Paetkau *et al.*, 1995; Mac Hugh *et al.*, 1998; Primmer *et al.*, 1999; Bjørnstad y Røed, 2001), la determinación de individuos inmigrantes (Rannala y Mountain, 1997), la evaluación de la desproporción sexual en la tasa de dispersión (Favre *et al.*, 1997), la investigación de los patrones de dispersión y los hábitat invernales de aves migratorias (Haigh *et al.*, 1997) y el origen de poblaciones contemporáneas (Nielsen *et al.*, 1997). La determinación genética de la población de origen se ha utilizado para resolver un caso judicial (Primmer *et al.*, 2000) y puede aplicarse para comprobar el origen de los productos alimenticios de origen animal.

La conservación y el manejo reproductivo de las especies domésticas se basan generalmente en el mantenimiento de poblaciones aisladas reproductivamente denominadas “razas”. Estas poblaciones han sido sujetas a una variedad de fuerzas evolutivas durante su formación e historia. El efecto fundador, la deriva genética y la selección natural y artificial han producido una diferenciación significativa a nivel genético entre ellas (Mac Hugh *et al.*, 1996; Blott *et al.*, 1999).

En Europa, debido a la detección de la encefalopatía espongiforme bovina, el consumo de carne bovina ha sido seriamente afectado. Cada vez más, los consumidores reclaman un mayor acceso a la información sobre el origen racial de la carne importada a

esos países. El desarrollo de metodologías de determinación de la identidad racial puede resultar de mucha importancia para la validación de diferentes productos alimenticios derivados de la explotación animal. Esto se torna cada vez más importante debido a utilización del nombre de la raza como “marca” de diversos productos cárnicos y lecheros (carne “Aberdeen Angus”, quesos de leche “Jersey” o “Ayrshire”). La protección del nombre de la raza como marca del artículo puede, en ciertas ocasiones, requerir del control de origen mediante test de ADN.

2. 1 Hipótesis de trabajo

Las razas bovinas domésticas pueden ser divididas en tres grandes grupos sobre la base de los centros de domesticación (Cercano Oriente, India y África). A partir de dichos centros, las diferentes razas domésticas se habrían originado mediante procesos de migración, deriva genética, y selección artificial y natural. Sobre la base de dicha información, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se plantearon las siguientes hipótesis:

- Las diferentes razas bovinas presentan combinaciones de alelos y frecuencias génicas particulares. Algunas variantes son únicas de determinada raza o grupo de razas, por lo que pueden ser utilizados como alelos diagnósticos.
- Las razas domésticas pueden ser clasificadas mediante el uso de microsatélites y estas agrupaciones están determinadas principalmente por las relaciones históricas.
- Las poblaciones locales de Argentina y Bolivia originadas a partir de razas europeas e índicas presentan niveles similares de diversidad a las poblaciones de origen, como consecuencia de los sistemas de cría (registros cerrados, sistemas intensivos de inseminación, importación de semen y embriones, etc.).
- Los polimorfismos correspondientes a los genes estructurales y a los microsatélites son herramientas de gran utilidad para estimar introgresión génica en bovinos. Por otra parte, con un número suficiente de marcadores de tipo microsatélite cada individuo analizado puede ser asignado a una raza particular.
- El poder de exclusión simple y combinado de los microsatélites analizados varía en las diferentes poblaciones o razas como consecuencias de las variaciones en las frecuencias génicas. Además, estas metodologías permiten resolver casos de paternidad, abigeato e identificación individual con altos valores de probabilidad.

2.2 Objetivo general y objetivos particulares

El objetivo general del presente plan de trabajo consiste en:

- Caracterización genética de razas bovinas criollas, europeas e índicas de Argentina y Bolivia a través del análisis de microsatélites autosómicos y holándricos.

Esta es la información básica es imprescindible para cumplir con los objetivos particulares detallados a continuación:

- Estimación de los niveles de diversidad genética de las razas incluidas en el presente estudio mediante microsatélites y su comparación con los valores obtenidos para otras razas bovinas.
- Evaluación de la estructura genética y análisis de la relaciones entre las razas mediante el uso de la prueba de diferenciación genética, la técnica de AMOVA, los índices de distancia genética y el análisis de componentes principales.
- Estimación de los niveles de introgresión de genes índicos en las poblaciones de bovinos Criollos de Argentina y Bolivia a partir de microsatélites autosómicos y holándricos. Comparación de los patrones observados para dicho marcadores con los reportados para el ADN mitocondrial.
- Habilidad de los marcadores utilizados para asignar los individuos a sus poblaciones de origen. Evaluación del índice F_{ST} , el número de alelos y de la heterocigosidad sobre el porcentaje de asignación correcta.
- Evaluación de la eficacia del juego de microsatélites seleccionado para estimar el poder de exclusión en diferentes situaciones comunes de paternidad e identificación individual. Determinación del efecto de los niveles de variabilidad genética y de diferenciación genética sobre los valores de exclusión.
- Aplicación de los marcadores moleculares para resolver casos de abigeato y casos complejos de paternidad.

3.1. Metodología experimental general

3.1.1 Selección y extracción de muestras.

Numerosos trabajos, basados en simulaciones teóricas y en datos empíricos, han analizado la cuestión del tamaño muestral mínimo necesario para caracterizar genéticamente una población (Nei, 1987; McHugh, 1996). El error estándar de la estimación de las frecuencias génicas depende de los valores de las frecuencias alélicas y del número de individuos analizados:

$$ES = \frac{\sqrt{x(1-x)}}{2n}$$

donde x corresponde a la frecuencia génica y n al número de individuos muestreados.

Como se aprecia en la figura 4, el error estándar decrece rápidamente al aumentar el tamaño de la muestra, haciéndose asintótico después de aproximadamente 30 individuos. Si se tiene en cuenta la relación costo/información, el tamaño muestral óptimo sería entre 30 y 60 individuos (MacHugh, 1996).

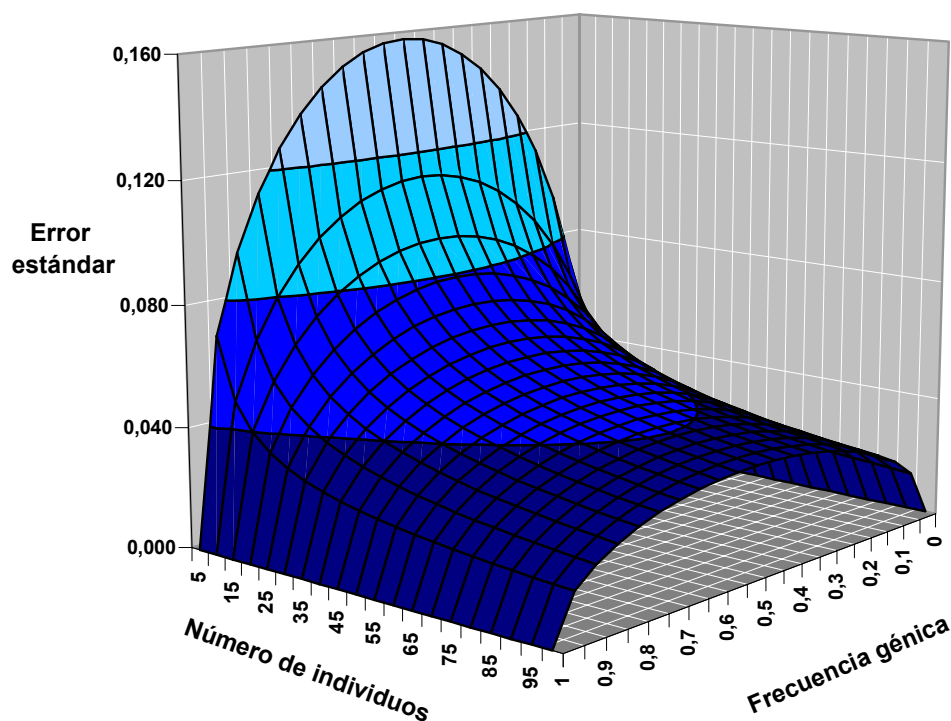


Figura 4. Variación del error estándar de las frecuencias génicas en función de las frecuencias alélicas observadas y el tamaño de la muestra.

3.1.2 Poblaciones analizadas

Los animales analizados en el presente trabajo pertenecen a once razas bovinas: Abeerden Angus, Hereford, Holando Argentina, Jersey, Brahman, Nelore, Retinta, Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña, Criolla Yacumeña. En la tabla 2 se detallan el origen y número de animales muestreados. Las muestras analizadas correspondieron a animales no relacionados genéticamente.

3.1.3 Muestras de paternidades - casos forenses analizados

En este trabajo se analizaron un total de 108 muestras correspondientes a 35 casos de robo de ganado bovino localizados en la Provincia de Buenos Aires. En la tabla 1 se detallan los tipos de muestras analizadas. Además se analizaron 10 muestras correspondientes a un caso de paternidad discutida.

Tabla 1. Cantidad y tipo de muestras y analizadas correspondientes a 35 casos de abigeato.

Tipo de muestras	Muestras analizadas
Carne	97
Cuero/pelos	4
Órganos	3
Sangre fresca	3
Manchas de sangre	1
Total	108

3.1.4 Toma de muestras

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción yugular, utilizando el anticoagulante ACD (25 mM de ácido cítrico, 45 mM de citrato de sodio, 80 mM de glucosa) en una proporción sangre-ACD 6:1. Las muestras se transportaron en hielo hasta el laboratorio, donde se conservaron en un freezer a -85°C hasta su utilización.

Tabla 2. Establecimientos muestreados de cada raza, localización y cantidad de individuos analizados.

Raza	Establecimiento	Localización	Muestras
Aberdeen Angus	Flores Chicas	Buenos Aires	35
	Las Martinetas	Buenos Aires	10
	Lauquen	Buenos Aires	11
	UNLP	Buenos Aires	3
			n = 59
Holando Argentino	Santa Catalina	Buenos Aires	21
	Loma Verde	Buenos Aires	7
	Don Blas	Buenos Aires	5
			n = 33
Hereford	Varios rodeos	Uruguay	26
	UNLP	Buenos Aires	10
			n = 36
Criollo Argentino	Arroyo del Medio	Jujuy	13
	Balcarce	Buenos Aires	8
	Tandileofú	Buenos Aires	5
	Chasquivil	Tucumán	3
	Concordia	Entre Ríos	2
			n = 31
Criollo Saavedreño	Saavedra	Santa Cruz, Bolivia	31
Criollo Chaqueño	El Salvador	Chuquisaca, Bolivia	22
Criollo Yacumeño	Yacuiba	El Beni, Bolivia	25
Brahman	Yacuiba	El Beni, Bolivia	31
Nelore	Todos Santos	Santa Cruz, Bolivia	20
	Arroyo del Medio	Jujuy	5
			n = 26
Retinta	Varios rodeos	España	20
Jersey	Brandsen	Buenos Aires	10

3.1.5 Extracción de ADN

El ADN genómico se purificó a partir de sangre periférica a través de los siguientes métodos rápidos de extracción:

Método de extracción de ADN a partir de sangre con CHELEX™

Esta técnica de extracción rápida de ADN utiliza la resina CHELEX™ (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos), la que presenta una alta afinidad por iones metálicos polivalentes. El procedimiento básico consiste en hervir la muestra en una solución de CHELEX al 5%. Esta resina actúa quelando iones metálicos, evitando así la degradación del ADN a altas temperaturas.

A continuación, se detalla el protocolo de extracción utilizado (Walsh *et al.*, 1991):

- Lavar 5 µl de sangre con agua destilada. Resuspender el *pellet* de células blancas en 200µl de una solución de CHELEX™ al 5%.
- Incubar la muestra durante 30 minutos a 56°C y luego hervir 8 minutos a 100°C. En este último paso, las células blancas son lisadas liberando al ADN.

Previo a su utilización en las reacciones de amplificación, centrifugar las muestras durante 3 minutos a 14.000 r.p.m., pues el Chelex™ reduce la actividad de la enzima *Taq* polimerasa.

Método de extracción de ADN partiendo de sangre con DNAzol™

El DNAzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) es un detergente de isotiocianato de guanidina. Este reactivo, altamente caotrópico, permite el lisado de las células y la precipitación diferencial del ADN.

El protocolo de extracción utilizado (Cox, 1968; Ausubel *et al.*, 1990) consiste brevemente en:

- Lavar 500 µl de sangre con agua destilada. Agregar al *pellet* de linfocitos 500µl de DNAzol™. El detergente producirá la lisis de las células blancas.
- Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 14.000 r.p.m. y trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga que contenga 250 µl de etanol al 100%, con el fin de precipitar el ADN genómico.
- Lavar el ADN con 250 µl de etanol al 70% y solubilizarlo en una solución de 8 mM de NaOH. Neutralizar la solución con 0,8 mM de HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina - ácido N'2-etanosulfónico).

Extracción de ADN a partir de músculo y otros tejidos blandos.

Con el fin de obtener ADN de calidad periciable, las muestras de tejido muscular y diversos órganos se procesaron mediante una modificación del método descrito por Wagner y colaboradores (1994). El cual consiste brevemente en:

- Incubar 0,7 mg de tejido en 600 µl buffer de extracción (50 mM de Tris-CIH, 25 mM de EDTA, 2% de N-laurylsarcosine y 30 mM de DTT –ditiotreitól- con el agregado de 20 µl de proteinasa K (20 mg/µl), a 56°C durante 12-16 horas.
- Purificar inicialmente el ADN con un volumen de cloroformo y posteriormente, a través de la técnica de *salting-out* (precipitación diferencial con acetato de sodio amonio a una concentración final de 2,5M).
- Precipitar el ADN con medio volumen de isopropanol.
- Resuspender el ADN obtenido en 200 a 400 µl de agua bidestilada.

Método rápido de extracción de ADN a partir de pelos.

La extracción de ADN a partir de pelos fue el método de elección en los casos de abigeato donde la muestra enviada al laboratorio contenía trozos de cuero o pelos con la presencia de bulbo. El método consiste en:

- Cortar el bulbo de 5 pelos e incubarlos en 50 µl de solución de Lisis (200 mM de NaOH) a 95°C durante 10 minutos.
- Neutralizar el pH con 50 µl de una solución de 200 mM de CIH y 100 mM de TRIS-CIH (pH 8,5).

3.1.6 Tipificación de los marcadores moleculares

La caracterización genética de todos los loci seleccionados para el presente estudio se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987). Esta técnica consiste en la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN. El tamaño del fragmento amplificado está determinado por un par de oligonucleótidos sintéticos, llamados cebadores o *primers*, que son complementarios a los extremos 5' y 3' del segmento del ADN molde a amplificar. La síntesis de ADN es catalizada por la enzima termoestable *Taq* ADN polimerasa. Las condiciones de reacción utilizadas para cada marcador estudiado se detallan en la sección 3.2 *Metodología experimental específica*.

3.1.7. Corridas electroforéticas

Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

Los productos de amplificación y los fragmentos obtenidos por la digestión con las enzimas de restricción correspondientes al *BoLA-DRB3*2* se resolvieron en minigeles de poliacrilamida al 6% (19:1 acrilamida: bisacrilamida, 0,01% de persulfato de amonio, 0,001% de TEMED - N, N, N', N' -tetrametiletilenediamino-) / 1x TBE (0,090 M de tris-borato, 0,002 M de EDTA). Las corridas se realizaron en cubas verticales (Aladin Enterprises, San Francisco, Estados Unidos) en geles de 11,2 cm de largo. En cada fosa se sembraron 17 µl de los productos de digestión con 3,5 µl de 6x dye (0,25% azul de bromofenol, 40% de sucrosa) o 5 µl de amplificado con 1 µl de 6x dye. Las muestras se corrieron a 170 voltios durante 35 minutos, se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg / ml) y se visualizaron con luz ultravioleta (UV).

Geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Los productos de amplificación correspondientes a las secuencias repetidas de tipo microsatélites, se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 5% (19:1 acrilamida: bisacrilamida, 2% urea, 0,01% de persulfato de amonio, 0,001% de TEMED)/ 1x TBE. Las corridas se realizaron en cubas verticales (Aladin Enterprises, San Francisco, USA) en geles de 50 cm x 35 cm x 0,375 mm. En cada fosa se sembraron 4 µl de los amplificados con 4 µl de 2x dye desnaturalizante (0,05% azul de bromofenol, 0,05% Xilene Cyanol FF, 96% de formamida, 20 mM EDTA) / 1x TBE. Previamente, las muestras se desnaturalizaron en un bloque seco a 96°C durante 10 minutos, se colocaron en hielo durante 5 minutos, se sembraron en el gel y se corrieron a 50 watts durante 4 horas. Finalmente, los geles se tiñeron con nitrato de plata (1%).

3.1.8. Tinción con plata

Como se mencionó en el punto anterior, los geles de poliacrilamida utilizados para discriminar los alelos de los STRs se tiñeron con nitrato de plata. Esta técnica consiste de tres etapas: fijación, tinción y revelado. El protocolo empleado es el siguiente (Bassam *et al.*, 1991):

- Una vez finalizada la corrida electroforética, fijar el gel en ácido acético glacial al 10% durante toda la noche.

- Teñir el gel en dos litros de nitrato de plata (2 gr de NO_3Ag , 3 ml de formaldehído) durante 40 minutos.
- Revelar el gel con una solución preenfriada (10°C) de carbonato de sodio (30 gr / litro de CO_3Na).
- Detener la reacción de revelado con una solución de ácido acético glacial al 10%.

3.1.9. Análisis del tamaño molecular.

La estimación del peso molecular de los alelos de los microsatélites se realizó mediante su comparación con muestras controles previamente caracterizadas para dichos marcadores genéticos. El empleo de las mismas muestras controles por los distintos grupos de investigación permite la estandarización de las técnicas de tipificación y la comparación de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. En el presente trabajo se incluyeron ADNs controles utilizados en el programa europeo de Biodiversidad de Razas Bovinas (*Cattle Diversity Database* -<http://www.ri.bbsrc.ac.uk>-), lo que permitió la estandarización de siete de los ocho STR autosómicos empleados (*BM2113*, *BM1824*, *TGLA53*, *TGLA122*, *TGLA227*, *SPS115*, *ETH225*). En el caso del marcador *MGTG7* se utilizaron muestras con genotipos conocidos provistas por el Dr. Harris A. Lewin (Department of Animal Science, University of Illinois, Urbana, Estados Unidos) y la Dra. María Cecilia Penedo (Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, Estados Unidos). En el caso de los microsatélites del cromosoma Y (*INRA124* e *INRA189*) se emplearon ADN controles provistos por el Dr. Ceiridwen J. Edwards (Molecular Population Genetics Lab, Genetics Department, Dublin University, Dublin, Irlanda). Finalmente, cabe mencionar que en el caso del locus *BoLA-DRB3* los pesos moleculares de los fragmentos de restricción se estimaron a través de la comparación con el marcador de peso molecular *PBR322* digerido con *MspI* (New England BioLabs, Beverly, MA, Estados Unidos).

3.2 Metodología experimental específica

3.2.1. Microsatélites

A continuación se describen las metodologías específicas utilizadas para caracterizar a los siguientes microsatélites: *BM2113* (*D2S26*), *BM1824* (*D1S34*), *SPS115* (*D15*), *INRA023* (*D3S10*), *ETH225* (*D9S1*), *TGLA122* (*D21S6*), *TGLA227* (*D18S1*), *TGLA53*

(D16S3), MTGT7 (D23S5), INRA124 (DYS6) e INRA189. Sobre la base del rango de peso molecular y la temperatura de hibridación (T_m) para cada uno de los marcadores se diseñaron cuatro “multiplex PCR” (Tabla 3). A continuación se detallan los protocolos de PCR utilizados.

Tabla 3. Descripción de la ubicación cromosómica, la temperatura de hibridación (T_m), concentración de Cl_2Mg , concentración de cebadores y rango de peso molecular de los marcadores de tipo microsatélite utilizados en el presente estudio.

Locus ^a	Cromosoma	T_m^b (°C)	Cl_2Mg (mM)	Cebadores (μM)	Rango (bp)	Referencia
BM2113 (D2S26)	2	63	1,5	0,8	122-144	Bishop <i>et al.</i> , 1994
BM1824 (D1S34)	1	63	1,5	1,2	179-191	Bishop <i>et al.</i> , 1994
SPS115 (D15)	15	63	1,5	0,4	234-256	Moore <i>et al.</i> , 1993
INRA023 (D3S10)	3	63	2	1,2	195-215	Vaiman <i>et al.</i> , 1994
ETH225 (D9S1)	9	63	2	0,6	139-159	Steffen <i>et al.</i> , 1993
TGLA122 (D21S6)	21	56	3	0,8	136-182	Georges <i>et al.</i> , 1992
TGLA227 (D18S1)	18	56	3	1,6	79-105	Georges <i>et al.</i> , 1992
TGLA53 (D16S3)	16	56	2,5	1,2	151-183	Georges <i>et al.</i> , 1992
MTGT7(D23S5)	23	56	2,5	0,6	282-310	Georges <i>et al.</i> , 1995
INRA124 (DYS6)	Y	55	1,5	0,5	124-126	Vaiman <i>et al.</i> , 1994
INRA189	Y	58	2,5	0,4	88-102	Kappes <i>et al.</i> , 1994

^a El código correspondiente al mapa del genoma bovino se indica entre paréntesis; ^b T_m : temperatura de hibridación.

Multiplex N° 1: BM2113 (D2S26), BM1824 (D1S34) y SPS115 (D15)

Los microsatélites BM2113, BM1824 y SPS115 se amplificaron en una misma reacción de PCR (*multiplex PCR*). Para amplificar un fragmento de entre 122 y 144 pb correspondiente al locus BM2113 se utilizaron los cebadores F: 5'-GCTGCCTTCTACCAAATACCC-3' y R: 5'-CTTCCTGAGAGAAGCAACACC-3' (Bishop *et al.*, 1994). Para amplificar una fragmento de entre 179 y 191 pb correspondiente al locus BM1824 se utilizaron los cebadores F: 5'-GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC-3' y R: 5'-CATTCTCCAACTGCTTCCTTG-3' (Bishop *et al.*, 1994). El tercer locus incluido en el *triplex* fue el SPS115, el que posee un tamaño de entre 234 y 256 pb y para amplificarlo se utilizaron los cebadores F: 5'- AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG -3' y R: 5'-AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG-3' (Moore *et al.*, 1993) La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 1,5 mM Cl_2Mg , 100 μM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen- Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos); 0,8 μM de cada cebador del locus BM2113, 1,2 μM de cada cebador del locus BM1824, 0,4 μM de

cada cebador del locus *SPS115* y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 63°C y 30 segundos de extensión a 72°C seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 90°C, 45 segundos a 63°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 20 minutos a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con igual volumen del buffer de siembra 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%) se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se transfirieron a hielo. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x, corridos a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

Multiplex 2: INRA023 (D3S10) y ETH225 (D9S1)

Los microsatélites *INRA023* y *ETH225* se amplificaron en una misma reacción de PCR. Para amplificar un fragmento de entre 195 y 215 pb correspondiente al locus *INRA023* se utilizaron los cebadores F: 5'-GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC-3' y R: 5'-TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC -3' (Vaiman *et al.*, 1994), mientras que para amplificar una secuencia de entre 139 y 159 pb correspondiente al locus *ETH225* se utilizaron los cebadores F: 5'-GATCACCTTGCCACTATTCCT-3' y R: 5'-ACATGACAGCCAGCTGCTACT-3' (Steffen *et al.*, 1993). La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 2 mM Cl₂Mg, 100 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 1,2 µM de cada cebador del *INRA023*, 0,6 µM de cada cebador del *ETH225* y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 63°C y 30 segundos de extensión a 72°C seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 90°C, 45 segundos a 63°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 20 minutos a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con un volumen de dye 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%), se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se transfirieron a hielo. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x, corridos a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

Multiplex 3: *TGLA122 (D21S6)* y *TGLA227 (D28S1)*

Los microsatélites *TGLA122* y *TGLA227* se amplificaron en una misma reacción de PCR. Para amplificar un fragmento de entre 136 y 182 pb correspondiente al locus *TGLA122* se utilizaron los cebadores F: 5'-CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC-3' y R: 5'-AATCACATGGCAAATAAGTACATAC-3' (Georges *et al.*, 1992), mientras que para amplificar una secuencia de entre 79 y 105 pb correspondiente al locus *TGLA227* se utilizaron los cebadores F: 5'-CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT-3' y R: 5'-ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA-3' (Georges *et al.*, 1992). La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 3 mM Cl₂Mg, 100 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 0,8 µM de cada cebador del *TGLA122*, 1,6 µM de cada cebador del *TGLA227* y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 56°C y 30 segundos de extensión a 72°C seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 90°C, 30 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 20 minutos a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con un volumen de dye 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%), se desnaturalizaron en un bloque seco a 96°C durante 10 minutos y posteriormente se transfirieron a hielo. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x, corridos a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

Multiplex 4: *MGTG7 (D23S5)* y *TGLA53 (D16S5)*

Los microsatélites *MGTG7* y *TGLA53* se amplificaron en una misma reacción. Para amplificar un fragmento de entre 282 y 310 pb correspondiente al locus *MGTG7* se utilizaron los cebadores F: 5'-TTCATTGCAGCACTATTTACAATA-3' y R: 5'-TAAGTTCCCTGTATCATTTTTTTGA-3' (Georges *et al.*, 1995). Para amplificar una secuencia de entre 151 y 183 pb correspondiente al locus *TGLA53* se utilizaron los cebadores F: 5'-GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA-3' y R: 5'-ATCTTCACATGATATTACAGCAGA-3' (Georges *et al.*, 1992). La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 2,5 mM Cl₂Mg, 100 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 0,5 µM de cada cebador y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 56°C y 30 segundos de extensión a

72°C seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 90°C, 30 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 20 minutos a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con igual volumen de dye 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%), se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se transfirieron a hielo. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x, corridos a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

INRA124 (DYS6)

El microsatélite *INRA124* corresponde a un locus ubicado en el cromosoma Y que presenta sólo dos variantes alélicas, una específica de *Bos taurus* (126 pb) y otra de *Bos indicus* (124 pb). Para amplificar el fragmento correspondiente al locus *DYS6*, se utilizaron los cebadores F: 5'-GATCTTTGCAACTGGTTTG-3' y R: 5'-CACGACACAGGTCTGACAAG-3' (Vaiman *et al.*, 1994). La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 1,5 mM Cl₂Mg, 100 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 0,5 µM de cada cebador y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 96°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 58°C y 50 segundos de extensión a 72°C seguidos por 25 ciclos de 1 minuto a 90°C, 45 segundos a 60°C, 50 segundos a 72°C y un último ciclo de 5 minutos de polimerización a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con un volumen de dye 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%), se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se transfirieron a hielo hasta su siembra. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x que se corrieron a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

INRA189

El microsatélite *INRA189* corresponde a un locus ubicado en el cromosoma Y. Edwards y colaboradores (2000) reportaron, cuatro variantes alélicas para este locus; una específica de *Bos indicus* y tres de *Bos taurus*. Para amplificar el fragmento de entre 88 a 102 pb correspondiente al locus *INRA189*, se utilizaron los cebadores F: 5'-TACACGCATGTCCTTGTTCGG-3' y R: 5'-CTCTGCATCTGTCCTGGACTGG-3' (Kappes *et al.*, 1997). La mezcla de reacción consistió en 20 mM Tris-ClH, 50 mM ClK, 2,5 mM

Cl₂Mg, 100 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 0,4 µM de cada cebador y 3 µl del ADN genómico en 12,5 µl finales. El programa de amplificación consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 96°C seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 58°C y 50 segundos de extensión a 72°C seguidos por 25 ciclos de 1 minuto a 90°C, 45 segundos a 60°C, 50 segundos a 72°C y un último ciclo de 5 minutos de polimerización a 72°C.

Alícuotas de los productos de amplificación (4 µl) se mezclaron con un volumen de dye 2x (formamida 96%, EDTA 20 mM pH=8, azul de bromofenol 0,5 % y xylene cyanole 0,5%), se desnaturalizaron en un bloque seco durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se transfirieron a hielo hasta su siembra. Los alelos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (19:1) - TBE 1x. Los geles se corrieron a 50 watts durante 4 horas. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata.

3.2.2 *BoLA-DRB3*

La tipificación del locus *BoLA-DRB3* fue realizada en 10 muestras pertenecientes a un caso complejo de asignación de paternidad en una disputa judicial entre dos criadores de la raza Holstein, con el fin de completar la información genética aportada por los microsatélites. La caracterización de los alelos del locus *BoLA-DRB3* se llevó a cabo por el método de PCR anidado-RFLP descrito por van Eijk y colaboradores (1992). Dicha técnica consiste en la amplificación de la secuencia de ADN que codifica para la región de reconocimiento del antígeno o ARS (exón 2 del gen *BoLA-DRB3*) y la posterior digestión de los productos de PCR con las enzimas de restricción *Rsa* I y *Hae* III (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y *Bst* I (New England Biolabs). La definición de los alelos se realizó teniendo en cuenta las combinaciones de los patrones de restricción obtenidos en forma independiente para las tres enzimas antes mencionadas. Los alelos fueron denominados según la siguiente nomenclatura: *locus. exón* alelo*, propuesta por van Eijk y colaboradores (1992). Esta metodología permite poner en evidencia un alto grado de polimorfismo en esta región del gen (Tabla 4).

En la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores HL030 (5'-ATCCTCCTCTCTGCAGCACATTTCC-3') y HL031 (5'- TTAAATTCGCGCTCACC TCGCC GCT-3') descriptos por Lewin y colaboradores (1992). El programa utilizado en la reacción de PCR consistió en 4 minutos a 94° C de desnaturalización inicial, 9 ciclos de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 60° C y 1 minuto a 72° C, seguidos por 4 minutos de polimerización final. En la segunda etapa se usaron los cebadores HL030 y HL032 (5'- TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCT-3') (Lewin *et al.*, 1992). El programa consistió en 19 ciclos de 1 minuto a 94° C, 30 segundos a 65° C y 1 minuto a 72° C, seguidos por 4 minutos

de polimerización final. Alícuotas del producto de amplificación (12 µl) se digirieron por separado con las enzimas de restricción *Rsa* I, *Bst* I y *Hae* III (5 U) durante 3 horas, de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores. Los fragmentos de restricción se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% (19:1) - TBE 1X, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV (Figuras 5 a, b y c).

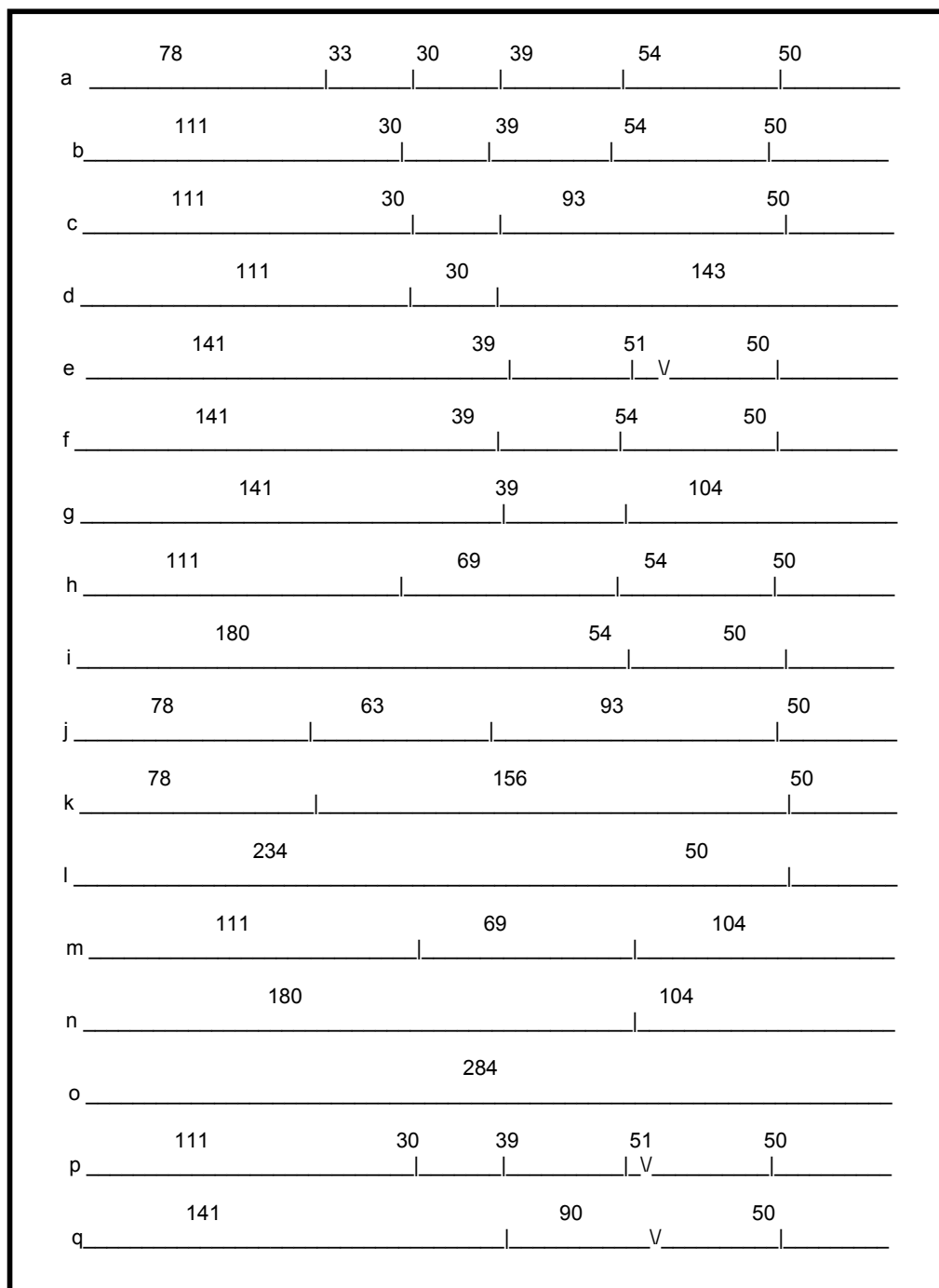


Figura 5a. Patrones de restricción obtenidos por digestión del segundo exón del gen *BoLA-DRB3* con la enzima *Rsa* I. El símbolo V, indica una delección de ADN (van Eijk *et al.*, 1992; Gelhaus *et al.*, 1995).

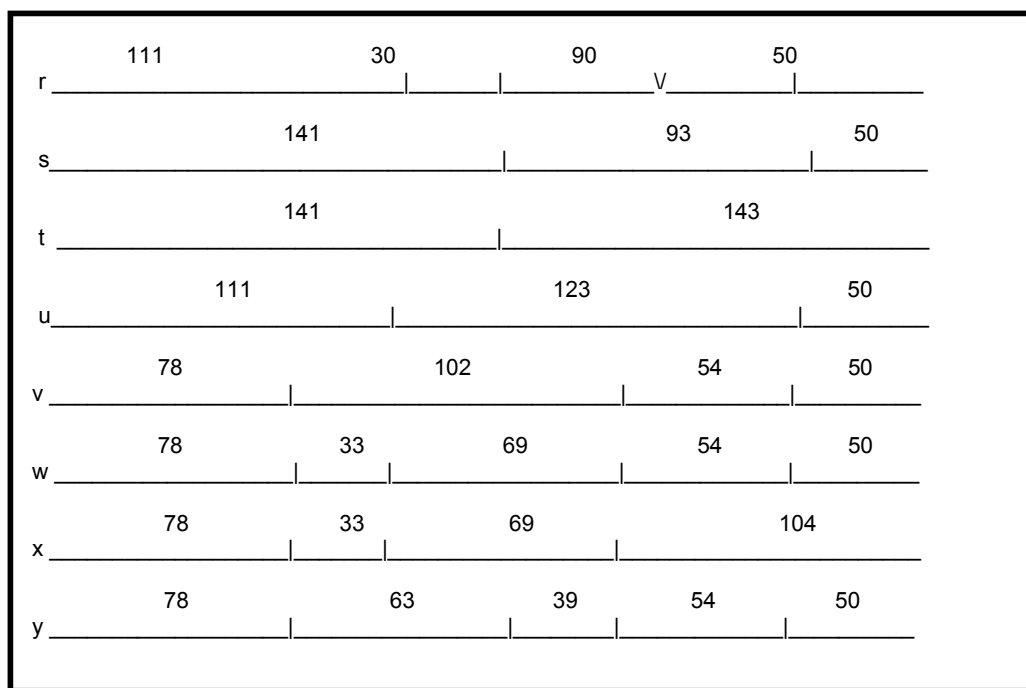


Figura 5a. Continuación.

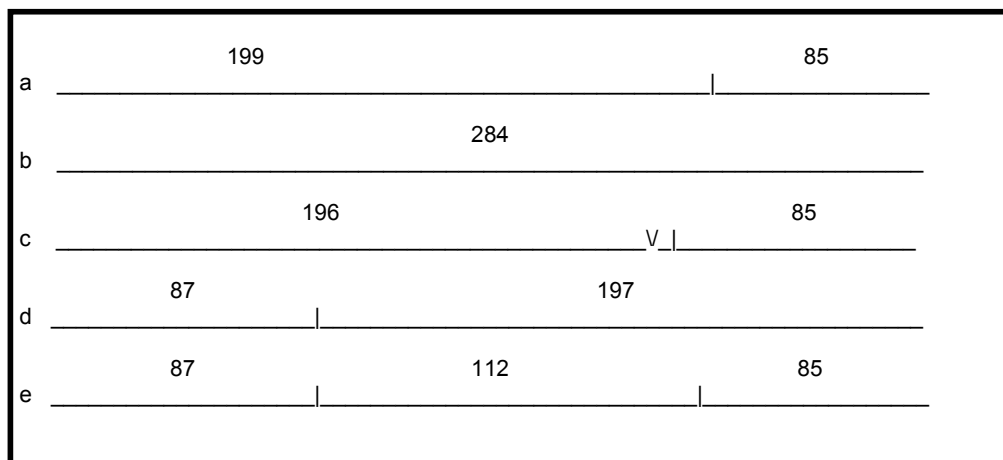


Figura 5b. Patrones de restricción obtenidos por digestión del segundo exón del gen *BoLA-DRB3* con la enzima *BstYI* (van Eijk *et al.*, 1992; Gelhaus *et al.*, 1995). El símbolo V indica una deleción.

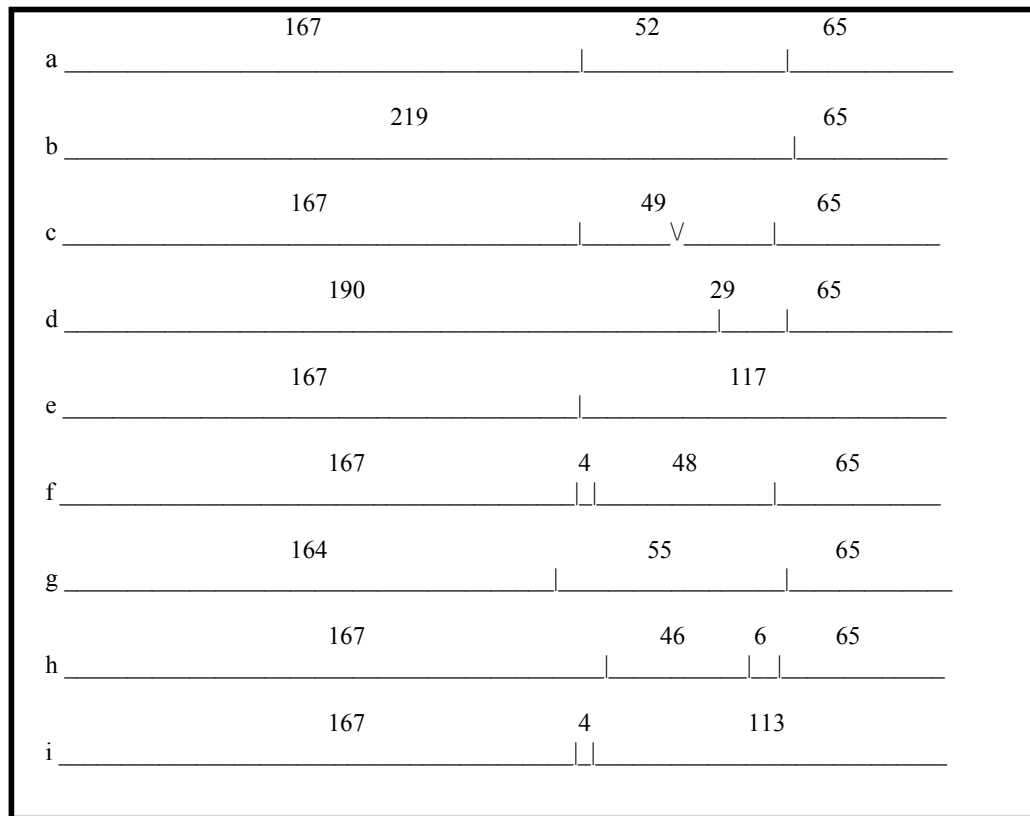


Figura 5c. Patrones de restricción obtenidos por digestión del segundo exón del gen BoLA-DRB3 con la enzima Hae III. El símbolo V indica una delección.

Tabla 4. Alelos del gen *BoLA-DRB3* definidos en base a la combinación de los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *Rsa* I, *Hae* III y *Bst*Y I (van Eijk *et al.*, 1992; Gelhaus *et al.*, 1995).

Alelos <i>DRB3</i>	<i>Rsa</i> I	<i>Bst</i> Y I	<i>Hae</i> III
<i>DRB3.2*01</i>	a	a	a
<i>DRB3.2*02</i>	b	b	a
<i>DRB3.2*03</i>	b	b	b
<i>DRB3.2*04</i>	c	a	a
<i>DRB3.2*05</i>	r	c	c
<i>DRB3.2*06</i>	d	a	a
<i>DRB3.2*07</i>	e	c	c
<i>DRB3.2*08</i>	f	a	a
<i>DRB3.2*09</i>	f	d	a
<i>DRB3.2*10</i>	f	b	a
<i>DRB3.2*11</i>	g	e	a
<i>DRB3.2*12</i>	h	a	a
<i>DRB3.2*13</i>	h	b	a
<i>DRB3.2*14</i>	h	b	b
<i>DRB3.2*15</i>	i	b	a
<i>DRB3.2*16</i>	j	b	d
<i>DRB3.2*17</i>	k	b	b
<i>DRB3.2*18</i>	l	b	f
<i>DRB3.2*19</i>	s	b	b
<i>DRB3.2*20</i>	l	b	b
<i>DRB3.2*21</i>	l	b	e
<i>DRB3.2*22</i>	m	b	a
<i>DRB3.2*23</i>	n	b	a
<i>DRB3.2*24</i>	n	b	b
<i>DRB3.2*25</i>	o	a	a
<i>DRB3.2*26</i>	o	a	b
<i>DRB3.2*27</i>	o	b	f
<i>DRB3.2*28</i>	o	b	e
<i>DRB3.2*29</i>	p	c	c
<i>DRB3.2*30</i>	q	c	c
<i>DRB3.2*31</i>	i	b	f
<i>DRB3.2*32</i>	n	a	a
<i>DRB3.2*33</i>	n	b	f
<i>DRB3.2*34</i>	l	a	b
<i>DRB3.2*35</i>	c	b	b
<i>DRB3.2*36</i>	l	b	a
<i>DRB3.2*37</i>	o	b	a
<i>DRB3.2*38</i>	b	d	a
<i>DRB3.2*39</i>	t	b	a
<i>DRB3.2*40</i>	u	b	a
<i>DRB3.2*41</i>	a	b	a
<i>DRB3.2*42</i>	h	b	f
<i>DRB3.2*43</i>	k	b	f
<i>DRB3.2*44</i>	k	d	i
<i>DRB3.2*45</i>	s	b	e
<i>DRB3.2*46</i>	v	b	a
<i>DRB3.2*47</i>	w	a	a
<i>DRB3.2*48</i>	w	b	a
<i>DRB3.2*49</i>	w	b	e
<i>DRB3.2*50</i>	x	b	a
<i>DRB3.2*51</i>	g	a	a
<i>DRB3.2*52</i>	s	d	a
<i>DRB3.2*53</i>	y	b	a

3.3 Metodología estadística

3.3.1. Frecuencias génicas y genotípicas.

Todos los marcadores autosómicos analizados presentan herencia de tipo codominante, sus frecuencias genotípicas (X_{ii} , X_{ij}) se estimaron por recuento directo de los genotipos observados sobre el número total de animales analizados.

Las frecuencias génicas se obtuvieron según la siguiente fórmula:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum_{i \neq j} n_{ij}}{2n} \quad (1)$$

donde: n_{ii} indica el número de animales homocigotas para el alelo i y n_{ij} indica el número de animales heterocigotas, siendo j cualquier alelo distinto de i .

La varianza en la estimación de la frecuencia x_i se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$V(x_i) = \frac{x_i(1 - x_i)}{2n} \quad (2)$$

Siendo el error estándar la raíz cuadrada de $V(x_i)$.

3.3.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Según el principio de Hardy-Weinberg las frecuencias genotípicas esperadas en el equilibrio pueden ser estimadas sobre la base del producto de las frecuencias génicas:

$$\begin{aligned} X_{ii} &= x_i^2 && \text{para los homocigotas } XiXi \\ X_{ij} &= 2x_i x_j && \text{para los heterocigotas } XiXj \end{aligned} \quad (3)$$

Para estimar las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las proporciones teóricas propuestas por HWE se utilizó el índice F_{IS} propuesto por Wright (1943; 1951; 1965).

El parámetro F_{IS} ha sido definido como la probabilidad que dos genes homólogos en un individuo “I” sean idénticos por ascendencia dentro de una población. También puede ser definido como la correlación entre genes homólogos en un individuo “I”, en relación con genes extraídos al azar de la subpoblación.

El índice F_{IS} en una población es igual a:

$$F_{is} = \frac{X_{ii} - x^2}{x(1-x)} \quad (4)$$

donde x es la frecuencia del alelo A_1 y X_{ii} la frecuencia genotípica de los homocigotas A_1A_1 en la población.

En el caso de loci multialélicos el valor de F_{IS} varían de alelo a alelo. Sin embargo, en estos casos puede estimarse como:

$$F_{is} = \frac{(h_s - h_o)}{h_s} \quad (5)$$

siendo $h_s = 1 - \sum_i x_i^2$ y $h_o = 1 - \sum_i X_{ii}$

donde x es la frecuencia del alelo A_1 , X_{ii} la frecuencia genotípica de los homocigotas A_1A_1 y h_s y h_o corresponden a la heterocigosidad esperada y observada, respectivamente.

La estimación de las probabilidades del HWE se realizó a través del Hardy-Weinberg *exact test* o *probability test* incluidos en el programa GENEPOP 3.1 (Haldane, 1954; Weir, 1990; Guo y Thompson, 1992), utilizando el algoritmo de *Markov Chain* (Guo y Thompson, 1992) cuando el número de alelos fue mayor que cuatro. Para evaluar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en el conjunto de loci se utilizó el test exacto de Fisher (Raymond y Rousset, 1995a).

Los test exactos consisten en explorar el conjunto de todas las posibles frecuencias genotípicas obtenidas a partir de las frecuencias génicas observadas, y de esta manera comprobar si estas últimas son poco probables bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg. Para ello, se calcula la probabilidad bajo el HWE de cada posible genotipo y se las ordena en una tabla de probabilidades acumuladas. Posteriormente, y a partir de esta distribución, se suman las probabilidades de todas las frecuencias genotípicas inferiores o iguales a la observada, correspondiendo esta sumatoria al valor exacto de probabilidad o *P-value*. Una dificultad en la aplicación de los test exactos en el caso de muestras grandes de individuos y/o loci multialélicos, es la enorme cantidad de los posibles genotipos que considerar en los cálculos. Una forma de remediar este problema consiste en la aplicación

del método de *Markov Chain*, el que se basa en explorar el espacio de todas las frecuencias genotípicas posibles para una determinada distribución de frecuencias génicas observadas. El algoritmo de *Markov Chain* genera una muestra lo suficientemente grande de estos posibles genotipos y determina para cada uno, si su probabilidad bajo la hipótesis nula de HWE es inferior a la obtenida para las frecuencias genotípicas observadas. La proporción de estos genotipos muestreados con valores inferiores de probabilidad es una estimación no sesgada de la probabilidad exacta o *P-value*. Para evaluar las hipótesis alternativas de exceso y deficiencia de individuos heterocigotas se utilizó la prueba U (Rousset y Raymond, 1995).

Con el fin de evaluar el HWE global para todos los loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada locus se realizó un test global de HWE utilizando el método de Fisher (Raymond y Rousset, 1995a), el cual combina los valores individuales de p de la siguiente manera (Raymond y Rousset, 1995b):

$$\chi^2_{tot} = -2 \left(\sum_{j=1}^r \ln P_j \right) \quad (6)$$

donde r es el número de loci cuando se calcula la probabilidad global de una raza o el número de poblaciones cuando se calcula la probabilidad global de un locus, P_j es el valor de p para el j -th locus o raza. Este estadístico sigue una distribución de χ^2 con $2 \times r$ grados de libertad.

Este método considera la probabilidad de que al menos un locus en la población o al menos una población de un determinado locus se encuentre en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Cada locus o cada población se utilizan como múltiples estimaciones de la misma hipótesis. Al combinar varias pruebas independientes de χ^2 con un nivel de rechazo del 5% ($\alpha = 0,05$) un porcentaje equivalentes de estos test pueden rechazar erróneamente la hipótesis nula. Una forma de ajustar el nivel de significancia global es aplicar la corrección de Bonferroni (Weir, 1996). El valor de significancia para el test global (α) se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\alpha = 1 - (1 - \alpha')^{1/L} \approx \alpha' / L \quad (7)$$

donde α' es el nivel de significancia para cada test individual y L es el número total de test considerados. Como ejemplo, el valor del nivel de significancia global para un conjunto de 11 poblaciones con un α' individual de 0,05 es: $\alpha = 0,05 / 11 = 0,0045$.

El método de Fisher para el cálculo de probabilidades globales y el ajuste de Bonferroni dependen de la independencia de las probabilidades individuales que se combinan en el test (Weir, 1990).

3.3.3 Diversidad Genética.

Número de alelos

Número de alelos observados (N_a ob)

Algunos autores (Nevo, 1978) proponen la utilización del número observado de alelos por locus (N_a ob) como medida de la variabilidad genética. La dificultad que presenta este estadístico radica en que es altamente dependiente del tamaño muestral, por cuanto el número de individuos muestreados en cada población debe ser aproximadamente el mismo.

Número de alelos esperados (N_a esp)

Una alternativa para evaluar el número de alelos, consiste en estimar dicho parámetro a partir de un muestreo al azar de igual número de individuos por población. Para ello se elaboró un algoritmo en el lenguaje Visual Basic dentro del entorno de programación de la planilla de cálculo EXCEL 2002 (Microsoft, Estados Unidos). Dicho algoritmo consiste brevemente en el re-muestreo al azar y sin reemplazo de un número especificado de individuos (generalmente el número de individuos de la población muestreada con la menor cantidad de ellos). Luego se calcula el número de alelos observados en dicha muestra. Este proceso se repite un número determinado de veces (por ejemplo 1000 iteraciones), y a partir de este conjunto de estimaciones se calcula el promedio de los alelos observados en cada muestra. Al nuevo estimador lo denominamos número esperado de alelos (N_a esp) para diferenciarlo del número observado de alelos (N_a ob).

Heterocigosidad esperada o diversidad alélica (h_e)

La heterocigosidad observada puede ser definida simplemente como la proporción de individuos heterocigotas para un locus en la población. También, puede ser definida como la proporción esperada de loci heterocigotas en un individuo elegido al azar. Este parámetro fue denominado por Nei (1973) como diversidad génica.

En el presente trabajo se calculó la heterocigosidad para cada combinación locus/población a partir de las frecuencias génicas. Considerando una población con

apareamiento al azar, la heterocigosidad esperada para un locus dado (h_e) puede ser definida como:

$$h_e = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \right) \quad (8)$$

donde n es el número de copias génicas en la muestra, x_i es la frecuencia génica del alelo i correspondiente a un locus dado y m es el número de alelos presentes.

La heterocigosidad esperada promedio (H_e) es la media de los valores de h_e obtenidos en cada uno de los loci estudiados asumiendo la presencia de equilibrio de Hardy-Weinberg. Este índice se estimó de la siguiente forma:

$$H_e = \frac{\sum_{j=1}^r h_j}{r} \quad (9)$$

donde h_j es el valor de h_e para el locus j y r es el número de loci estudiados.

3.3.4 Estructura Poblacional

Tests de diferenciación genética

Existen varios procedimientos reportados en la literatura para evaluar la diferenciación genética de las poblaciones (Hudson *et al.* 1992; Raymond y Rousset 1995b; Goudet *et al.*, 1996). El desarrollo de veloces ordenadores y la eficiencia de los algoritmos de cálculo ha permitido el uso de varios test exactos, los cuales se prefieren a los tradicionales test asintóticos (Ej: χ^2) especialmente cuando se consideran loci con muchos alelos infrecuentes. Una importante distinción de los test de diferenciación poblacional es entre aquellos que se basan en la comparación de frecuencias génicas y los que utilizan las frecuencias genotípicas. Los primeros asumen la independencia de los genes dentro de los individuos, lo que equivale a la presencia de HWE al menos en la última generación. Si esta asunción no se cumple, se pueden utilizar las pruebas exactas de diferenciación poblacional basadas en la hipótesis de muestreo independiente de genotipos. Sin embargo, los test basados en frecuencias alélicas, especialmente en poblaciones de pocos individuos, poseen un mayor poder estadístico (Goudet *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se calcularon los test de diferenciación genética y genotípica para cada uno de los 9 microsatélites analizados entre las once razas bovinas estudiadas. Además, se estimó la diferenciación génica y genotípica entre cada par de poblaciones.

Todos los test se realizaron con el programa de computación GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset 1995a).

Las pruebas de diferenciación poblacional utilizan la distribución de frecuencias alélicas en cada población. La hipótesis nula examinada es “La distribución de frecuencias génicas es idéntica en las poblaciones”. Para cada locus, se construye una tabla de contingencia y en cada caso se estima un valor de probabilidad o *P-value* mediante el método exacto de Fisher (Raymond y Rousset, 1995b). La hipótesis nula en los test de diferenciación genotípica es “La distribución genotípica es idéntica en las poblaciones”. De la misma forma que en los test de frecuencia se construye una tabla de contingencia con el número de genotipos en cada población para cada locus. Para cada tabla se calcula un valor de probabilidad o error de tipo I mediante un test exacto (*Log-likelihood -G-*) similar al test de probabilidad de Fisher (Goudet *et al.*, 1996). El *P-value* en ambos casos se calcula como la sumatoria de las probabilidades de todas las tablas de contingencia (con el mismo valor marginal) que mostraron una probabilidad igual o menor que la tabla observada.

Los valores de probabilidad (*P-values*) de diferenciación poblacional génica y genotípica para cada locus en cada par de poblaciones se combinaron mediante el método de Fisher (ver ecuación 6) de una forma similar al test global de HWE. El nivel de confianza para la prueba de χ^2 se ajustó mediante el método de Bonferroni (Weir, 1996).

Indices de fijación (estadísticos F)

Los índices de fijación o estadísticos-F, fueron inicialmente concebidos por Sewal Wright en las décadas del 30 y 40. Wright propuso calcular las desviaciones de las frecuencias genotípicas en una población subdividida en términos de tres parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . En la terminología de Wright, F_{IS} y F_{IT} son correlaciones entre los genes de un individuo relativas a la subpoblación y relativas al total, respectivamente (el F_{IS} determina las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en la subpoblación). Mientras que el F_{ST} es la correlación de dos genes muestreados al azar de cada subpoblación o en otras palabras, la varianza estandarizada de las frecuencias génicas entre las subpoblaciones. El F_{ST} evalúa el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones. Los tres índices se relacionan por la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = 1 - \frac{(1 - F_{IT})}{(1 - F_{IS})} \quad (10)$$

Nei (1977) redefinió los índices F sin utilizar el concepto de correlación de gametos y demostró que los tres estadísticos pueden describirse utilizando las heterocigosis observadas y esperadas (Nei, 1987).

Otro estimador de subdivisión genética, ampliamente utilizado, y que es aproximadamente equivalente al F_{ST} , es el índice θ (Weir y Cockherham, 1984). El índice θ es definido como uno de los componentes de la varianza (varianza entre poblaciones) en un test de ANOVA (Weir, 1990).

Nei (1973) propone un análisis de subdivisión poblacional, denominado G_{ST} , que no descansa sobre el conocimiento de las frecuencias genotípicas y puede ser calculado en función de las frecuencias génicas en términos de la heterocigosidad esperada dentro y entre poblaciones. Este método posee la ventaja de no ser afectado por el número de alelos por locus y el sistema reproductivo del organismo. El coeficiente de diferenciación génica G_{ST} puede ser calculado de la siguiente manera:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T \quad (11)$$

donde D_{ST} es el promedio de la heterocigosidad esperada o diversidad génica entre las subpoblaciones y H_T es la diversidad génica en la población total (Nei, 1973).

Otro estimador de subdivisión genética es el R_{ST} (Slatkin, 1995). El índice R_{ST} se basa en el *Step Wise Model* y tiene en cuenta, además de las frecuencias génicas, el tamaño de los alelos. Se calcula de una forma similar al análisis de la varianza (ANOVA).

En este trabajo se calcularon para cada loci los índices F_{ST} , G_{ST} y R_{ST} utilizando el programa de computación FSTAT 2.8 (Goudet, 1999).

Análisis molecular de la varianza (AMOVA)

Una forma de estudiar la estructura genética de las poblaciones es mediante el análisis de la varianza de las frecuencias génicas. El AMOVA, fue definido inicialmente por Cockerham (1963; 1969) y extendido por otros autores (Weir y Cockerham, 1984). El método de cálculo utilizado en el AMOVA posee la ventaja de permitir la evaluación de las diferencias entre grupos de poblaciones definidas arbitrariamente.

El AMOVA es un análisis jerárquico que consiste en la partición de la varianza genética total en componentes de covarianzas debidos a diferencias entre los individuos dentro de cada población, a diferencias entre las poblaciones y a diferencias entre los grupos de poblaciones (Weir, 1996).

El análisis de varianza de las razas incluidas en este trabajo se realizó con el programa de computación ARLEQUIN 2.0 (Excoffier, 1992).

3.3.5 Análisis filogenético

Distancias genéticas

Las distancias genéticas cuantifican el grado de diferenciación entre dos taxones (conjuntos de individuos) y pueden ser consideradas de varias maneras. Algunos autores las interpretan como mecanismos de reducción de información (Weir, 1990), una vez que transforman toda la información genética disponible sobre las relaciones entre dos taxones en un número único. Muchas distancias buscan cuantificar las transformaciones evolutivas que ocurren desde la separación de dos taxones. Estas “distancias evolutivas” son adecuadas para el proceso de inferencia filogenética una vez que las cantidades de diferenciación entre dos taxones son teóricamente proporcionales al tiempo de separación de los mismos. A través de dichas estimaciones es posible la reconstrucción de historias evolutivas, pues un árbol evolutivo expresa justamente una secuencia temporal de eventos de separación de taxones.

Las estimaciones del tiempo de separación entre taxones se basan en dos elementos: a) las diferencias observadas entre ellos y b) un modelo evolutivo que explica como surgen tales diferencias. Las diferencias observadas entre los taxones no se corresponden directamente con el tiempo transcurrido desde su separación, y por lo tanto deben ser analizadas a la luz de modelos que revelen como tales diferencias se acumulan a lo largo del tiempo.

Takesaki y Nei (1996), han recomendado la utilización de las distancias genéticas D_C (distancia de cuerda, Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) y D_A (Nei *et al.*, 1983) para la construcción de árboles filogenéticos a partir de frecuencias génicas en poblaciones relacionadas donde la deriva genética es la principal determinante de la diferenciación evolutiva. Estas distancias deberían ser de utilidad en el caso de las razas bovinas, la mayoría de las cuales se han formado hace menos de 500 años. La distancia geométrica D_C esta basada en el tamaño de la cuerda asociada al ángulo de separación entre las frecuencias génicas de dos poblaciones representadas como puntos en un espacio hiperdimensional (tantas dimensiones como alelos tiene un loci), y se calculó de la siguiente manera:

$$D_C = \frac{2}{\prod r} \sum_{j=1}^r \sqrt{2 \left(1 - \sum_{i=1}^k \sqrt{x_{ij} y_{ij}} \right)} \quad (12)$$

donde x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del alelo i -th de el locus j -th en las poblaciones x e y respectivamente, k es el número de alelos en el locus j -th y r es el número de loci (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967).

La distancia D_A fue propuesta originalmente por Cavalli-Sforza (1969) y modificada posteriormente por Nei y colaboradores (1983) para corregir los errores introducidos por la dependencia del tamaño muestral y de la presencia de alelos raros. Este índice se estimó de la siguiente forma:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^k \sqrt{x_{ij} y_{ij}} \quad (13)$$

donde x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del alelo i -th de el locus j -th en las poblaciones x e y respectivamente, k es el número de alelos en el locus j -th y r es el número de loci (Nei *et al.*, 1983).

Recientemente, se han propuesto nuevas medidas de distancias genéticas que pueden ser utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos a partir de microsatélites (por ejemplo: $(\delta\mu)^2$ de Goldstein *et al.*, 1995; D_{SW} de Shriver *et al.*, 1995). Estas distancias están basadas en el modelo de mutaciones *Stepwise* (SWM) y tienen en cuenta no solo las diferencias en las frecuencias génicas sino también en el número de repeticiones de los STR. La distancia D_{SW} puede ser calculada como:

$$D_{SW} = W_{XY} - \frac{(W_X + W_Y)}{2} \quad (14)$$

$$W_{XY} = \frac{\sum_k \sum_{i \neq j} (|i - j| x_{ik} y_{jk})}{r},$$

$$W_X = \frac{\sum_k \sum_{i \neq j} (|i - j| x_{ik} x_{jk})}{r},$$

$$W_Y = \frac{\sum_k \sum_{i \neq j} (|i - j| y_{ik} y_{jk})}{r}$$

donde x_{ik} e y_{ik} son las frecuencias génicas del alelo i -th del locus k en las poblaciones x e y respectivamente, $|i - j|$ corresponde a la diferencia absoluta en el número de repeticiones de los alelos i -th y j -th y r es el número de loci.

Mientras que las distancias D_A y D_C no son proporcionales al tiempo evolutivo (Nei *et al.*, 1996), se ha reportado que la distancia D_{SW} se mantiene de forma lineal con el tiempo hasta unas 300.000 generaciones (Jin *et al.*, 1996). De esta manera, esta distancia sería de utilidad para la construcción de filogenias que incluyan a los grupos más divergentes entre los bovinos (McHugh *et al.*, 1997).

Las matrices y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el programa de computación POPULATIONS 1.2.28 (Langella, 2000). Para la edición del dendograma, se empleó el programa TreeView 1.6.6. (Page, 2001).

Construcción de árboles filogenéticos

En este trabajo, los árboles filogenéticos se construyeron a partir de las matrices de distancia D_A , D_C y D_{SW} utilizando los métodos de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y *neighbor-joining* –NJ– (Saitou y Nei, 1987).

El algoritmo UPGMA opera de la siguiente manera:

1. Une el par de taxones más semejantes. El tamaño de sus ramas es igual a la mitad de la distancia entre los dos taxones.

2. El par de taxones recién unidos forma ahora un taxón compuesto y su distancia con otro taxón se calcula como la media aritmética de las distancias entre cada uno de los taxones que componen la unidad compuesta, y el taxón que se está comparando. De nuevo, la menor distancia en la nueva matriz determina que taxón debe ser unido y el nodo es posicionado a mitad de camino entre los dos taxones.

3. El procedimiento se repite hasta que todos los taxones se han incorporado al dendograma.

El método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) produce árboles en el cual las ramas que parten del mismo nodo poseen el mismo tamaño, lo que evolutivamente corresponde a tasas de evolución constante

Saitou y Nei (1987) propusieron un algoritmo para obtener árboles filogenéticos denominado *neighbor-joining* (NJ) y que no requiere tasas constantes de evolución. Este método une los taxones de una forma tal que se minimice el tamaño total de las ramas del árbol inferido. El algoritmo es más complejo que el del UPGMA, y en líneas generales opera a través de la adición sucesiva de taxones a un núcleo inicial, siempre incorporando nuevos taxones de modo de minimizar el aumento en la longitud del árbol. La topología final del dendograma presenta ramas de diferentes tamaños, que representan tasas de evolución variables.

Para cada uno de los árboles construidos en este trabajo se realizó un test de *bootstrap* de loci con 1000 iteraciones. El método consiste en el remuestreo con reposición

de loci, un número determinado de veces o iteraciones. En cada muestra se realiza una nueva matriz y se genera un árbol utilizando el mismo método. Los valores de *bootstrap* indican el porcentaje de estos árboles que presentaron un agrupamiento determinado.

El número obtenido por el análisis de *bootstrap* es utilizado frecuentemente como una estimación de la confiabilidad de la inferencia. Esta confiabilidad, no se refiere a la probabilidad de que la inferencia sea correcta. Se pueden obtener altos valores de *bootstrap* para inferencias incorrectas, en situaciones donde los datos disponibles y/o los métodos empleados generen errores sistemáticos en la topología de los árboles muestreados.

3.3.6 Análisis multivariado

Una alternativa a la utilización de los árboles filogenéticos para el estudio de las relaciones genéticas entre las poblaciones o especies, es la aplicación de las técnicas multivariantes. Cavalli-Sforza y sus colegas, se encuentran entre los pioneros en la aplicación de esta metodología para el estudio de las variaciones genéticas entre las poblaciones (Chen *et al.*, 1985; Cavalli-Sforza y Piazza, 1993).

Los procedimientos multivariados son particularmente atractivos cuando se conoce o sospecha de la ocurrencia de mezcla genética entre las poblaciones estudiadas, ya que este fenómeno contradice los principios generales de los métodos de reconstrucción filogenética (Felsenstein, 1982). Esta situación es frecuente en la dinámica poblacional de las razas bovinas (Grosclaude *et al.*, 1990; MacHugh *et al.*, 1997, Cymbrón *et al.*, 1999; Giovambattista *et al.*, 2000; Mirol *et al.*, 2003). Otra virtud del análisis multivariado es que permite la incorporación de diferentes tipos de marcadores genéticos (polimorfismos bioquímicos, grupos sanguíneos, microsatélites, SNPs, etc.) y morfológicos.

En el presente trabajo, con el fin de estudiar las relaciones genéticas entre las razas estudiadas se utilizó el análisis de componentes principales -ACP- (Mardia, 1979). Sin embargo, existen otros métodos multivariados alternativos, como el análisis de correspondencia (Hill, 1974) y el escalamiento multidimensional (Carroll, 1981). En general, estas herramientas buscan condensar la información genética contenida en el conjunto de alelos y loci en unas pocas variables sintéticas denominadas componentes principales.

El ACP se obtiene calculando los coeficientes de correlación entre todos los pares de caracteres (en este caso frecuencias génicas de cada población). Sin embargo, las frecuencias alélicas frecuentemente se transforman dividiéndolas por la desviación estándar de la media correspondiente al conjunto de poblaciones analizadas (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994):

$$f(x_{ik}) = \frac{x_{ik}}{\sqrt{\bar{x}(1-\bar{x})}} \quad (15)$$

donde x_{ik} es la frecuencia génica de los k -th alelos en las i -th poblaciones y $\bar{x}$ es la media de las frecuencias alélicas de todas las poblaciones. Esta transformación es necesaria, porque el primer componente suele indicar las diferencias entre los promedios de las frecuencias génicas.

Para realizar el ACP, partir de las frecuencias génicas transformadas, se utilizó el programa PAST (*PAleontological STatistics*; Hammer *et al.*, 2003).

3.3.7 Cálculo del porcentaje de mezcla genética

En el curso de la evolución, las poblaciones que han permanecido aisladas entre sí por largos períodos de tiempo a causa de factores geográficos, ecológicos o culturales ocasionalmente pueden entrar en contacto. De esta manera, el posible intercambio de genes genera poblaciones híbridas con ciertas características genéticas, como por ejemplo la presencia de frecuencias alélicas intermedias a las parentales (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1995) y el desequilibrio de ligamiento entre loci independientes (Nei, 1973). Se han propuesto varios estadísticos con el fin de estimar la contribución relativa de las poblaciones parentales a la población híbrida (Chakraborty, 1986), la mayoría de los cuáles se basan en la utilización de las frecuencias génicas. Estas metodologías asumen que las frecuencias alélicas encontradas en la población híbrida surgen como combinaciones lineales de las frecuencias génicas de las poblaciones originales, y suponen que el efecto de la deriva genética luego de la mezcla es insignificante. Bertorelle y Excoffier (1998) proponen un nuevo método denominado mY para estimar el porcentaje de introgresión, basado en el tiempo medio de coalescencia de los genes. Dicho estimador incluye, además de la información proveniente de las frecuencias génicas, las distancias moleculares entre los diferentes alelos. El índice mY se calculó utilizando el programa de computación ADMIX 1.0 (Bertorelle y Excoffier, 1998).

La estimación del porcentaje de introgresión de genes índicos o taurinos en las razas criollas se realizó a partir de la distribución de frecuencias génicas de los nueve microsatélites autosómicos analizados utilizando el coeficiente de mezcla mY (Bertorelle y Excoffier, 1998). Las frecuencias génicas de la población parental cebuina se calcularon como el promedio de las razas Nelore y Brahman, mientras que las frecuencias de población

parental taurina se calcularon promediando las razas Aberdeen Angus, Holando, Hereford y Jersey.

Otra metodología ampliamente utilizada para evaluar el grado de mezcla génica se basa en la utilización de genes privativos de razas. En el presente trabajo se calculó el porcentaje de introgresión de genes índicos en las razas criollas utilizando cinco alelos privativos del grupo cebuino correspondientes a tres loci (*ETH225.153*, *ETH225.157*, *ETH225.159*, *TGLA227.79*, *TGLA122.136*). Estos alelos se presentaron con frecuencias apreciables en las razas Nelore y Brahman y estuvieron ausentes en las razas Aberdeen Angus, Hereford, Holando y Jersey. El porcentaje de introgresión de genes índicos por vía paterna, se calculó a partir de las frecuencias génicas de los alelos de 124 pb y 88 pb, correspondientes a los microsatélites *INRA124* e *INRA189*, respectivamente. Estos alelos han sido reportados como álelos privativos del grupo Índico.

3.3.8 Determinación de la raza de origen de los individuos

En los últimos tiempos se ha generalizado el uso de marcadores genéticos con elevado grado de polimorfismo, como los microsatélites en los estudios de diversidad y estructura genética de las poblaciones. Asociado a estas aplicaciones ha surgido un creciente interés sobre la posibilidad de utilizar estos marcadores para asignar individuos a determinadas poblaciones o razas. La metodología de asignación se ha utilizado para diferentes propósitos, como por ejemplo la demarcación de poblaciones (Paetkau *et al.*, 1995; MacHugh *et al.*, 1998; Primer *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 1999; Bjornstad y Roed, 2002), estudios poblacionales en especies migratorias (Haig *et al.*, 1997), determinación del origen de poblaciones contemporáneas (Nielsen *et al.*, 1997) y resolución de un caso forense (Primmer *et al.*, 2000). Además, estas técnicas son potencialmente aplicables a la conservación y manejo de recursos genéticos, así como también a la trazabilidad de alimentos procedentes de especies domésticas o silvestres.

Se ha desarrollado una gran variedad de metodologías de análisis estadístico con el fin de asignar los individuos a sus poblaciones de origen (Bowcock *et al.*, 1994; Ciampolini *et al.*, 1995; Paetkau *et al.*, 1995; Rannala y Mountain, 1997; Cornuet *et al.*, 1999; Pritchard *et al.*, 2000; Bjornstad y Roed., 2001). Una primera clasificación, las agrupa según la clase de datos utilizados en:

a) *métodos generales*: los cuales pueden aplicarse a una amplia gama de datos. Entre ellos, se encuentran el análisis discriminante y las redes neuronales (Taylor *et al.*, 1994; Cornuet *et al.*, 1996).

b) *métodos genéticos*: se basan en la información aportada por los genotipos de cada individuo y por las frecuencias génicas de las poblaciones candidatas. Dentro de esta categoría se han desarrollado tres metodologías diferentes:

- I) Métodos de distancias genéticas.
- II) Métodos de frecuencias.
- III) Métodos bayesianos.

Métodos de distancias genéticas entre individuos

Los métodos de asignación basados en distancias genéticas se basan en los mismos principios que se aplican al estudio de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. No obstante, se considera en estos casos a los individuos como unidades taxonómicas operacionales (*OTUs*). Bowcock y colaboradores en 1994, desarrollaron una distancia genética denominada *allele-sharing* (D_{AS}), que se estima como el complemento de los alelos compartidos entre dos individuos:

$$D_{AS} = 1 - \left(\sum_{j=1}^r i_{AS} / 2r \right) \quad (16)$$

donde r es el número de loci e i_{AS} es una variable lógica que toma para el j -th locus los siguientes valores:

$$i_{AS} = \begin{cases} 0 & \text{si no se comparten alelos} \\ 1 & \text{si se comparte un alelo} \\ 2 & \text{si se comparten los dos alelos} \end{cases}$$

En este trabajo se utilizó la distancia D_{AS} y el método de construcción de filogenias de *neighbor-joining* (NJ) para construir un árbol filogenético a partir de 15 individuos por raza.

La distancia D_{AS} presenta dos limitaciones importantes para el cálculo de distancias genéticas. Primero, no incorpora las diferencias de tamaño entre los alelos y segundo, alcanza rápidamente un punto de saturación que involucra a los individuos que no comparten alelos, a pesar que algunos de ellos pertenezcan a la misma población. Para aminorar estas desventajas, se han desarrollado otras distancias que tienen en cuenta no sólo los alelos compartidos entre los individuos, si no también las diferencias de tamaño entre los alelos. Una de estas medidas de diferenciación entre individuos es la distancia D_{SWASM} -*stepwise allele shared measure*- (MacHugh, 1996) que consiste simplemente en el

número mínimo de pasos (expresados en unidades de repetición) requerido para transformar el genotipo de un individuo en el genotipo de otro. Se calcula como el número promedio de cambios por locus:

$$D_{SWASM} = \left(\sum_{j=1}^r \min\{\text{genotipo } A \leftrightarrow \text{genotipo } B\} \right) / r \quad (17)$$

donde r es el número de los j -th loci. Por ejemplo, la distancia mínima entre dos individuos de genotipos 4/6 y 8/10 corresponde a $(8 - 4) + (10 - 6) = 8$.

En el análisis filogenético de individuos y en los demás métodos de asignación racial se estudiaron solamente las razas criadas en la Argentina (Aberdeen Angus, Holando, Hereford, Nelore, Brahman, Criolla Argentina y Jersey). Con el fin de evitar la superposición de los individuos en los dendogramas, sólo se incluyeron los 10 individuos tipificados de la raza Jersey y 15 animales elegidos al azar de cada una de las demás poblaciones. Las matrices de distancias genéticas D_{AS} y D_{SWASM} se calcularon con un algoritmo desarrollado en el entorno de programación Visual Basic, incluido en la planilla de cálculos EXCEL 2002 (Microsoft, EEUU). Para cada una de las distancias se realizó un árbol filogenético de individuos con el método de *neighbor-joining* utilizando el programa POPULATION 1.2.28. Para la edición del dendograma, se empleó el programa TreeView 1.6.6.

Métodos de frecuencias

Este método inicialmente desarrollado por Paetkau y colaboradores (1995), asigna un individuo a la población en donde su genotipo posea la mayor probabilidad de ocurrencia. Suponiendo que se han tipificado j -th loci independientes en las i -th poblaciones de referencia, la frecuencia del alelo k es p_{ijk} . Si se asume que la población está en equilibrio de Hardy-Weimberg, la probabilidad de ocurrencia de un genotipo $A_k A_{k'}$ en el locus j -th de la población i -th es igual a $(p_{ijk})^2$ si $k = k'$ y a $2 p_{ijk} p_{ijk'}$ si no lo son. Si además se asume que existe independencia entre los j loci, la probabilidad de un conjunto de genotipos es igual al producto de las probabilidades de cada uno ellos. Entonces, el método de frecuencias consiste en tres etapas: i) calcular las frecuencias génicas en las poblaciones candidatas; ii) estimar la probabilidad de ocurrencia del genotipo multilocus en cada población candidata, y iii) asignar el individuo a la población en la que la probabilidad del genotipo multilocus sea mayor.

Existen dos variantes principales del procedimiento de frecuencias para evaluar la asignación de los individuos a las razas, el método directo (Paetkau *et al.*, 1995) y el de simulación de genotipos (Buchanan *et al.*, 1994). El método directo, como se explicó en el párrafo anterior, asigna un individuo a la población donde su genotipo posea la mayor probabilidad de ocurrencia. Para ello, se remueve al individuo de su población de origen y se recalcula las frecuencias génicas. El método de simulaciones consiste en la generación de una gran cantidad de genotipos multilocus (generalmente 1000) para cada población utilizando las frecuencias génicas observadas en cada una de ellas y asumiendo equilibrio de Hardy-Weimberg e independencia entre los loci. Para cada individuo simulado se calcula la probabilidad de pertenecer a cada raza y luego se asigna a la de mayor valor.

En el presente trabajo se utilizó el método basado en simulación de frecuencias, con el fin de evaluar la asignación de los individuos a sus respectivas razas. De la misma manera que en la construcción de los árboles filogenéticos de individuos, se incluyeron en este análisis solamente las siete razas criadas en la Argentina. Para cada una de ellas y con el objeto de evaluar la asignación en un número reducido de loci, se simularon un número variable de genotipos multilocus tratando de explorar la mayor parte del espacio combinatorio formado por los arreglos de 1 a 9 microsatélites. De esta forma, para cada una de las poblaciones se simularon 1000 genotipos y este análisis se llevó a cabo en diferentes situaciones, como por ejemplo: 9 loci individuales, 8 combinaciones de 2 loci, 7 combinaciones de 3 loci, 6 combinaciones de 4 loci, y así hasta considerar los 9 loci conjuntamente.

Otro supuesto que presenta el método de frecuencias, a parte de los ya mencionados anteriormente (HWE e independencia entre los loci), es que las frecuencias génicas de la muestra no se desvíen de las poblacionales. Esta dificultad se suma al hecho que los microsatélites poseen alelos en muy baja frecuencia que pueden no estar representados en la muestra. Cuando un individuo posee un alelo que no esta presente en una determinada población ($p_{ijk} = 0$) el producto de las probabilidades para los genotipos individuales es igual a cero, descartándose *a priori* la oportunidad de que este individuo pertenezca a tal población. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a la existencia de alelos en baja frecuencia no incluidos en la muestra. Para sortear este inconveniente, las frecuencias nulas se reemplazaron por un valor constante de 0,01 (equivalente a la frecuencia de un alelo presente en sólo una copia en una población de 50 individuos).

En este estudio, los cálculos de asignación se realizaron con un algoritmo desarrollado en el entorno de programación Visual Basic, utilizando las herramientas facilitadas por la planilla de cálculos Excel 2002. Para evaluar el grado de asociación lineal entre la proporción de individuos correctamente asignados y las variables heterocigosidad

esperada, número de alelos y el índice F_{ST} se estimó el índice de correlación de Spearman utilizando el programa SPSS 10.0.1 (SPSS Inc., LEAD Technologies, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

Métodos bayesianos

Se han mencionado dos limitaciones del método de frecuencias: 1) no provee un valor de confianza o error de tipo I; 2) siempre asigna el individuo a una determinada población. Si la verdadera población de origen del individuo no está representada en el conjunto de poblaciones de referencia, el método asignará el individuo a una población incorrecta (Cornuet *et al.*, 1999). Estos autores inspirados en Rannala y Mountain (1997) propusieron un nuevo método de asignación individual basado en simulaciones. Brevemente, el procedimiento realiza para cada población una simulación de 10.000 genotipos utilizando las frecuencias génicas de la población y calcula la probabilidad que un individuo pertenezca a una determinada población estimando las veces en que su genotipo fue observado en la muestra. Un valor umbral de exclusión se fija previamente (generalmente entre 0,05 y 0,001) para considerar a un individuo asignado o excluido de una población. De esta manera, un individuo es considerado correctamente asignado si supera el umbral de probabilidad para una sólo población de referencia.

3.3.9 Estadísticos forenses

Poder de exclusión

La disponibilidad de varias técnicas de análisis de la variabilidad genética como los polimorfismos bioquímicos, los grupos sanguíneos y especialmente los marcadores de ADN, ha permitido su aplicación como herramientas de utilidad en la identificación individual y en el control de filiación. Una forma de cuantificar la eficacia de un conjunto particular de marcadores genéticos es calcular la probabilidad de exclusión (PE) *a priori*, la que se define como la probabilidad que un sistema genético específico confiera evidencias que conduzcan a la exclusión de un determinado suceso (ejemplo, la paternidad discutida de un padre, la correspondencia entre la evidencia y la referencia en casos forenses, etc.). En el presente trabajo, se evaluó el poder de exclusión de nueve microsatélites (*BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53*) en las razas bovinas de mayor importancia económica de la Provincia de Buenos Aires (Aberdeen Angus, Holando, Hereford, Nelore, Brahman). Este índice se evaluó en el contexto de diferentes escenarios que se presentan frecuentemente en los casos de paternidad e identificación individual. En

todas las situaciones analizadas se considera que los marcadores genéticos utilizados poseen herencia de tipo codominante y equilibrio de Hardy-Weinberg.

l) *Paternidades*: se analizó el polimorfismo genético de varios loci correspondientes a la cría y a los padres con el fin de determinar el parentesco. Se analizan tres situaciones:

a) Determinación del poder de exclusión de un padre putativo (p) contando con la información del genotipo de la cría (c) y de la madre (m). Esta situación corresponde también a la determinación de una maternidad dudosa si se posee la información genética del padre y de la cría. La probabilidad de exclusión de un locus (Jamieson y Taylor, 1997) es igual a:

$$PE(p/m, c) = 1 - 2 \sum_{i=1}^k x_i^2 + \sum_{i=1}^k x_i^3 + 2 \sum_{i=1}^k x_i^4 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^k x_i^2 \sum_{i=1}^k x_i^3 \quad (18)$$

donde x_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y k es el número de alelos. La notación $PE(p/m, c)$ corresponde a el poder de exclusión del padre p dada la información de genética de la madre m y la cría c .

b) Determinación del parentesco de un progenitor putativo (generalmente el padre) cuando la información genética del otro progenitor no está disponible. En este caso la probabilidad (Jamieson y Taylor, 1997) se calculó como:

$$PE(p/c) = 1 - 4 \sum_{i=1}^k x_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^k x_i^3 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^4 \quad (19)$$

donde x_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y k es el número de alelos.

c) Determinación de la filiación de ambos padres (por ejemplo, sustitución de crías). En esta situación la probabilidad de exclusión (Jamieson y Taylor, 1997) se estima como:

$$PE(p, m/c) = 1 + 4 \sum_{i=1}^k x_i^4 - 4 \sum_{i=1}^k x_i^5 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 8 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^k x_i^3 \right) + 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^3 \right)^2 \quad (20)$$

donde x_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y k es el número de alelos.

II) *Identificación Individual* (por ejemplo abigeato): se determina si el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia, r) se corresponde con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia, e). El poder de exclusión de un locus cuando se comparan dos genotipos (evidencia y referencia), también denominado poder de discriminación, se obtiene como el complemento de la probabilidad que dos individuos tomados al azar de la población presenten genotipos idénticos (*matching*). En este caso se calculó como:

$$PE(e/r) = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^4 - \sum_{j>i=1}^k 4x_i^2 x_j^2 \quad (21)$$

donde x_i e x_j corresponde a la frecuencia génica de los i -th y j -th alelos y k al número de alelos. El segundo término de la fórmula corresponde a la sumatoria de todas las combinaciones posibles de genotipos heterocigotas $x_i x_j$ (sin tener en cuenta el orden).

Probabilidad de exclusión combinada simple y doble

La eficacia conjunta de varios marcadores genéticos para excluir a un individuo se puede cuantificar mediante el cálculo de la probabilidad que se produzca la exclusión en uno o más loci. De esta manera, la probabilidad de exclusión combinada simple (PEC_S) se calculó como (Boyd, 1954; Weir, 1990):

$$PEC_S = 1 - \prod_r (1 - PE_i) \quad (22)$$

donde PE_i corresponde a la probabilidad de exclusión del i -th locus y r al número de loci.

Para reducir el efecto de los errores de tipificación genética, de las mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y de la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995) se ha sugerido la aplicación del criterio de exclusión en más de un locus. La probabilidad de exclusión combinada de dos o más loci (PEC_D) puede ser calculada como uno menos la probabilidad que ocurra exactamente una exclusión (Chakraborty *et al.*, 1974):

$$PEC_D = 1 - \prod_r (1 - PE_i) - \sum_r PE_i \prod_{i \neq j} (1 - PE_j) \quad (23)$$

donde PE_i corresponde a la probabilidad de exclusión del i -th locus, r al número de loci, y PE_j al poder de exclusión individual de los j -th loci diferentes del i -th locus considerado en cada término del producto.

Indice forense o “likelihood ratio” (L)

El índice forense es una forma de cuantificar el peso de la evidencia genética. La verosimilitud L de una hipótesis H dada la evidencia E puede expresarse como $L(H \setminus E)$. La verosimilitud de una hipótesis (Ej. H_1) se evalúa siempre en forma relativa a otra hipótesis (H_2). Esta comparación se denomina razón de verosimilitud:

$$L(H_1, H_2 \setminus E) = \frac{P(E \setminus H_1)}{P(E \setminus H_2)} \quad (24)$$

donde $P(E \setminus H_1)$ es la probabilidad condicional de la evidencia E bajo la hipótesis H_1 .

En los casos de identificación individual se compara el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia) con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia). Por lo tanto, en el marco de las probabilidades condicionales el termino E corresponde a los genotipos de las dos muestras biológicas analizadas (evidencia y referencia). Las hipótesis alternativas a contrastar son las siguientes:

H_1 : la muestra secuestrada a los imputados (evidencia) perteneció al mismo individuo que los restos orgánicos correspondientes a los animales faenados ilegalmente (referencia).

H_2 : la muestra secuestrada a los imputados no se corresponde con el animal faenado y por ende corresponde a otro animal tomado al azar de la población.

Si denominamos al genotipo de la evidencia como G_e y al genotipo de la muestra de referencia como G_r . El índice forense (Evet y Weir, 1998) se estima como:

$$L = \frac{\Pr(G_r \setminus G_e, H_1)}{\Pr(G_r \setminus G_e, H_2)} \quad (25)$$

Si se considera la primera hipótesis, en donde las muestras de referencia y evidencia pertenecen al mismo individuo y no existen errores en la tipificación de los marcadores genéticos, el numerador de la fórmula 25 es igual a 1. Entonces, el índice L se transforma en:

$$L = \frac{1}{\Pr(G_r \setminus G_e, H_2)} \quad (26)$$

Para asignar el valor del denominador de la fórmula 26, se debe responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la probabilidad de observar el genotipo de la evidencia G_r , si la muestra de la evidencia pertenece a otro individuo diferente del que aportó la muestra de referencia? Si se considera a “otro individuo” como un animal tomado al azar de la población de origen de la muestra secuestrada, la probabilidad que la evidencia y la referencia posean idéntico genotipo depende de las frecuencias génicas de dicha población. De esta forma el índice L se calcula como:

$$L = \frac{1}{P} \quad (27)$$

Donde P es la frecuencia genotípica en la población de origen de la evidencia. En la sección *Metodologías Estadísticas Empleadas para la Resolución de Casos de Abigeato* se describe en más detalle la definición de “población de origen de la evidencia”.

En el contexto de la inferencia de paternidades, la evidencia E corresponde a los genotipos de la cría, madre y padre alegado en un locus particular. Las hipótesis alternativas en este caso son:

H_1 : el padre alegado es el padre biológico de la cría.

H_2 : el padre alegado no es el padre biológico y corresponde por tanto a un individuo no relacionado seleccionado al azar de la población.

Si se considera el caso de paternidad más frecuente, donde se conocen los genotipos del padre alegado (G_p), de la cría (G_c) y de la madre (G_m), el índice de paternidad (L) se estima como (Pena *et al.*, 1994; Aitkin, 1995; Marshall *et al.*, 1998):

$$L(H_1, H_2 \setminus G_c, G_m, G_p) = \frac{\Pr(G_c \setminus G_m, G_p) \Pr(G_m) \Pr(G_p)}{\Pr(G_c \setminus G_m) \Pr(G_m) \Pr(G_p)} = \frac{\Pr(G_c \setminus G_m, G_p)}{\Pr(G_c \setminus G_m)} \quad (28)$$

En los casos de paternidad donde se desconoce el genotipo materno, el índice de paternidad se calcula de la siguiente manera:

$$L(H_1, H_2 \setminus G_p, G_c) = \frac{\Pr(G_c \setminus G_p) \Pr(G_p)}{\Pr(G_c) \Pr(G_p)} = \frac{\Pr(G_c \setminus G_p)}{\Pr(G_c)} \quad (29)$$

En las Tablas 5 y 6 se indican los valores del índice L para todas las combinaciones de genotipos compatibles para las paternidades con/sin madre conocida, respectivamente. Cuando se utilizan varios marcadores no ligados para inferir una paternidad, el índice L se calcula como el producto del valor obtenido para cada uno de los locus.

Tabla 5. Índices de paternidad (L) para todos los tríos posibles de madre-cría-padre alegado. La letra X representa cualquier alelo diferente de B, mientras que Y es cualquier alelo diferente de B y C. Las frecuencias de los alelos B y C se indican como b y c , respectivamente. G_c , G_p y G_m son los genotipos de la cría, el padre alegado y la madre, respectivamente. El índice L es igual al cociente de la cuarta y quinta columna (ver fórmula 28).

G_c	G_p	G_m	$\Pr(G_c G_m, G_p)$	$\Pr(G_c G_m)$	$L(H1, H2)$
BB	BB	BB	1	b	$1/b$
BB	BX	BB	$1/2$	b	$1/2b$
BB	BB	BX	$1/2$	$b/2$	$1/b$
BB	BX	BX	$1/4$	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	CC	1	b	$1/b$
BC	BX	CC	$1/2$	b	$1/2b$
BC	BB	CY	$1/2$	$b/2$	$1/b$
BC	BX	CY	$1/4$	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	BC	$1/2$	$(b + c)/2$	$1/(b+c)$
BC	BY	BC	$1/4$	$(b + c)/2$	$1/2(b+c)$
BC	BC	BC	$1/2$	$(b + c)/2$	$1/(b+c)$

Tabla 6. Índices de paternidad (L) para todas las combinaciones posibles de cría-padre alegado, en ausencia del genotipo de la madre. La letra X representa cualquier alelo diferente de B, mientras que Y es cualquier alelo diferente de B e C. Las frecuencias de los alelos B y C se indican como b y c , respectivamente. G_c , G_p son los genotipos de la cría y padre alegado, respectivamente. El índice L es igual al cociente de la tercera y cuarta columna (ver fórmula 29).

G_c	G_p	$\Pr(G_c G_p)$	$\Pr(G_c)$	$L(H1, H2)$
BB	BB	b	b^2	$1/b$
BB	BX	$b/2$	b^2	$1/2b$
BC	BB	c	$2bc$	$1/2b$
BC	BY	$c/2$	$2bc$	$1/4b$
BC	BC	$(b + c)/2$	$2bc$	$(b + c)/4bc$

Metodología de asignación de paternidades en situaciones de apareamiento múltiple

Clásicamente, la metodología utilizada en la determinación de paternidades humanas y de animales domésticos (Chakraborty *et al.*, 1974; Jamieson *et al.*, 1997) se basa en la exclusión de todos los posibles padres candidatos de un descendiente particular utilizando la información genética disponible. Si el procedimiento genera solamente la exclusión de todos los padres alegados excepto uno, la paternidad se asigna a dicho individuo. Sin embargo, en los animales domésticos, la práctica de monta colectiva, la presencia de varios

machos candidatos y usualmente la falta de información genética de la madre, provoca frecuentemente que más de un padre putativo resulten no excluidos de la paternidad de una cría determinada (Meagher, 1986). Asimismo, el método de exclusión considera la inconcordancia entre los genotipos de un padre putativo y la cría como evidencia conclusiva de exclusión de la paternidad. Sin embargo, en la práctica estas diferencias pueden originarse por errores de tipificación de los marcadores genéticos, por mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y por la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995).

Para superar los problemas del método de exclusión en la asignación de paternidades se han desarrollado dos metodologías alternativas: 1) asignación fraccionaria (Devlin *et al.*, 1988; Roeder *et al.*, 1989; Smouse *et al.*, 1994, Neff *et al.*, 2001); y 2) asignación categórica (Meagher, 1986; Marshall *et al.*, 1998; Slate *et al.*, 2000). El modelo de asignación fraccionaria descompone la probabilidad de paternidad entre todos los padres putativos no excluidos y genera un intervalo de confianza para cada estimador. La metodología de cálculo y las suposiciones del modelo de asignación fraccionaria se pueden consultar en el trabajo de Neff y colaboradores (2001). La metodología de asignación categórica, utiliza el logaritmo de la razón de verosimilitud (*LOD score*: probabilidad de paternidad de un padre determinado relativa a la probabilidad de paternidad de un padre arbitrario de la población) para seleccionar el padre más probable (Thompson 1975; Meagher, 1986).

Marshall y colaboradores (1998), definieron la variable $+$ como el logaritmo del cociente (diferencia de *LOD scores*) entre las razones de verosimilitud de los dos padres putativos más probables, y realizaron simulaciones de inferencias de paternidades para evaluar la significancia de $+$. La simulación de paternidades consiste en la generación de un número suficiente (generalmente 10.000) de genotipos maternos, paternos y de las crías con el fin de producir una distribución del parámetro $+$. Estos autores, desarrollaron para tal fin un programa de computación denominado Cervus[®] 2.0. El algoritmo de simulación incluye las siguientes variables con el objetivo de hacer el modelo más realista: número de padres candidatos, proporción de padres candidatos muestreados (genéticamente tipificados), número de loci tipificados, tasa de error (fracción de loci tipificados incorrectamente). La última etapa de la simulación consiste en encontrar un valor crítico del parámetro $+$ para comprobar la significancia de los $+$ estimados en el caso de paternidad analizado. Para ello, el programa compara la distribución de $+$ para los casos donde el padre más probable fue el verdadero padre frente a los casos donde el padre más probable no lo fue. Asumiendo por ejemplo un intervalo de confianza del 95%, el programa identifica el valor de $+$, para el que el 95% de los padres verdaderos fueron los más probables.

En este trabajo se describe un caso de asignación de paternidades correspondiente a una disputa judicial entre dos criadores de la raza Holando de la Provincia de Buenos Aires. La metodología propuesta consistió en la determinación de la paternidad de 5 crías y 5 padres candidatos, sin la información del genotipo materno de ninguna de las crías. Para ello, se tipificaron en los 10 animales los 9 microsatélites analizados en esta tesis y el locus *BoLA-DRB3*. La metodología estadística se basó en el modelo de exclusión categórica y se realizó mediante el programa de computación Cervus[®] 2.0 (Marshall *et al.*, 1998).

Metodologías estadísticas empleadas para la resolución de casos de abigeato

En el presente estudio se analizaron un total de 108 muestras correspondientes a 35 casos de robo de ganado bovino que ocurrieron en la Provincia de Buenos Aires. Una vez realizada la tipificación de los marcadores genéticos, la metodología estadística empleada en la resolución de dichos casos se basó en comparar el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia) con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia). La comparación de la evidencia y la referencia condujo a dos resultados alternativos: i) uno o más marcadores no presentaron el mismo genotipo en las dos muestras; y ii) coincidencia en todos los marcadores genéticos analizados. En el primer caso, para concluir que las muestras de referencia y evidencia no pertenecieron al mismo individuo se utilizó el principio de doble exclusión con el objeto de reducir el efecto de los errores de tipificación genética, de las mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y de la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995).

En el segundo caso, la coincidencia entre el perfil genético de las dos muestras, no puede interpretarse como una prueba absoluta que ellas pertenezcan al mismo individuo. Esto se debe a que el perfil genético encontrado, en teoría, puede ser compartido por otro individuo de la población. Por ende, es necesario estimar cuál es la probabilidad de que ese perfil se presente en la población general. En la sección *Índice forense o "likelihood ratio" (L)* se describe brevemente el cálculo del índice *L*, que como se mencionó, cuantifica el peso de la evidencia genética en el caso de coincidencia entre los genotipos de la muestras de referencia (G_r) y evidencia (G_e). Si dada la hipótesis H_2 (la muestra de referencia no pertenece al mismo individuo que la evidencia secuestrada al sospechoso de robo, sino que corresponde a otro individuo diferente de la población) se asume que el individuo que aporta la evidencia no está relacionado genéticamente con el animal faenado, el índice *L* puede ser estimado como el recíproco de las frecuencias genotípicas en la población (fórmula 27).

En el contexto de los casos de abigeato tratados en este trabajo, la población de los posibles individuos que potencialmente pueden haber contribuido a la evidencia está

compuesta por los animales de las diferentes razas o subpoblaciones de animales que conviven en la Provincia de Buenos Aires (en los casos forenses se considerará a las razas como subpoblaciones de la población general compuesta por los bovinos de una zona determinada). Usualmente, la raza o subpoblación a la cual pertenece la evidencia es irrelevante, porque se pretende calcular la probabilidad de concordancia genética de las muestras asumiendo que el perfil genético encontrado corresponde a otro individuo de la población. Una forma de resolver esta situación, es calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas de la población general, la que está formada por los individuos de las razas más importantes de cría de la Provincia de Buenos Aires (Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Nelore y Brahman). Sin embargo, para inferir las frecuencias genotípicas a partir de las génicas de una población a través de la regla del producto (p^2 para los genotipos homocigotos y $2pq$ para los heterocigotas) se requiere que las frecuencias génicas en las subpoblaciones sean homogéneas. Ésto no ocurre en la especie bovina, la cual se compone de grupos de individuos o razas relativamente aisladas entre sí desde el punto de vista genético. Una forma de incorporar la estructura poblacional en el cálculo del índice forense, es mediante la utilización del índice F_{ST} de la población general. En este caso el índice L se calculó de la siguiente manera (Evet y Weir, 1998):

$$\Pr(A_i A_i) = \frac{[2F_{st} + (1 - F_{st})][3F_{st} + (1 - F_{st})p_i]}{(1 + F_{st})(1 + 2F_{st})} \quad (30)$$

$$\Pr(A_i A_j) = \frac{2[F_{st} + (1 - F_{st})p_i][F_{st} + (1 - F_{st})p_j]}{(1 + F_{st})(1 + 2F_{st})}$$

donde $A_i A_i$ y $A_i A_j$ son los genotipos homocigotas y heterocigotas para un locus determinado. P_i y P_j son las frecuencias génicas en la población de los alelos i y j , respectivamente.

En el presente trabajo, se propone utilizar otra forma conservativa de evaluar el índice L . Este enfoque alternativo se basa en determinar primero el origen racial de la evidencia mediante la aplicación de los métodos asignación de individuos (3.3.8 *Determinación de la raza de origen de los individuos*) y posteriormente, estimar el índice L empleando las frecuencias de la raza asignada.

3.3.10 Programas de computación utilizados:

En la tabla 7 se mencionan los programas de computación utilizados en el presente trabajo. Los algoritmos desarrollados en el entorno de programación Visual Basic se encuentran disponibles previa solicitud al autor (ipliron@hotmail.com).

Tabla 7. Programas de computación utilizados, autor y página web de descarga.

Programa	Autor	Página web
GENEPOP 3.1	Raymond y Rousset (1995)	http://www.cefe.cnrs-mop.fr/genepop
FSTAT 2.8	Goudet (1999)	http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html
ARLEQUIN 2.0	Excoffier (1992).	http://anthro.unige.ch/arlequin
POPULATIONS 1.2.28	Langella (2000)	http://www.cnrs-gif.fr/pge
TreeView 1.6.6	Page (2001)	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html
PAST	Hammer <i>et al.</i> (2003)	http://folk.uio.no/ohammer/past
SPSS 10.0.1	LEAD Technologies (1999)	http://www.spss.com
ADMIX 1.0	Bertorelle y Excoffie (1998)	http://web.unife.it/progetti/genetica/Giorgio
Cervus 2.0	Marshall <i>et al.</i> (1998)	http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen

4.1. Frecuencias génicas y genotípicas

Con el fin de discriminar las variantes alélicas correspondientes a los microsatélites *BM2113 (D2S26)*, *BM1824 (D1S34)*, *SPS115 (D15)*, *INRA023 (D3S10)*, *ETH225 (D9S1)*, *TGLA122 (D21S6)*, *TGLA227 (D18S1)*, *TGLA53 (D16S3)*, *MTGT7(D23S5)*, *INRA124 (DYS6)* e *INRA189*, los productos de amplificación obtenidos por la técnica de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante y se revelaron con nitrato de plata. En la figura 6 se describe a modo de ejemplo el patrón de bandas obtenidos para el microsatélites *TGLA227*. El peso molecular de los alelos se determinó mediante la comparación con ADN controles cuyos genotipos se confirmaron previamente por secuenciación (ver *Análisis del tamaño molecular*). Por otra parte, en la resolución de algunos de los casos de abigeato y de paternidades discutidas la información obtenida a partir de los microsatélites se complementó con la tipificación del locus de Clase II *BoLA-DRB3*. En este caso se empleó la técnica de PCR-RFLP y los pesos moleculares de los fragmentos de restricción se estimaron a través de la comparación con el marcador de peso molecular PBR322 digerido con *MspI* (figura 7). Las frecuencias génicas y genotípicas se calcularon por conteo directo. En las tablas 8-17 se detallan las frecuencias génicas estimadas para cada uno de los once microsatélites analizados en cada una de las razas incluidas en el presente estudio. Los datos de frecuencias genotípicas (datos no mostrados) se encuentran disponibles en caso de ser solicitadas al autor.

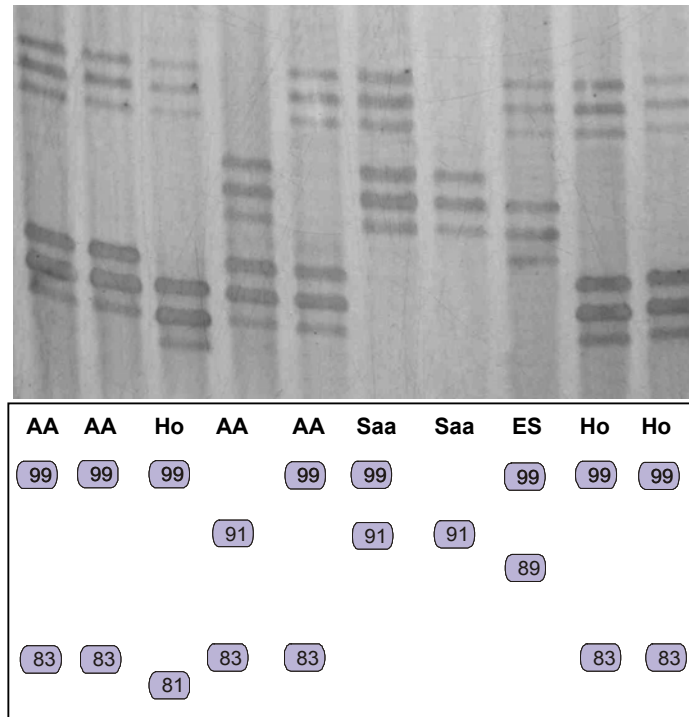


Figura 6. Productos de amplificación correspondientes al microsatélite *TGL227* corridos en geles desnaturizantes de acrilamida/bisacrilamida 4% (19:1) 1X TBE y teñidos con nitrato de plata. Aberdeen Angus (AA), Holando (Ho), Saavedra (Saa), El Salvador (ES). Los alelos están expresados en pares de bases.

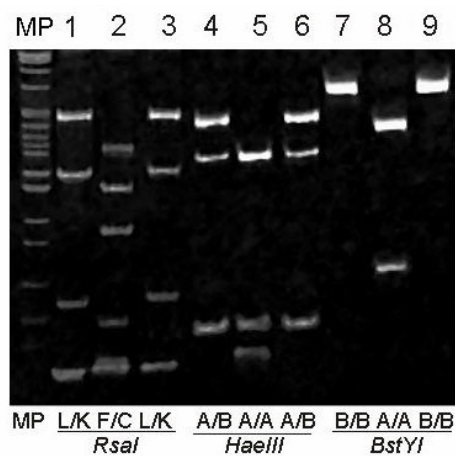


Figura 7. Productos de amplificación del locus *BoLA-DRB3* digeridos con la enzima *RsaI*, *HaeIII* y *BstYI*. Los fragmentos de digestión obtenidos fueron separados en geles de acrilimida/bisacrilamida 8% y se tiñeron con bromuro de etidio. MP: marcador de peso molecular PBR322 digerido con *MspI*. Las calles 1, 4 y 7 correspondieron a la muestra A; las calles 2, 5 y 8 a la muestra B y las calles 3, 6 y 9 a la muestra C.

Tabla 8. Frecuencias génicas estimadas para el locus *BM2113* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>BM2113</i>	N ¹	122	126	128	130	132	134	136	138	140	142	144
BZ	62	-	0,03	0,13	0,21	0,02	-	0,06	0,02	0,11	0,42	-
N	50	-	-	0,04	0,26	-	0,02	0,16	0,06	0,06	0,30	0,10
Cebú	112	-	0,02	0,08	0,23	0,01	0,01	0,11	0,04	0,09	0,36	0,05
AA	118	-	0,07	0,05	0,02	0,01	0,26	0,35	0,08	0,14	0,03	-
He	68	-	0,12	0,07	-	-	0,16	0,22	0,03	0,37	0,03	-
Ho	66	-	0,14	0,20	0,02	-	0,11	0,24	0,21	0,08	0,02	-
J	20	-	-	-	-	-	0,45	0,55	-	-	-	-
T	40	0,05	0,10	-	0,03	0,10	-	0,10	0,15	0,28	0,20	-
Taurus	312	0,01	0,08	0,06	0,01	0,02	0,20	0,29	0,10	0,17	0,05	-
CAr	62	-	0,35	0,05	0,02	0,03	0,05	0,13	0,21	0,16	-	-
ES	44	-	0,16	0,18	0,09	0,02	0,02	0,20	0,18	0,11	0,02	-
Saa	62	-	0,24	0,06	0,19	0,06	0,03	0,16	0,05	0,19	-	-
Y	50	-	0,12	0,02	0,04	0,06	-	0,38	0,10	0,24	0,04	-
Criollas	218	-	0,22	0,08	0,09	0,04	0,03	0,22	0,13	0,18	0,02	-

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 9. Frecuencias génicas estimadas para el locus *BM1824* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3.

<i>BM1824</i>	N ¹	179	181	183	185	187	189	191
BZ	62	0,19	0,35	0,45	-	-	-	-
N	50	0,08	0,50	0,42	-	-	-	-
Cebú	112	0,14	0,43	0,44	-	-	-	-
AA	108	0,45	0,13	0,20	-	0,01	0,20	-
He	72	0,21	0,14	0,47	-	0,01	0,15	0,01
Ho	66	0,21	0,14	0,35	-	0,02	0,29	-
J	16	-	0,75	0,19	-	-	0,06	-
T	40	0,25	0,30	0,15	0,20	-	0,10	-
Taurus	302	0,22	0,29	0,27	0,04	0,01	0,16	-
CAr	62	0,21	0,35	0,29	-	-	0,13	0,02
ES	44	0,14	0,27	0,34	-	-	0,25	-
Saa	60	0,30	0,20	0,35	0,05	-	0,10	-
Y	50	0,26	0,30	0,30	-	-	0,14	-
Criollas	216	0,23	0,28	0,32	0,01	-	0,15	-

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 10. Frecuencias génicas estimadas para el locus *SPS115* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>SPS115</i>	N ¹	234	238	242	244	246	248	250	252	254	256
BZ	54	-	-	-	0,61	0,04	0,07	0,06	0,13	0,04	0,06
N	52	-	-	-	0,73	0,12	-	0,04	0,08	-	0,04
Cebú	106	-	-	-	0,67	0,08	0,04	0,05	0,10	0,02	0,05
AA	118	0,02	-	-	0,59	0,01	0,12	0,13	0,02	0,01	0,11
He	66	-	-	0,02	0,39	-	0,15	0,11	0,06	0,02	0,26
Ho	64	-	0,03	-	0,47	0,03	0,22	0,13	0,09	-	0,03
J	20	-	-	-	0,45	-	0,25	-	-	0,20	0,10
T	40	-	-	-	0,70	-	-	0,18	0,10	-	0,03
Taurus	308	-	0,01	-	0,52	0,01	0,15	0,11	0,05	0,04	0,10
CAr	58	-	-	0,05	0,67	-	-	0,09	0,02	0,03	0,14
ES	42	-	-	0,02	0,52	0,02	0,02	0,14	0,07	-	0,19
Saa	54	-	-	-	0,59	0,06	0,13	0,06	0,11	-	0,06
Y	48	-	-	-	0,63	-	0,02	0,15	0,10	-	0,10
Criollas	216	-	-	0,02	0,60	0,02	0,04	0,11	0,08	0,01	0,12

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 11. Frecuencias génicas estimadas para el locus *INRA023* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3.

<i>INRA023</i>	N ¹	195	197	199	201	203	205	207	209	211	213	215
BZ	62	0,02	0,11	0,08	-	-	0,02	0,02	0,08	0,08	0,03	0,56
N	52	0,06	0,21	-	-	0,10	-	0,08	0,10	0,17	0,04	0,25
Cebú	114	0,04	0,16	0,04	-	0,05	0,01	0,05	0,09	0,13	0,04	0,41
AA	116	-	-	-	0,01	0,16	0,05	0,47	0,22	-	-	0,10
He	72	-	-	-	0,01	-	0,01	0,17	0,17	0,03	0,15	0,46
Ho	60	-	-	-	0,03	0,15	-	0,37	0,05	0,12	0,02	0,27
J	20	-	-	0,70	-	-	-	0,05	0,10	-	-	0,15
T	38	-	-	0,11	-	0,11	-	0,13	0,16	-	0,11	0,39
Taurus	306	-	-	0,16	0,01	0,08	0,01	0,24	0,14	0,03	0,05	0,27
CAr	62	-	-	0,13	0,06	0,05	0,02	0,10	0,21	0,05	0,05	0,34
ES	44	-	-	0,16	0,02	0,05	-	0,23	0,11	0,18	-	0,25
Saa	62	-	-	0,18	-	-	-	0,19	0,18	0,10	0,03	0,32
Y	48	-	-	0,29	-	-	-	0,02	0,10	0,21	0,04	0,33
Criollas	216	-	-	0,19	0,02	0,02	-	0,13	0,15	0,13	0,03	0,31

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 12. Frecuencias génicas estimadas para el locus *ETH225* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3.

<i>ETH225</i>	N ¹	139	143	145	147	149	151	153	157	159
BZ	62	0,06	0,06	-	0,08	0,18	0,02	0,08	0,48	0,03
N	52	0,04	0,02	-	0,08	0,02	-	0,13	0,63	0,08
Cebú	114	0,05	0,04	-	0,08	0,10	0,01	0,11	0,56	0,05
AA	118	0,08	0,28	0,10	0,34	0,19	-	-	-	-
He	72	0,26	0,10	0,15	0,33	0,15	-	-	-	-
Ho	66	0,09	0,17	0,06	0,41	0,23	0,05	-	-	-
J	20	0,20	0,25	-	0,15	0,40	-	-	-	-
T	40	0,30	0,18	0,03	0,13	0,38	-	-	-	-
Taurus	316	0,19	0,19	0,07	0,27	0,27	0,01	-	-	-
CAr	62	0,13	0,32	0,05	0,19	0,31	-	-	-	-
ES	44	0,45	0,07	0,07	0,23	0,16	-	-	-	0,02
Saa	62	0,08	0,19	0,18	0,24	0,23	-	0,06	0,02	-
Y	50	0,18	0,06	0,04	0,22	0,44	-	0,02	0,04	-
Criollas	218	0,21	0,16	0,08	0,22	0,28	-	0,02	0,01	0,01

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 13. Frecuencias génicas estimadas para el locus *TGLA122* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3. En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>TGLA122</i>	N ¹	136	140	142	144	146	148	150	152	154	156	158	160	162	166	168	170	172	182
BZ	60	0,42	-	0,03	0,02	-	0,05	0,25	0,15	-	-	-	0,07	0,02	-	-	-	-	-
N	50	0,34	-	0,12	0,06	0,08	0,02	0,10	0,14	-	-	0,04	0,08	0,02	-	-	-	-	-
Cebú	110	0,38	-	0,08	0,04	0,04	0,04	0,18	0,15	-	-	0,02	0,07	0,02	-	-	-	-	-
AA	110	-	-	0,05	-	-	0,09	0,74	0,02	0,02	0,03	-	0,05	-	-	-	-	-	-
He	72	-	0,17	0,56	-	0,04	0,03	0,11	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-
Ho	58	-	0,07	0,24	-	-	0,14	0,29	0,14	-	-	-	0,03	0,03	-	-	-	0,03	0,02
J	20	-	-	0,40	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-
T	38	0,32	-	0,13	0,03	-	0,05	0,24	0,13	-	-	0,03	0,05	-	-	0,03	-	-	-
Taurus	298	0,06	0,05	0,28	0,01	0,01	0,06	0,32	0,06	-	0,01	0,01	0,05	0,01	-	0,09	-	0,01	-
CAr	60	0,05	-	0,22	-	0,02	0,02	0,22	0,15	0,02	-	-	0,25	0,02	0,03	-	0,02	-	-
ES	44	-	-	0,16	-	-	0,02	0,27	0,25	0,02	0,02	0,02	0,14	0,02	0,02	-	0,05	-	-
Saa	52	0,02	-	0,17	0,02	0,02	0,06	0,21	0,21	0,06	0,04	-	0,10	0,04	0,04	-	0,02	-	-
Y	44	0,05	-	0,18	-	-	-	0,32	0,36	-	-	0,02	0,02	-	-	-	-	0,05	-
Criollas	200	0,03	-	0,18	-	0,01	0,02	0,25	0,24	0,02	0,02	0,01	0,13	0,02	0,02	-	0,02	0,01	-

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 14. Frecuencias génicas estimadas para el locus *TGLA227* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3. En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>TGLA227</i>	N ¹	79	81	83	85	89	91	93	95	97	99	101	105
BZ	62	0,61	0,05	0,18	0,02	-	0,02	0,03	-	0,05	0,05	-	-
N	50	0,70	0,16	0,06	-	0,02	0,04	-	-	-	0,02	-	-
Cebú	112	0,66	0,10	0,12	0,01	0,01	0,03	0,02	-	0,02	0,03	-	-
AA	112	-	-	0,25	0,06	0,16	0,21	0,04	0,14	0,01	0,13	-	-
He	72	-	0,01	0,03	0,01	0,15	0,11	0,51	0,06	-	0,11	-	-
Ho	58	-	0,05	0,16	0,03	0,12	0,17	0,07	0,07	-	0,26	0,02	0,05
J	20	-	0,05	0,35	-	-	-	0,20	0,35	0,05	-	-	-
T	38	0,42	-	0,13	0,21	0,13	-	0,05	-	-	0,05	-	-
Taurus	300	0,08	0,02	0,18	0,06	0,11	0,10	0,18	0,12	0,01	0,11	-	0,01
CAr	60	0,02	0,02	0,08	0,10	0,13	0,10	0,25	0,05	0,02	0,23	-	-
ES	42	0,05	0,02	0,02	0,24	0,14	0,14	0,24	0,02	-	0,12	-	-
Saa	44	0,02	0,02	0,11	0,05	0,30	0,23	0,16	0,07	-	0,05	-	-
Y	46	0,02	-	0,04	0,46	0,13	0,17	0,15	0,02	-	-	-	-
Criollas	192	0,03	0,02	0,07	0,21	0,18	0,16	0,20	0,04	0,00	0,10	-	-

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 15. Frecuencias génicas estimadas para el locus *MTGTG7* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3. En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>MTGTG7</i>	N ¹	282	284	292	294	296	298	300	302	304	306	308	310
BZ	60	0,10	-	0,53	0,03	-	0,02	-	-	-	0,07	0,19	0,05
N	50	0,06	0,02	0,50	-	-	0,04	0,02	-	0,04	0,10	0,15	0,06
Cebú	110	0,08	0,01	0,52	0,02	-	0,03	0,01	-	0,02	0,09	0,17	0,06
AA	110	-	-	0,40	0,20	0,01	0,25	-	0,01	-	-	0,14	-
He	72	-	-	0,57	0,04	-	0,29	-	-	-	0,09	-	-
Ho	58	-	-	0,44	0,08	0,02	0,16	-	-	0,02	0,03	0,27	-
J	20	-	-	0,83	0,11	-	0,06	-	-	-	-	-	-
T	38	-	-	0,57	0,10	-	0,03	-	-	-	-	0,30	-
Taurus	298	-	-	0,56	0,11	-	0,16	-	-	-	0,02	0,14	-
CAr	60	-	-	0,62	0,07	-	0,12	-	-	-	0,07	0,13	-
ES	44	-	-	0,63	0,03	-	0,05	-	-	-	0,05	0,25	-
Saa	52	-	-	0,42	0,02	-	0,26	-	-	0,08	-	0,22	-
Y	44	-	-	0,59	0,13	0,02	0,11	-	-	-	0,09	0,07	-
Criollas	200	-	-	0,56	0,06	0,01	0,13	-	-	0,02	0,05	0,17	-

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 16. Frecuencias génicas estimadas para el locus *TGLA53* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Abeerden Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J) y Retinta (T); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). En color azul se indican las frecuencias superiores a 0,3. En color azul y rojos se indican las frecuencias superiores a 0,3 y los alelos privativos de raza, respectivamente.

<i>TGLA53</i>	N ¹	151	155	157	159	161	163	165	167	169	171	173	179	181	183
BZ	62	-	-	0,47	0,02	0,02	0,02	0,31	0,02	0,06	-	0,02	0,02	0,03	0,03
N	46	-	-	0,76	0,02	-	-	0,07	0,04	0,07	-	-	0,02	-	0,02
Cebú	108	-	-	0,61	0,02	0,01	0,01	0,19	0,03	0,06	-	0,01	0,02	0,02	0,03
AA	118	-	0,02	0,38	0,02	0,01	-	0,27	0,01	0,01	0,03	0,25	0,01	-	-
He	66	0,06	-	0,44	0,15	0,02	-	0,08	0,02	0,21	0,03	-	-	-	-
Ho	66	0,12	-	0,24	0,21	0,08	0,05	0,05	0,05	-	0,02	0,15	-	-	0,05
J	20	-	-	0,15	0,10	-	-	0,40	0,30	-	-	-	0,05	-	-
T	36	0,25	-	0,06	0,06	0,03	0,06	0,11	0,17	0,17	0,11	-	-	-	-
Taurus	306	0,09	-	0,25	0,11	0,03	0,02	0,18	0,11	0,08	0,04	0,08	0,01	-	0,01
CAr	60	0,07	-	0,28	0,05	-	0,12	0,13	0,03	0,32	-	-	-	-	-
ES	40	0,10	-	0,33	0,05	0,05	0,03	0,10	0,05	0,15	0,03	0,03	-	0,08	0,03
Saa	52	0,10	-	0,44	0,02	-	0,10	0,12	0,06	0,06	0,04	0,04	-	0,04	-
Y	48	0,19	-	0,40	-	0,10	0,04	0,13	0,02	0,06	-	-	-	0,04	0,02
Criollas	200	0,11	-	0,36	0,03	0,04	0,07	0,12	0,04	0,15	0,02	0,02	-	0,04	0,01

¹ número de cromosomas analizados en cada raza.

Tabla 17. Frecuencias génicas estimadas para los loci del cromosoma Y: *INRA124* e *INRA189* en las razas bovinas de origen cebuino: Brahman (BZ) y Nelore (N); taurino: Abeerden Angus (AA), Hereford (He); y Criollas Americanas: Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

<i>INRA124</i>	124	126			N ¹
<i>INRA189</i>	88	90	98	102	
BZ	1	-	-	-	17
N	1	-	-	-	5
AA	-	-	1	-	10
He	-	-	-	1	5
CAr	0,04	-	0,78	0,17	23
ES	0,26	-	0,74	-	12
Saa	0,22	0,17	0,14	0,47	36
Y	0,25	-	-	0,75	4

¹ número de individuos analizados en cada raza.

4.2 Medidas de diversidad genética

La diversidad genética dentro de cada raza se evaluó mediante el número de alelos observados (N_a ob), el número de alelos esperados (N_a esp), la heterocigosidad esperada por locus (h_e) y la heterocigosidad esperada promedio (H_e). Los nueve loci autosómicos tipificados en el presente trabajo fueron polimórficos en las once razas estudiadas, presentando en todos los casos al menos dos alelos con frecuencias apreciables. En el conjunto de las razas se identificaron un total de 104 alelos. Se detectaron un total de once alelos privativos de raza (10,6%, hallados únicamente en un sólo rodeo), tres en la raza Nelore, cuatro en Holando, tres en Aberdeen Angus y uno en Retinta. Las frecuencias génicas de los alelos privativos fueron menores a 0,1 con la excepción del alelo 144 del locus *BM2113* en la raza Nelore que se encontró en una frecuencia de 0,1 (Tabla 8). En los loci *SPS115* y *MGTG7* los alelos 244 y 292 respectivamente, fueron los mayoritarios en todas las razas muestreadas (Tablas 10 y 15).

El número de alelos observados (N_a ob) para cada locus en las razas analizadas se describe en la tabla 18. El promedio del N_a ob dentro de cada raza varió desde 7,8 en la raza Criolla Chaqueña Boliviana hasta 3,7 en la raza Jersey. Al comparar los marcadores, el promedio varió desde 4,4 en el locus *BM1824* hasta 8,9 en el *TGLA53*. Como el número de alelos observados depende en gran medida del tamaño muestral en cada población, y debido a que el número de individuos tipificados fue diferente en las distintas razas, se calculó el número esperado de alelos (N_a esp) para una muestra de 20 individuos (tabla 19).

Este índice se estimó como el número de alelos promedio obtenidos en 1000 remuestreos sin reemplazo de 20 individuos para cada locus en cada raza. La raza Jersey no se incluyó debido a que sólo se tipificaron 10 individuos. El resultado más llamativo se observó en la raza Aberdeen Angus, donde el valor del N_a esp fue de 5,7 en comparación con el obtenido de en la muestra original de 59 individuos (N_a ob = 7,1). La segunda raza con menor N_a ob fue la Retinta. Sin embargo, cuando se la comparó con las demás razas utilizando el estimador N_a esp, se observaron valores intermedios. El valor de N_a esp se redujo levemente en las demás razas con respecto al valor de N_a ob, aunque comparativamente las razas presentaron los mismos valores relativos.

Los valores de H_e observados entre los STRs variaron desde 5,8 en el locus *SPS115* hasta 0,79 en el *TGLA53* (tabla 20). La raza Jersey presentó la menor heterocigosidad esperada promedio con un valor de 0,6. En el otro extremo se hallaron las razas Holando (0,79), la Criolla Saavedreña (0,78) y la Criolla Chaqueña Boliviana (0,77).

Tabla 18. Número de alelos observados para los microsatélites autosómicos: *BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53* en las razas: Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J), Retinta (T), Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	<i>BM2113</i>	<i>BM1824</i>	<i>SPS115</i>	<i>INRA023</i>	<i>ETH225</i>	<i>TGLA122</i>	<i>TGLA227</i>	<i>MGTG7</i>	<i>TGLA53</i>	Promedio
BZ	8	3	7	9	8	8	8	7	11	7,7
N	8	3	5	8	7	10	6	9	7	7,0
AA	9	5	8	6	5	7	8	6	10	7,1
He	7	6	7	7	5	6	8	4	8	6,4
Ho	8	5	7	7	6	9	10	7	10	7,7
J	2	3	4	4	4	3	5	3	5	3,7
T	8	5	4	6	5	9	6	4	9	6,2
CAR	8	5	6	9	5	11	10	5	7	7,3
ES	9	4	7	7	6	11	9	5	12	7,8
Saa	8	5	6	6	7	13	9	5	10	7,7
Y	8	4	5	6	7	7	7	6	9	6,6
Promedio	7,5	4,4	6,0	6,8	5,9	8,5	7,8	5,5	8,9	6,8

Tabla 19. Número promedio de alelos esperados para una muestra de 20 individuos (n = 40) estimados sobre la base de 1000 remuestreos independientes sin reemplazo para los microsatélites autosómicos: *BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53* en las razas Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J), Retinta (T), Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	<i>BM2113</i>	<i>BM1824</i>	<i>SPS115</i>	<i>INRA023</i>	<i>ETH225</i>	<i>TGLA122</i>	<i>TGLA227</i>	<i>MGTG7</i>	<i>TGLA53</i>	Promedio
BZ	7,2	3,0	6,5	7,8	7,5	7,1	7,0	6,4	8,6	6,8
N	7,7	3,0	4,9	7,9	6,5	9,4	5,4	8,3	5,9	6,6
AA	7,5	4,3	5,8	5,3	5,0	5,7	7,1	4,7	6,1	5,7
He	6,6	5,1	6,0	6,0	5,0	5,7	6,9	3,9	6,8	5,8
Ho	7,2	4,6	6,5	6,4	5,9	8,0	9,2	5,8	9,3	7,0
T	8,0	5,0	4,0	6,0	5,0	8,7	6,0	3,8	8,8	6,2
CAR	7,4	4,7	5,4	8,5	5,0	9,0	8,9	5,0	6,8	6,7
ES	8,7	4,0	6,6	6,9	5,9	10,4	8,6	4,8	11,3	7,5
Saa	7,8	4,9	5,7	5,9	6,7	10,7	7,7	4,6	9,0	7,0
Y	7,7	4,0	4,8	5,7	6,7	6,3	6,4	5,7	8,5	6,2
Promedio	7,6	4,3	5,6	6,6	5,9	8,1	7,3	5,3	8,1	6,5

Tabla 20. Heterocigosidad esperada (h_e) estimada para los microsatélites: *BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53* y *MG7* en las razas: Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Jersey (J), Retinta (T), Criolla Argentina (CAR), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	<i>BM2113</i>	<i>BM1824</i>	<i>SPS115</i>	<i>INRA023</i>	<i>ETH225</i>	<i>TGLA122</i>	<i>TGLA227</i>	<i>TGLA53</i>	<i>MG7</i>	H_e
BZ	0,757	0,643	0,607	0,658	0,723	0,745	0,594	0,691	0,670	0,676
N	0,814	0,579	0,452	0,850	0,576	0,838	0,488	0,418	0,721	0,637
AA	0,783	0,701	0,610	0,705	0,758	0,446	0,835	0,725	0,728	0,699
He	0,781	0,700	0,752	0,720	0,774	0,648	0,693	0,739	0,583	0,710
Ho	0,834	0,743	0,716	0,767	0,751	0,823	0,863	0,857	0,717	0,786
J	0,521	0,425	0,721	0,500	0,753	0,674	0,747	0,753	0,307	0,600
T	0,850	0,795	0,481	0,789	0,741	0,824	0,758	0,871	0,598	0,745
CAR	0,794	0,741	0,526	0,817	0,758	0,830	0,849	0,793	0,589	0,744
ES	0,864	0,745	0,678	0,831	0,723	0,833	0,848	0,858	0,555	0,771
Saa	0,842	0,747	0,622	0,798	0,824	0,876	0,832	0,776	0,715	0,781
Y	0,782	0,748	0,578	0,763	0,733	0,745	0,734	0,790	0,628	0,722

4.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento

Para evaluar el desequilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el índice F_{IS} . El valor de probabilidad del estadístico (error de tipo I) se evaluó mediante el test exacto de HWE (Gou y Thompson, 1992), incorporado en el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995a). En total, 19 de las 99 combinaciones locus-población (9 loci en 11 poblaciones) mostraron desviaciones significativas del HWE con valores de probabilidad inferiores al 5% (tabla 21). El número observado de desequilibrios fue mayor al esperado simplemente por azar (aproximadamente cinco). La proporción de los desequilibrios fue similar en los nueve loci analizados, observándose un rango de 1 a 3 poblaciones por locus en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, la comparación de marcadores en desequilibrio entre las razas evidenció una marcada diferencia entre ellas. Mientras que dos razas concentraron 10 de los 19 desequilibrios observados (Nelore = 6, Hereford = 4), las cuatro razas criollas sólo presentaron dos desequilibrios en las 36 combinaciones locus-población analizadas.

En las pruebas que presentaron desvíos significativos de las frecuencias esperadas bajo el HWE se observó una proporción similar de valores positivos y negativos del índice F_{IS} (10 y 9 respectivamente, tabla 21), lo que estaría indicando la ausencia de una tendencia hacia el exceso o pérdida de heterocigotas observados. Con el fin de comprobar este patrón

de desequilibrios se evaluaron las hipótesis nulas de exceso y deficiencia de individuos heterocigotas mediante la prueba U (Rousset y Raymond, 1995). Estos análisis confirmaron los resultados obtenidos previamente mediante la prueba exacta de Fisher (Ho: exceso y deficiencia de heterocigotas).

La prueba global de HWE para todos los loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada locus se determinó utilizando el método de Fisher (Raymond y Rousset, 1995a). El nivel de significancia de la prueba se ajustó mediante la corrección de Bonferroni (Weir, 1990). Los loci *INRA023*, *ETH225* y *TGLA53* presentaron un desequilibrio significativo de Hardy-Weinberg en el conjunto de poblaciones. Además, se observó desequilibrio en las poblaciones de Nelore, Hereford y Aberdeen Angus.

Para analizar la independencia de los genotipos entre los loci o desequilibrio de ligamiento se utilizó el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995a). Las tablas de contingencia para las 36 combinaciones de loci en cada una de las 11 poblaciones analizadas se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher. Se observaron un total de 18 desequilibrios de ligamiento en las 396 tablas analizadas (tabla 22). Este valor fue inferior a los 19,6 desequilibrios de ligamiento esperados por azar considerando un error de tipo I del 5%. La proporción de desequilibrios entre los distintos pares de loci en el conjunto de razas fue similar, observándose un rango de 0 a 2 razas en desequilibrio por par de marcadores estudiados. Al igual que lo observado en la prueba Hardy-Weinberg, la comparación del número de marcadores en desequilibrio de ligamiento entre las razas evidenció una marcada heterogeneidad. Mientras que sólo dos razas concentraron 11 de los 18 desequilibrios observados (Aberdeen Angus = 6 y Hereford = 5), las demás razas analizadas presentaron uno o ningún desequilibrio de ligamiento, exceptuando la raza Criolla Argentina que presentó tres.

La prueba global de desequilibrio de ligamiento para todos los pares de loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada par de loci se determinó utilizando el método de Fisher (Raymond y Rousset, 1995a). El nivel de significancia de la prueba se ajustó mediante la corrección de Bonferroni (Weir, 1990). En este caso, todas las poblaciones y todos los marcadores presentaron equilibrio de ligamiento.

Tabla 21. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) evaluado a través del índice de F_{IS} y el valor de probabilidad de Fisher para cada locus en las once razas analizadas. Se incluye el nivel de significancia global del HWE para todos los loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada loci. Aunque se analizaron las 99 combinaciones de loci-población, solamente se incluyen en la tabla las que presentaron valores de probabilidad de HWE inferiores a 0,05. En la parte superior se detalla el valor de probabilidad y en la inferior el resultado del índice F_{IS} .

	BM2113	BM1824	SPS115	INRA023	ETH225	TGLA122	TGLA227	MGTG7	TGLA53	Prob. Conjunta
BZ	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0408 / -0,22	-
N	-	0,0106 / -0,32	-	0,0038 / 0,19	0,0134 / -0,001	0,011 / 0,09	0,0381 / 0,18	-	0,0018 / 0,49	**
AA	-	0,0188 / 0,26	-	-	-	-	-	-	0,004 / -0,19	0,0027
He	0,0012 / -0,17	-	0,0009 / -0,30	0,0007 / -0,36	0,0005 / -0,15	-	-	-	-	**
Ho	-	-	-	-	-	0,0316 / 0,21	-	0,0363 / -0,002	-	-
J	0,0455 / -0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	0,0091 / -0,21	-	-	0,0009 / 0,31	-	-	-
CAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saa	-	0,0169 / -0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	0,0243 / 0,28	-	-	-	-	-	-	-
Prob. Conjunta	-	-	-	0,0005	0,0005	-	-	-	0,0031	

** altamente significativo

Tabla 22. Valores de probabilidad obtenidos para el equilibrio de ligamiento para todas las combinaciones de los loci en cada una de las razas mediante el método de Fisher. Se incluyen en la tabla únicamente los valores de probabilidad inferiores a 0,05.

		BZ	N	AA	He	Ho	J	T	CAR	ES	SAA	Y	global
BM2113	BM1824	-	-	-	-	-	-	-	0,018	-	-	-	-
BM2113	SPS115	-	-	0,025	0,037	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	SPS115	-	-	0,009	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2113	INRA023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	INRA023	-	-	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	INRA023	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2113	ETH225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	ETH225	-	-	-	-	-	-	0,012	-	-	-	0,010	-
SPS115	ETH225	-	-	0,050	-	-	-	-	0,041	-	-	-	-
INRA023	ETH225	-	-	-	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2113	TGLA122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	TGLA122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	TGLA122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INRA023	TGLA122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETH225	TGLA122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2113	TGLA227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	TGLA227	-	-	0,010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	TGLA227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INRA023	TGLA227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETH225	TGLA227	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-
TGLA122	TGLA227	-	-	-	-	-	-	-	0,004	-	-	-	-
BM2113	MGTG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	MGTG7	-	-	-	0,035	-	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	MGTG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INRA023	MGTG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETH225	MGTG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGLA122	MGTG7	-	-	-	-	-	0,016	-	-	-	-	-	-
TGLA227	MGTG7	-	-	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2113	TGLA53	-	-	0,030	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM1824	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INRA023	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETH225	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGLA122	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGLA227	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MGTG7	TGLA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Global		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4 Estructura poblacional

4.4.1 Test de diferenciación poblacional

En el presente trabajo se calcularon los test de diferenciación genética y genotípica para cada uno de los 9 microsatélites analizados entre las 11 razas bovinas estudiadas. Además, se estimó la diferenciación génica y genotípica para cada par de poblaciones. Los cálculos se realizaron con el programa de computación GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset 1995a).

Todos los loci analizados mostraron diferencias significativas a nivel génico y genotípico entre las 11 poblaciones analizadas ($p < 0,01$). La diferenciación génica y genotípica para el conjunto de loci entre cada par de poblaciones se evaluó mediante el método de Fisher (Raymond y Rousset, 1995b). El nivel de significancia de la prueba se ajustó mediante la corrección de Bonferroni ($\alpha = 0,0055$). De todos los pares de poblaciones comparadas, solamente las razas Criolla Argentina y Criolla Chaqueña Boliviana no presentaron diferencias significativas ($p > 0,0055$) entre sus frecuencias génicas, aunque sí lo hicieron en sus frecuencias genotípicas ($p = 0,0016$). En estas dos poblaciones, de los 9 loci analizados, solamente el microsatélite *ETH225* presentó valores de probabilidad inferiores al 5% para las dos pruebas.

4.4.2 Coeficientes de subdivisión poblacional (estadísticos F)

En el presente estudio, la subdivisión poblacional se evaluó mediante el cálculo de tres índices de fijación: F_{ST} (Weir y Cockherham, 1984), G_{ST} (Nei, 1973) y R_{ST} (Slatkin, 1995).

Como se muestra en la tabla 23, los índices F_{ST} y G_{ST} evidenciaron valores similares en los 9 microsatélites analizados. Los valores de estos estimadores de subdivisión variaron en forma considerable entre los marcadores utilizados, desde 0,023 en el locus *SPS115* hasta 0,14 en el locus *TGLA227*.

El índice R_{ST} está basado en el *Stepwise Mutation Model* y tiene en cuenta las diferencias en el número de repeticiones de los alelos. Como se observa en la tabla 23, los valores estimados para este estadístico son diferentes a los calculados por los otros dos índices de fijación. El promedio del R_{ST} (0,144) para todos los loci fue mayor al obtenido por el F_{ST} (0,078) y G_{ST} (0,087), lo que implica que la diferenciación entre las poblaciones no sólo está dada por las frecuencias génicas sino también por el tamaño de los alelos. Las diferencias del parámetro R_{ST} entre los loci fue mucho más acentuada que en los otros estimadores de subdivisión. Algunos marcadores como el *BM1824*, *MGTG7* y *TGLA53*

presentaron valores inferiores a 0,03 mientras que en el otro extremo los microsatélites *TGLA227* y *ETH225* evidenciaron valores de 0,38 y 0,41, respectivamente.

Tabla 23. Estimación de los niveles de subdivisión genética mediante los índices F_{ST} , G_{ST} y R_{ST} para los nueve loci estudiados.

Locus	F_{ST}	G_{ST}	R_{ST}
<i>BM2113</i>	0,091	0,096	0,072
<i>BM1824</i>	0,058	0,071	0,025
<i>SPS115</i>	0,023	0,033	0,035
<i>INRA023</i>	0,087	0,096	0,093
<i>ETH225</i>	0,097	0,106	0,411
<i>TGLA122</i>	0,100	0,108	0,145
<i>TGLA227</i>	0,144	0,149	0,380
<i>MGTG7</i>	0,030	0,042	0,023
<i>TGLA53</i>	0,073	0,081	0,027
Promedio	0,078	0,087	0,144

4.4.3 Análisis molecular de la varianza (AMOVA)

Una forma de inferir la estructura genética de las poblaciones es mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA). Este método permite partir la varianza genética total del conjunto de razas estudiadas en sus componentes de variación entre razas, dentro de las razas y entre grupos de razas.

Un primer análisis de la varianza se realizó en las 11 razas bovinas utilizando los nueve microsatélites autosómicos incluidos en el presente trabajo. Como se observa en la tabla 24, el porcentaje de variación entre las razas fue del 9% *versus* un 91% de variación dentro de cada una. El porcentaje de variación entre las razas en el AMOVA es el equivalente al índice F_{ST} .

Un segundo AMOVA se realizó separando las razas analizadas en dos grupos según su origen cebuino o taurino (tabla 25). En este caso, el porcentaje de variación entre estos grupos fue de 7,8% frente a un 5,8% obtenido entre las poblaciones dentro de cada grupo. Ésto indicaría que la mayor parte de las diferencias genéticas halladas entre las razas estudiadas se corresponde con su origen. Los marcadores *ETH225* y el *TGLA227* presentan un porcentaje de variación entre las razas cebuinas y taurinas de 20% y 19%, respectivamente; y entre las poblaciones dentro de estos grupos de sólo 3,2% y 6,8%, respectivamente. El *BM2113* mostró un porcentaje de variación mayor entre los grupos (9%) que dentro de ellos (5%), si bien esta diferencia no fue tan marcada.

Por último, se efectuó un tercer análisis de la varianza que incluyó solamente las razas taurinas agrupadas según su origen europeo o americano (razas criollas). Como se observa en la Tabla 26, el porcentaje de variación entre las razas criollas y las europeas alcanza solamente el 1% *versus* un 6% entre las poblaciones dentro de los grupos.

Tabla 24. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los 9 microsatélites analizados en las razas bovinas estudiadas. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre las razas y el correspondiente a los individuos dentro de las razas.

Locus	% de variación	
	Entre razas	Dentro de Razas
BM2113	8,7	91,3
BM1824	5,8	94,2
SPS115	3,1	96,9
INRA023	9,2	90,8
ETH225	11,2	88,8
TGLA122	12,6	87,4
TGLA227	14,8	85,2
MGTG7	3,6	96,4
TGLA053	7,3	92,7
Total	8,8	91,2

Tabla 25. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los 9 microsatélites estudiados en las razas bovinas agrupadas según su origen. Razas cebuinas: Brahman y Nelore; Razas taurinas: Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Jersey y Retinta; Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre los grupos cebú y taurus, entre las razas dentro de estos grupos y el correspondiente a los individuos dentro de las razas.

Locus	% de variación		
	Entre grupos (cebú y taurus)	Entre razas dentro de grupos	Dentro de razas
BM2113	9,1	5,2	85,7
BM1824	4,4	4,2	91,4
SPS115	0,5	2,9	96,6
INRA023	2,5	8,3	89,2
ETH225	20,0	3,2	76,8
TGLA122	5,0	10,6	84,4
TGLA227	18,9	6,8	74,4
MGTG7	0,9	3,3	95,8
TGLA053	2,4	6,4	91,2
Total	7,8	5,8	86,4

Tabla 26. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los 9 microsatélites estudiados en las razas bovinas taurinas agrupadas según su lugar de origen. Taurinas europeas: Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Jersey y Retinta; Criollas Americanas: Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre los grupos de razas europeas y americanas, entre las razas dentro de sus grupos y el correspondiente a los individuos dentro de las razas.

Locus	% de variación		
	Entre grupos (Europeos y Criollos)	Entre razas dentro de grupos	Dentro de razas
BM2113	0,9	5,7	93,4
BM1824	0,4	4,4	95,1
SPS115	1,6	1,9	96,5
INRA023	0,9	8,1	91,0
ETH225	1,9	3,1	95,0
TGLA122	0,2	12,5	87,2
TGLA227	1,3	8,0	90,8
MGTG7	1,0	3,3	95,7
TGLA053	1,0	5,7	93,2
Total	1,0	6,1	93,0

4.5 Distancias génicas y árboles

Con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas entre las razas bovinas estudiadas, se calcularon tres medidas de distancias génicas: D_A (Nei *et al.*, 1983), D_C (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) y D_{SW} (Shriver *et al.*, 1995). En las tablas 27, 28 y 29 se detallan los valores obtenidos de las distancias génicas entre cada par de razas. A partir de cada una de las matrices de distancia génica se construyeron dos fenogramas (figuras 8, 9 y 10) empleando los métodos de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y NJ (Saitou y Nei, 1987). Para determinar la fiabilidad de los árboles filogenéticos se realizó un test de *bootstrap* de loci con 1000 iteraciones. Las matrices y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el programa de computación POPULATIONS 1.2.28 (Langella, 2000). La raza Jersey, debido al reducido número de animales tipificados ($N = 10$), generaba distorsiones en la topología general de los árboles; por esta razón se excluyó del análisis filogenético.

Como se observa en las figuras 8-10, la topología de los árboles varió considerablemente según las distancias y los algoritmos de construcción utilizados. Una primera distinción se observó entre los fenogramas construidos a partir de las distancias clásicas D_A y D_C *versus* la D_{SW} , que se basa en el modelo de mutaciones SMM. Otra diferencia notoria se encontró entre los árboles generados por el método de agrupación

UPGMA *versus* el de NJ. En la mayoría de los casos, los valores obtenidos por el test de *bootstrap* fueron bajos, con la excepción de las agrupaciones que incluían las razas Nelore y Brahman (valores de *bootstrap* entre 85 y 100%) y las razas Aberdeen Angus y Holando (valores de *bootstrap* entre 96 y 98% en los árboles estimados con las distancias D_A y D_C).

En los árboles construidos con el método UPGMA a partir de las distancias D_A y D_C se observaron dos *cluster* principales que incluían las razas de origen índico y taurino, respectivamente. El grupo taurino se subdividió a su vez en un *cluster* que incluyó a las razas de origen europeo y en otro correspondiente a las razas iberoamericanas. En el fenograma construido a partir de la distancia D_{SW} con el algoritmo UPGMA, las razas europeas se entremezclaron con las criollas americanas y la raza española Retinta se localizó en el mismo *cluster* que las razas cebuinas. Los árboles generados con el algoritmo de NJ, evidenciaron las siguientes características: i) las razas criollas se encontraron dispersas a lo largo de todo el árbol; ii) en los tres fenogramas construidos con este método la raza Criolla Yacumeña se agrupó en un mismo *cluster* con las razas Retinta, Nelore y Brahman y iii) en los dos fenogramas construidos a partir de las distancias clásicas D_A y D_C , las razas europeas se agruparon en un mismo *cluster*.

Tabla 27. Matriz de distancias estándar de Nei, D_A (Nei *et al.*, 1983) estimada sobre la base de 9 microsatélites en las razas bovinas: Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T); Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	BZ	N	AA	He	Ho	T	CA	ES	Sa	Y
BZ	0,000									
N	0,091	0,000								
AA	0,320	0,388	0,000							
He	0,326	0,372	0,178	0,000						
Ho	0,302	0,350	0,111	0,151	0,000					
T	0,215	0,295	0,249	0,256	0,232	0,000				
CA	0,243	0,315	0,162	0,122	0,148	0,146	0,000			
ES	0,235	0,292	0,163	0,150	0,114	0,160	0,073	0,000		
Sa	0,226	0,283	0,146	0,158	0,129	0,174	0,095	0,086	0,000	
Y	0,213	0,300	0,216	0,186	0,184	0,152	0,117	0,087	0,115	0,000

Tabla 28. Matriz de distancias genéticas, D_C (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), estimada sobre la base de 9 microsatélites en las razas bovinas: Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T); Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	BZ	N	AA	He	Ho	T	CA	ES	Sa	Y
BZ	0,000									
N	0,263	0,000								
AA	0,489	0,547	0,000							
He	0,491	0,530	0,355	0,000						
Ho	0,479	0,518	0,283	0,336	0,000					
T	0,401	0,468	0,430	0,441	0,418	0,000				
CA	0,425	0,481	0,341	0,305	0,327	0,329	0,000			
ES	0,417	0,467	0,354	0,327	0,292	0,347	0,235	0,000		
Sa	0,406	0,463	0,327	0,345	0,311	0,364	0,273	0,260	0,000	
Y	0,394	0,474	0,388	0,366	0,366	0,335	0,288	0,257	0,295	0,000

Tabla 29. Matriz de distancias genéticas, D_{SW} –*Stepwise weighted*– (Shriver *et al.*, 1995) entre las razas bovinas: Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T); Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

	BZ	N	AA	He	Ho	T	CA	ES	Sa	Y
BZ	0,000									
N	0,137	0,000								
AA	0,792	1,054	0,000							
He	0,821	1,159	0,453	0,000						
Ho	0,684	0,941	0,154	0,269	0,000					
T	0,319	0,589	0,410	0,485	0,368	0,000				
CA	0,700	1,019	0,205	0,296	0,134	0,355	0,000			
ES	0,725	0,015	0,195	0,370	0,145	0,339	0,094	0,000		
Sa	0,621	0,866	0,189	0,343	0,109	0,357	0,093	0,106	0,000	
Y	0,503	0,721	0,228	0,357	0,211	0,259	0,199	0,174	0,146	0,000

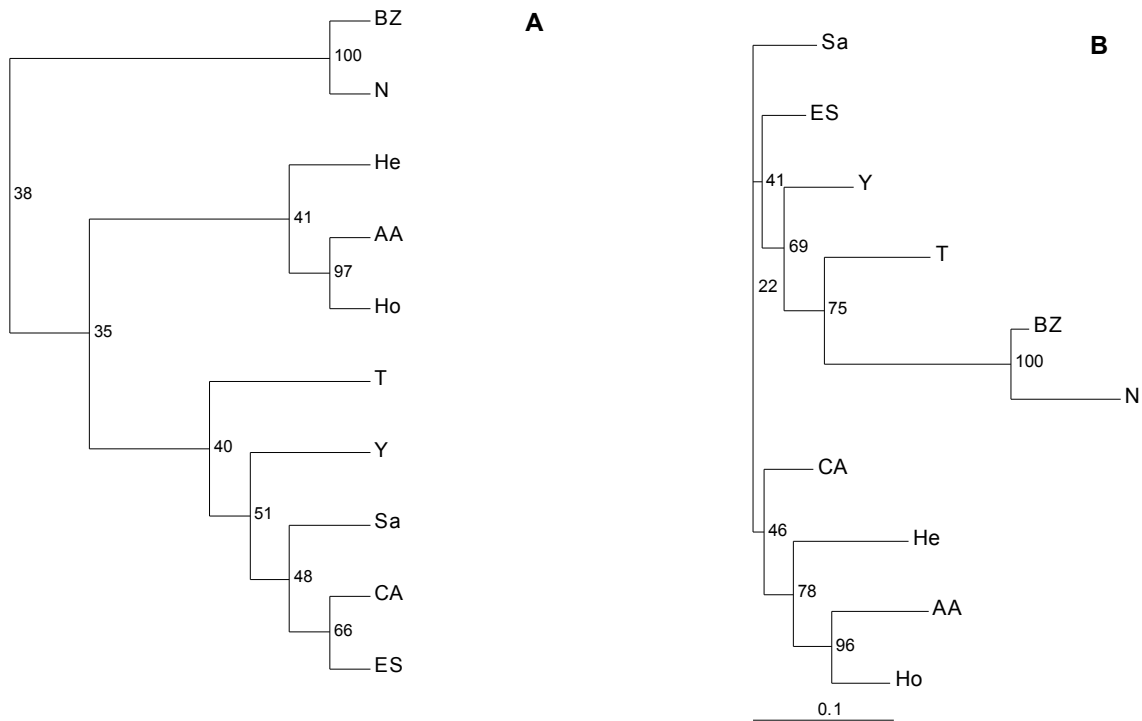


Figura 8. Fenogramas construidos con los métodos UPGMA (A) y NJ (B) a partir de la matriz de distancia D_A . Se incluyen las razas Brahman (BZ), Nelore (N), Abeerden Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T), Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). Los números en los nodos representan el porcentaje de ocurrencia del grupo en 1000 iteraciones del test de *bootstrap*.

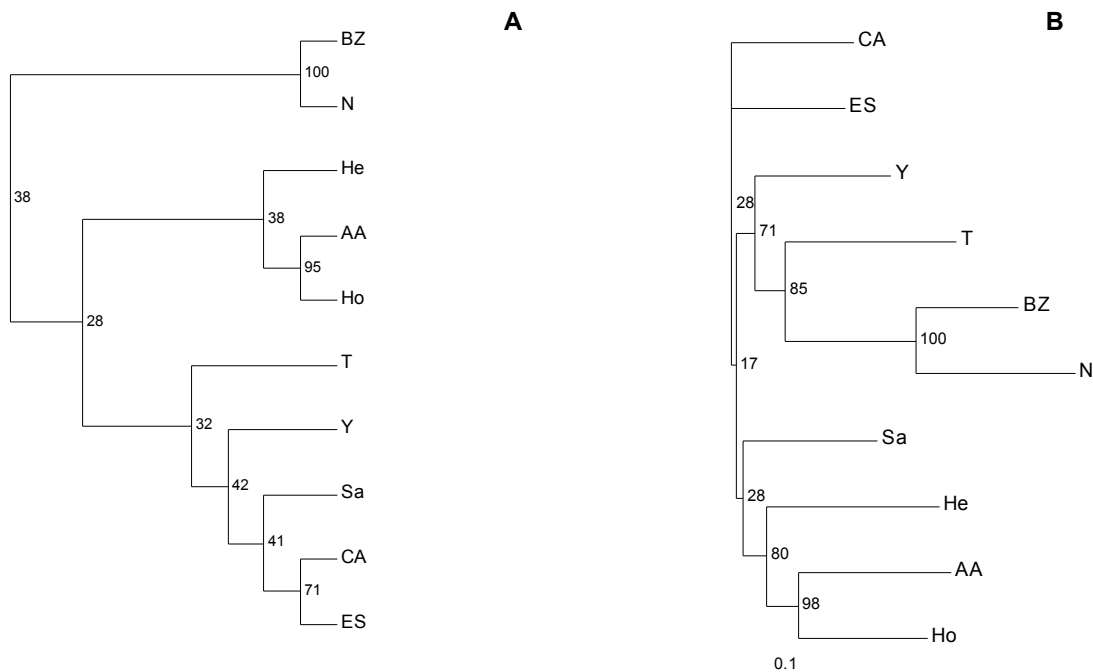


Figura 9. Fenogramas construidos con los métodos UPGMA (A) y NJ (B) a partir de la matriz de distancia D_C . Se incluyen las razas Brahman (BZ), Nelore (N), Abeerden Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T), Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). Los números en los nodos representan el porcentaje de ocurrencia del grupo en 1000 iteraciones del test de *bootstrap*.

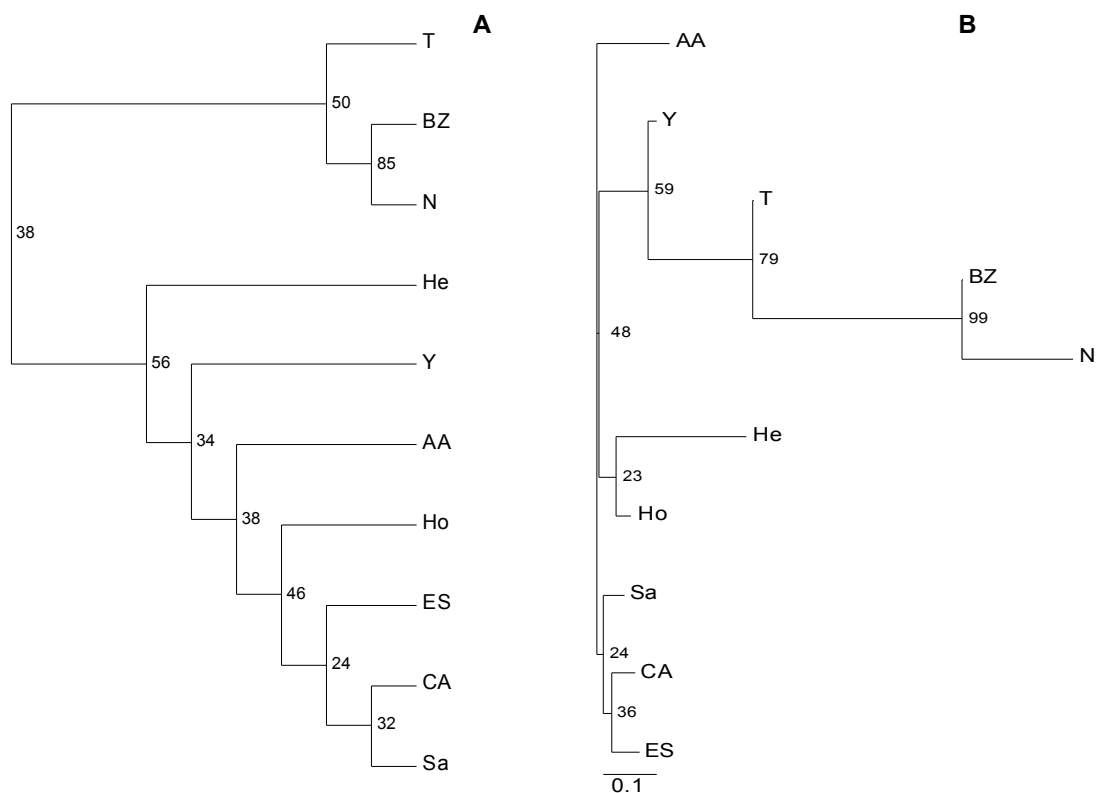


Figura 10. Fenogramas construidos con los métodos UPGMA (A) y NJ (B) a partir de la matriz de distancia D_{SW} . Se incluyen las razas Brahman (BZ), Nelore (N), Aberdeen Angus (AA), Hereford (He), Holando (Ho), Retinta (T), Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). Los números en los nodos representan el porcentaje de ocurrencia del grupo en 1000 iteraciones del test de *bootstrap*.

4.6 Análisis multivariado

Con el fin de resumir las relaciones genéticas entre las razas se realizó el análisis de componentes principales (ACP). Para este análisis se utilizaron las frecuencias génicas transformadas según Cavalli-Sforza (1994) correspondientes a los 98 alelos encontrados en las todas las razas con la excepción de Jersey. Como se mencionó en el punto anterior, la inclusión de esta raza en el ACP generó distorsiones en la representación espacial de los componentes principales (CP), probablemente debido al escaso número de animales tipificados.

Las tres primeras dimensiones del ACP explicaron un total de 67% de la varianza. El primer CP (40%) dividió las razas en dos grupos claramente diferenciados que se correspondieron con su origen taurino e índico, respectivamente (Figura 11). El segundo CP (15%) diferenció las razas taurinas en un *cluster* europeo y otro iberoamericano, aunque

esta división no fue tan marcada como en el primer CP. El tercer CP (12%), no aportó ninguna información relevante para el estudio de las relaciones entre las razas, ya que sólo diferenció la raza Hereford de las demás. En resumen, como se observa en la figura 11, graficando los dos primeros CP se logró discriminar los tres grupos principales de razas según su origen histórico.

En las figuras 12 y 13, se representan los porcentajes de contribución a los dos primeros CP de los diez alelos que más aportaron a cada uno de ellos. La mayoría de estos loci en el CP1 se presentaron con frecuencias génicas considerables en las razas Nelore y Brahman, por el contrario en las demás razas taurinas estuvieron ausentes o en bajas frecuencias (tablas 8-16). Por el contrario, cuando se compararon las frecuencias génicas de los alelos que más aportaron al CP2, no se observó una clara divergencia en las frecuencias génicas entre los dos conjuntos de razas (taurinas europeas y hispanoamericanas) discriminadas por este componente.

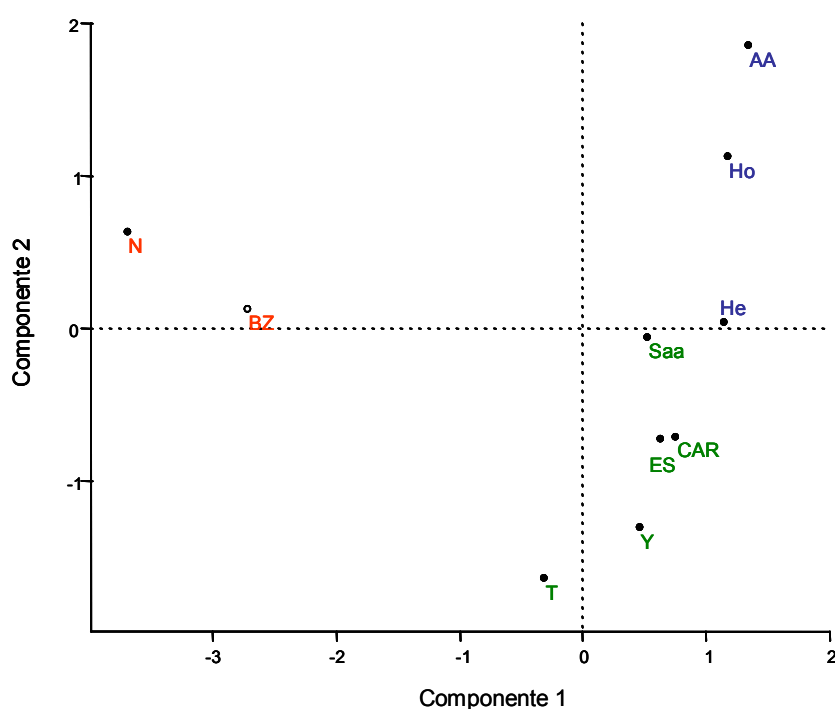


Figura 11. Representación de las razas en el espacio correspondiente a los dos primeros componentes principales. El ACP se calculó a partir de las frecuencias génicas transformadas de las razas cebuinas (en color rojo): Brahman (BZ) y Nelore (N); taurinas europeas (en color Azul): Aberdeen Angus (AA), Hereford (He) y Holando (Ho) y las razas de origen hispanoamericano (en color verde) Retinta (T), Criolla Argentina (CAR), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y).

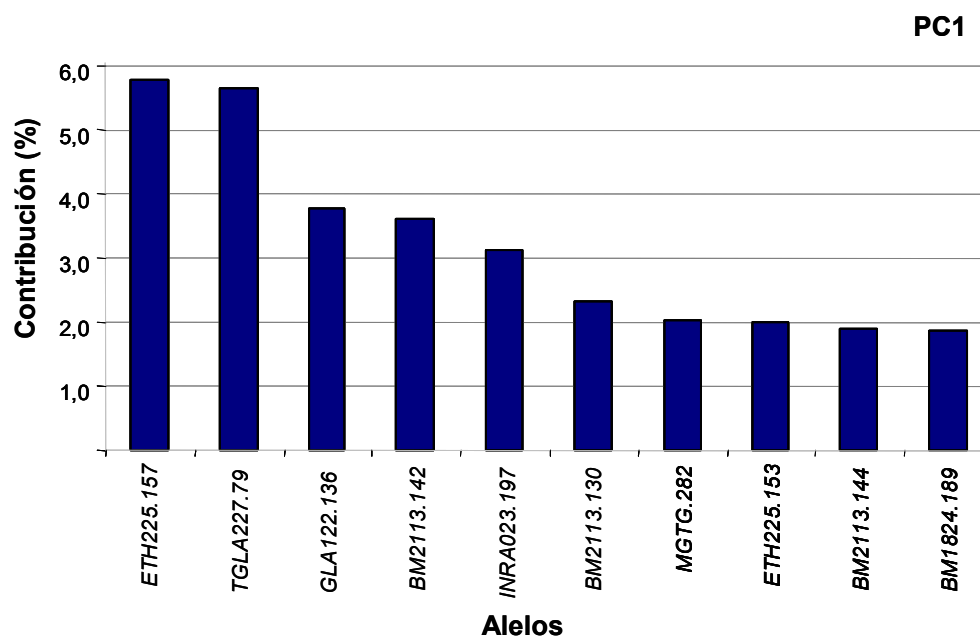


Figura 12. Contribución de los diez alelos con mayor aporte al primer componente principal (CP1). La nomenclatura de los microsatélites en el eje de las x corresponde a loci.alelo.

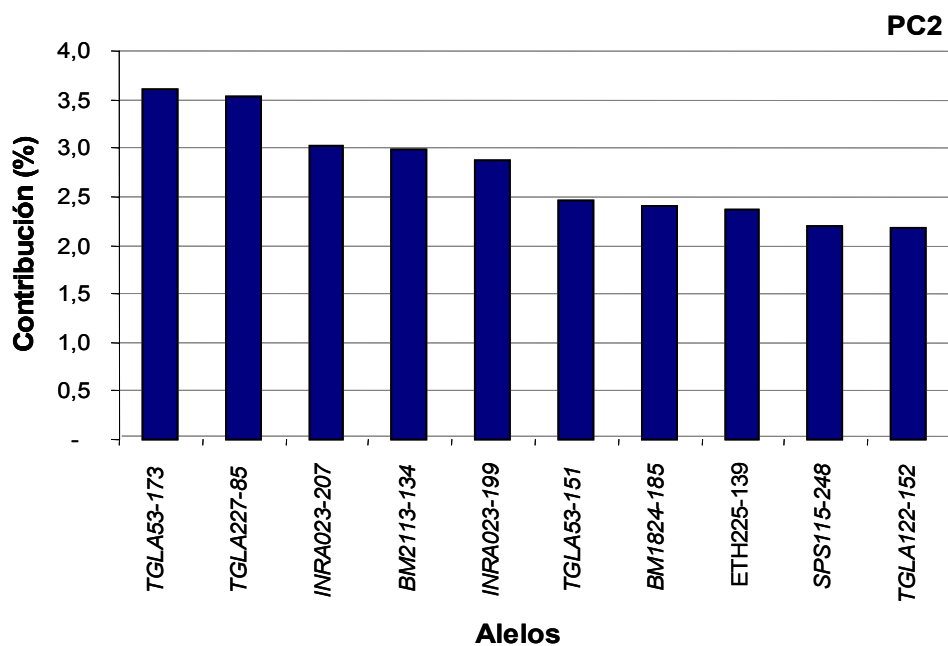


Figura 13. Contribución de los diez alelos principales para el segundo componente principal (CP2). La nomenclatura de los microsatélites en el eje de las x corresponde a loci.alelo.

4.7 Estimación de los niveles de introgresión de genes índicos en las razas criollas

La estimación del porcentaje de introgresión de genes índicos o taurinos en las razas criollas se realizó mediante la aplicación de dos metodologías. La primera se basó en calcular el porcentaje de introgresión de 5 cinco alelos privativos cebuinos (*ETH225.153*, *ETH225.157*, *ETH225.159*, *TGLA227.79*, *TGLA122.136*). Se consideró al locus *ETH225* como la suma de los tres alelos analizados. En la tabla 30 se detallan los valores de introgresión calculados según el índice mY en las razas Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña. Las cuatro razas criollas presentaron evidencias de mezcla, aunque con frecuencias inferiores al 10%. La raza argentina evidenció los valores inferiores de introgresión génica promedio para los tres loci. Por el contrario, las razas criollas bolivianas Saavedreña y Yacumeña alcanzaron los valores superiores de introgresión génica.

Tabla 30. Porcentaje de introgresión de alelos correspondientes a microsatélites autosómicos privativos de razas cebuinas en las razas criollas: Argentina (CAr), Chaqueña Boliviana (ES), Saavedreña (Saa) y Yacumeña (Y). Como poblaciones parentales de tipo índico se consideraron las razas Brahman y Nelore, y como parentales de origen taurino la razas Aberdeen Angus, Hereford, Holando y Retinta.

	Cebú	Taurus	CAr	ES	Saa	Y
<i>ETH225</i>	72,1	-	-	3,2	11,2	8,3
<i>TGLA227.79</i>	65,6	-	2,1	6,0	2,9	2,8
<i>TGLA122.136</i>	37,8	-	3,7	0,0	1,4	3,3
Promedio			1,9	3,1	5,2	4,8

El segundo procedimiento utilizado para evaluar la introgresión índica se basó en las frecuencias génicas y en el tamaño de todos los alelos encontrados en los nueve microsatélites autosómicos analizados utilizando el coeficiente de mezcla mY (Bertorelle y Excoffier, 1998). Los valores obtenidos con este índice fueron superiores a los calculados por el método de alelos privativos, aunque no superaron el 11%. La raza Criolla Argentina presentó los valores inferiores de mezcla (mY = 2,6%). Las razas bolivianas alcanzaron valores cercanos al 10% (mY = 9,5%, 9,4% y 10,3%, para las razas Criolla Chaqueña, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña, respectivamente).

El porcentaje de introgresión de genes índicos por vía paterna, se calculó a partir de las frecuencias génicas de los alelos de 124 pb y 88 pb, correspondientes a los microsatélites *INRA124* e *INRA189*, respectivamente. Estos alelos han sido reportados como alelos privativos del grupo índico. La totalidad de los animales que presentaron el alelo 124 del locus *INRA124* también evidenciaron el alelo de 88 del *INRA189*. La introgresión de marcadores del cromosoma Y característicos de cebú fue de dos órdenes de magnitud superior a la manifestada por los marcadores autosómicos. En la raza Criolla Argentina se

observó un porcentaje de introgresión holandrica del 4%, mientras que las criollas bolivianas presentaron valores de introgresión que variaron desde el 22 al 26% (tabla 17).

4.8 Asignación poblacional

4.8.1 Árboles filogenéticos de individuos

En el presente trabajo se realizaron dos procedimientos de asignación de individuos a sus respectivas razas, uno basado en las distancias genéticas y el otro en las frecuencias génicas. En el primero de ellos se consideraron a los individuos como unidades operacionales taxonómicas (OTUs) y sobre la base de sus frecuencias genotípicas se calcularon las distancias genéticas D_{AS} -*allele shared distance*- (Bowcock *et al.*, 1994) y D_{SWASM} -*stepwise allele shared distance measure*- (MacHugh, 1996). Se incluyeron en este análisis solamente las razas criadas en la Argentina. Para construir la matriz de distancia se eligieron los 10 individuos tipificados de la raza Jersey y 15 individuos elegidos al azar de cada una de las demás razas. Las matrices de distancias genéticas se calcularon con la planilla de cálculos EXCEL 2002. Para cada una de las distancias se realizó un árbol filogenético de individuos con el método de NJ utilizando el programa POPULATION 1.2.28. Para la edición de los dendogramas se empleó el programa TreeView 1.6.6.

En las figuras 14 y 15 se muestran los árboles obtenidos para las distancias D_{AS} y D_{SWASM} , respectivamente. A pesar que la distancia D_{AS} no tiene en cuenta la información contenida en el número de repeticiones de los microsatélites, esta medida mostró una mayor eficiencia para la agrupación de los individuos a sus respectivas razas en comparación con la distancia D_{SWASM} . En ambos dendogramas se observaron diferentes niveles de agrupación de los individuos según la raza a la cual pertenecían. Los animales de las razas Nelore y Brahman se ubicaron entremezclados en un único *cluster*. Solamente un individuo se localizó fuera de dicho grupo cuando se empleó la distancia D_{AS} y tres cuando se utilizó la distancia D_{SWASM} . Cabe mencionar, que en los dos árboles un animal Criollo Argentino se ubicó en el *cluster* cebuino.

Con respecto a las razas taurinas, no se observó un nivel evidente de agrupación de los individuos en sus respectivas poblaciones. Las razas europeas Aberdeen Angus, Jersey y Hereford presentaron de 70 a 80% de los individuos en sus grupos respectivos. Los animales de las razas Criolla Argentina y Holando se encontraron dispersos por el resto del árbol junto con los individuos no agrupados de las demás razas.

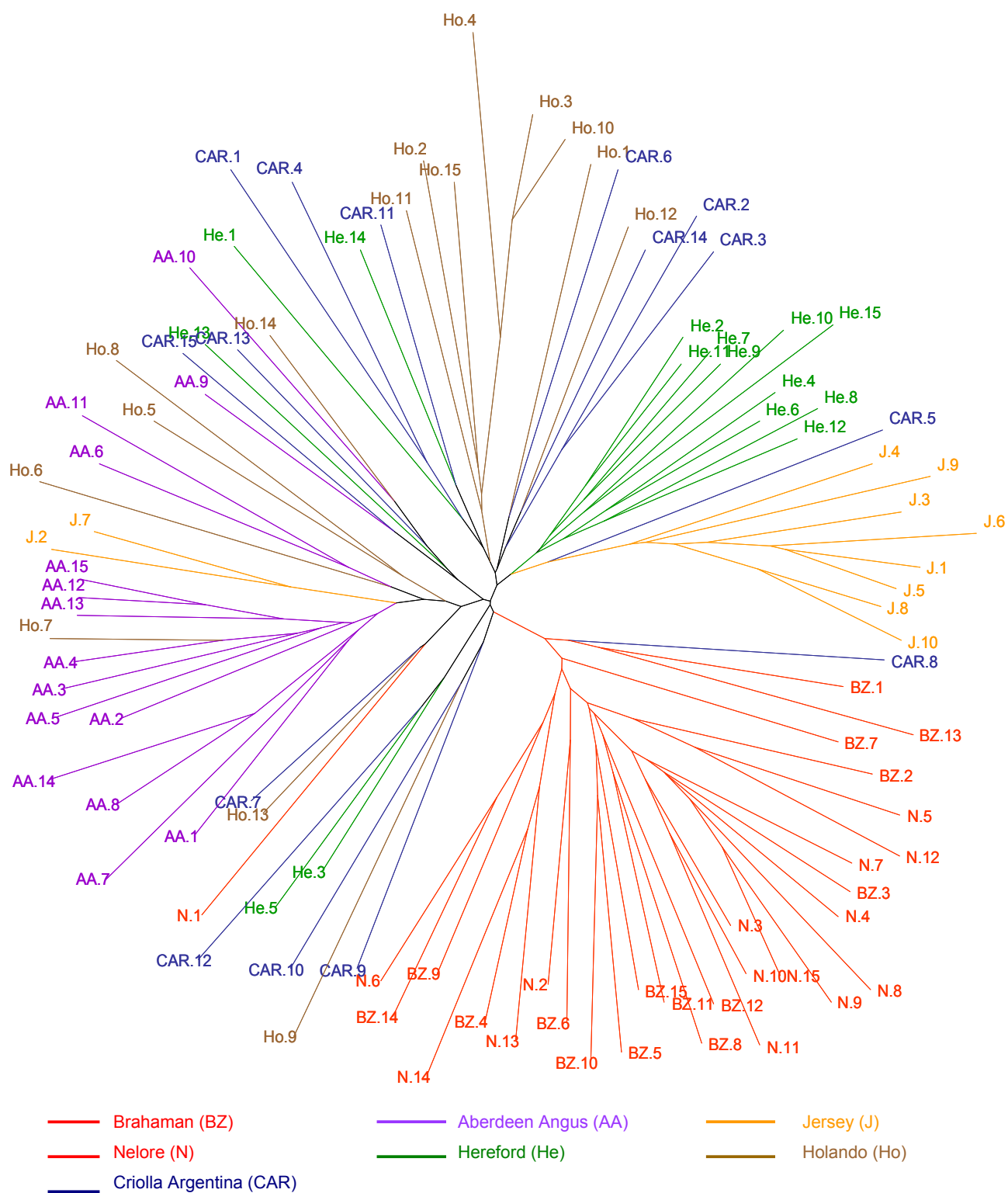


Figura 14. Árbol filogenético de individuos construido con el método de NJ a partir de la matriz de distancia D_{AS} . Para este análisis se consideraron solamente las razas criadas en la Argentina. Se incluyeron los 10 individuos tipificados de la raza Jersey y 15 animales elegidos al azar del resto de las poblaciones.

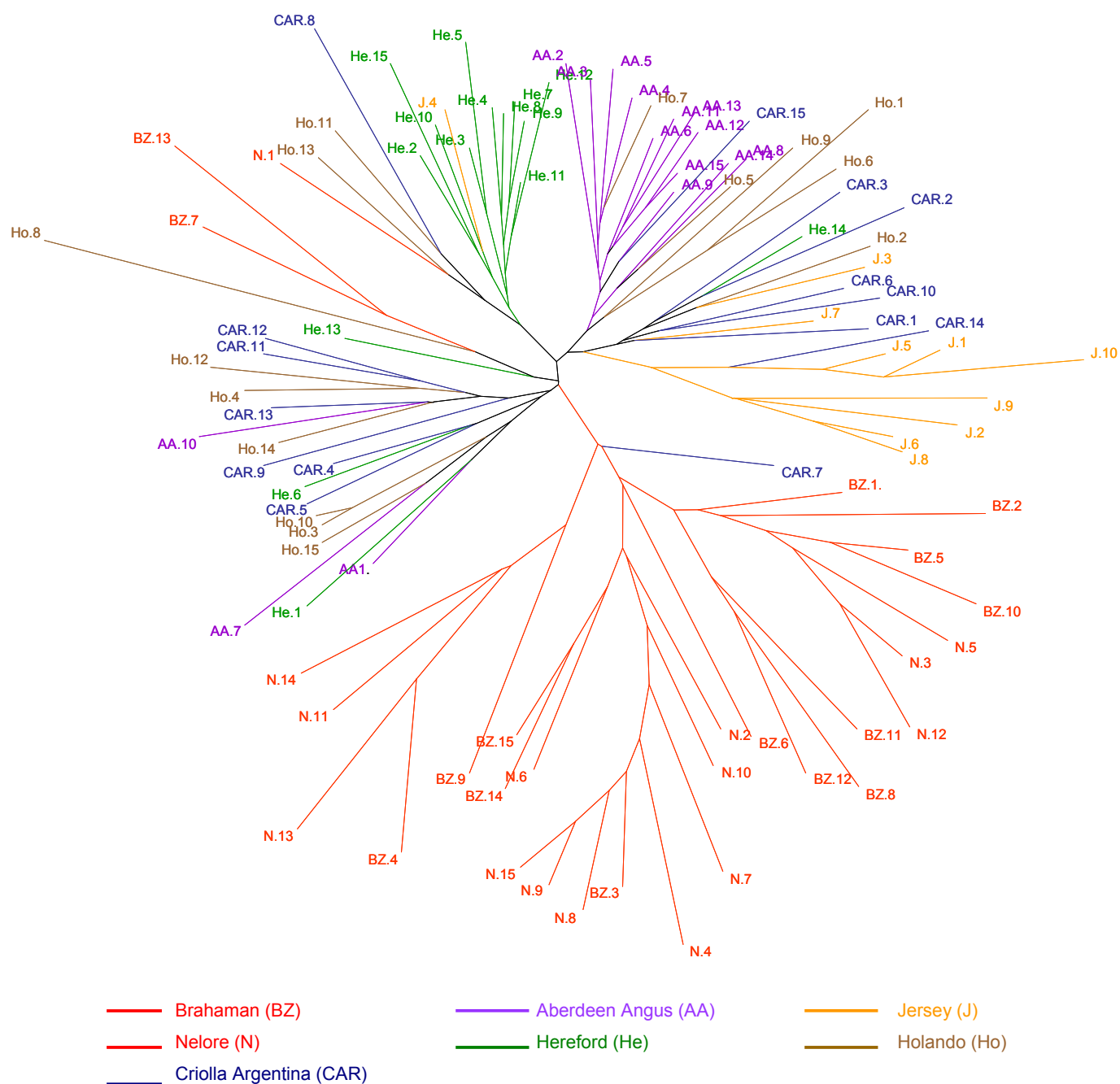


Figura 15. Árbol filogenético de individuos construido con el método de NJ a partir de la matriz de distancia D_{SWASM} . Para este análisis se consideraron solamente las razas criadas en la Argentina. Se incluyeron los 10 individuos tipificados de la raza Jersey y 15 animales elegidos al azar del resto de las poblaciones.

4.8.2 Método de frecuencias

En este estudio, se realizó un segundo procedimiento de asignación de los individuos a sus respectivas razas basado en las frecuencias génicas. De la misma manera que en la construcción de los árboles filogenéticos de individuos, se incluyeron en este análisis solamente las siete razas criadas en la Argentina. Para cada una de ellas y con el objeto de evaluar la asignación en un número reducido de loci, se simuló un número variable de genotipos multilocus tratando de explorar la mayor parte del espacio combinatorio formado por los arreglos de 1 a 9 microsatélites.

En la tabla 31 se detallan los porcentajes promedios de asignación de los individuos a cada una de las razas para los 9 loci tomados de a uno y para las combinaciones de 3, 5, y 7 loci; así como también los porcentajes de asignación para el total de los marcadores. El porcentaje de asignación correcta fue diferente en las distintas razas estudiadas. Cuando se utilizaron los 9 marcadores este porcentaje varió desde un 91% en la raza Holando hasta un 100% en Jersey, obteniéndose un valor promedio de 96% para el total de las razas. Los rodeos cebuinos, Nelore y Brahman, presentaron un porcentaje de asignación del 95%, aunque la totalidad de los individuos mal asignados lo hicieron en la otra raza del mismo origen. Este comportamiento se repitió para las combinaciones de 7 y 5 marcadores. De la misma manera, las poblaciones de origen taurino, con la excepción de Jersey, distribuyeron el error entre las demás razas del mismo origen. Cabe mencionar que la raza Jersey presentó un 100% de individuos bien asignados cuando se analizaron 6 o más marcadores. Otro hecho a destacar fue la gran variación presente en los niveles de asignación correctos entre las razas cuando se compararon los promedios para un sólo marcador, los cuales variaron desde un 23% a un 86% en las razas Criolla Argentina y Jersey, respectivamente.

En la tabla 32 se muestran la heterocigosidad promedio, el número de alelos esperados promedio, el F_{ST} y la proporción de asignaciones correctas para cada microsatélite (promedio entre todas las razas consideradas). En la figura 16 se grafican las relaciones entre estas variables, indicándose el índice de correlación de Spearman y su valor de probabilidad. Los marcadores más eficientes en la determinación del origen racial de los individuos fueron los que presentaron un mayor número de alelos ($r = 0,92$, $p < 0,001$) y en menor medida los que mostraron valores mayores de F_{ST} ($r = 0,7$, $p = 0,036$). Sin embargo, no se observó una asociación evidente entre la proporción de asignaciones correctas y la heterocigosidad esperada promedio ($r = 0,6$, $p = 0,08$). Cabe aclarar que estos valores expresan solamente una tendencia de asociación entre las variables, ya que se analizó un número no muy grande de marcadores moleculares.

Por último, se estudió la relación entre el porcentaje de asignación y el número de marcadores analizados. Como se observa en la figura 17, el nivel de asignaciones correctas

de los individuos a sus respectivas razas se incrementó considerablemente con la adición de los primeros marcadores. Solamente con 4 microsatélites se obtuvo un porcentaje promedio de asignación correcta superior al 80%. El incremento posterior en el número de loci produjo un aumento progresivamente más lento en la tasa de determinaciones correctas, llegando a un valor observado promedio de 96% incluyendo a los 9 marcadores.

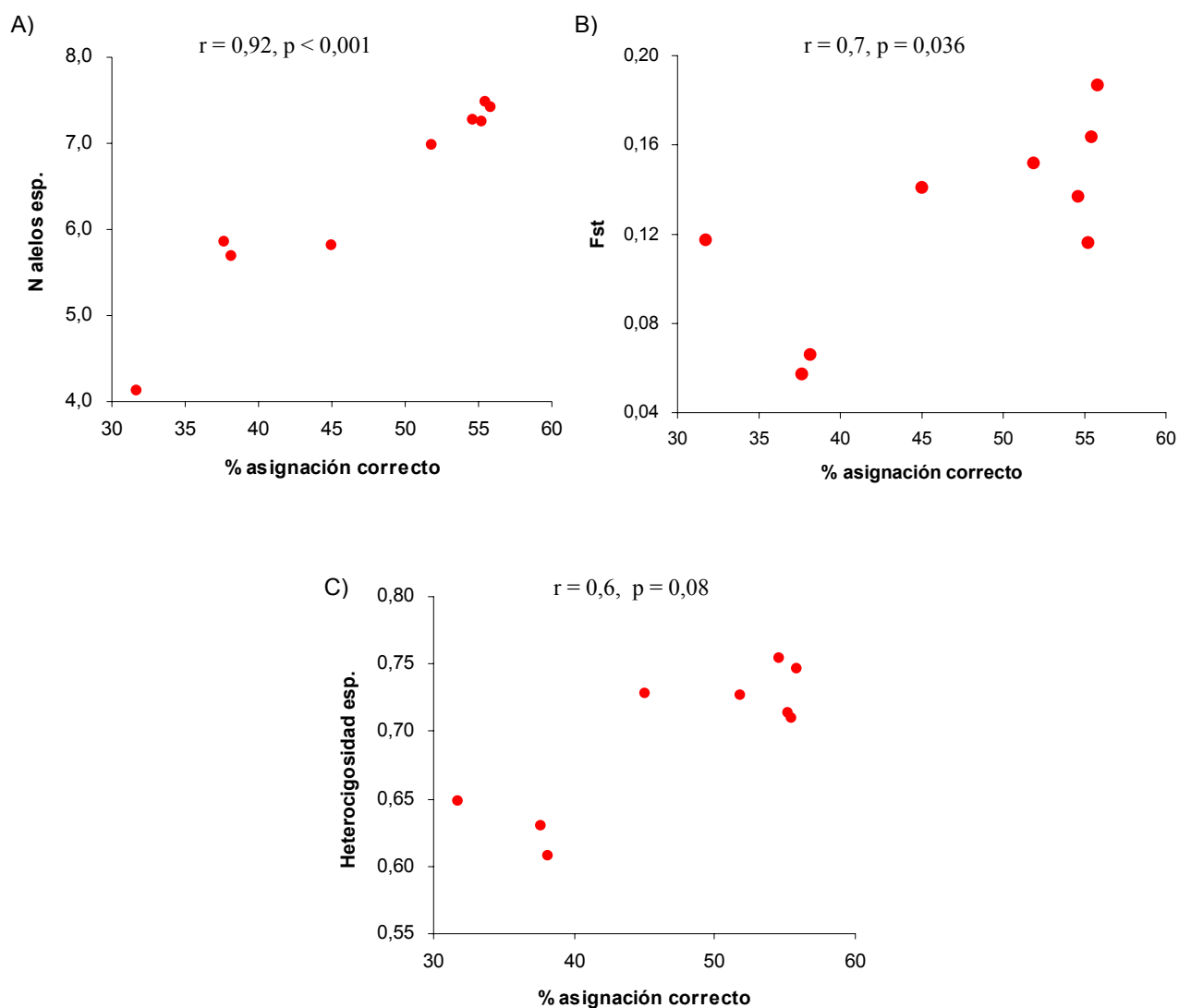


Figura 16. Porcentaje de asignación correcto de los individuos en función del número de alelos observados en cada microsatélite (A), de la heterocigosidad promedio (B) y del índice F_{ST} (C). En cada gráfico se indica coeficiente de correlación de Spearman y el valor de significancia.

Tabla 31. Porcentaje de asignación correcta de los individuos entre las razas. A partir de las frecuencias génicas observadas en cada raza se simularon 1000 combinaciones de genotipos para 9, 7, 5, 3 y 1 microsatélite. Las razas simuladas se detallan en la vertical y las razas asignadas en la horizontal.

Raza	Brahman	Nelore	A. Angus	Hereford	Holando	Jersey	Criolla Arg.
Brahman							
9 ^a	95	5	-	-	-	-	-
7	92	8	-	-	-	-	-
5	86	13	-	-	-	-	1
3	73	18	1	2	1	2	3
1	37	25	4	10	7	13	4
Nelore							
9	5	95	-	-	-	-	-
7	7	93	-	-	-	-	-
5	10	90	-	-	-	-	-
3	16	79	1	1	1	-	2
1	18	57	2	7	6	8	2
A. Angus							
9	-	-	97	-	2	-	1
7	-	-	94	1	4	-	1
5	-	-	88	2	6	1	3
3	1	1	77	4	8	4	5
1	2	7	41	13	14	17	6
Hereford							
9	-	-	1	96	1	-	2
7	-	-	1	95	2	-	2
5	-	-	3	88	3	1	5
3	2	-	6	76	6	3	7
1	4	5	8	50	11	14	8
Holando							
9	-	-	4	3	91	-	2
7	-	-	7	4	86	-	3
5	-	-	11	6	77	1	5
3	1	1	15	9	65	2	7
1	4	6	15	13	42	14	6
Jersey							
9	-	-	-	-	-	100	-
7	-	-	-	-	-	100	-
5	-	-	-	1	-	99	-
3	-	-	1	2	-	96	1
1	2	6	1	7	3	82	-
Criolla Arg.							
9	-	-	1	2	1	-	96
7	-	-	4	5	3	1	87
5	1	-	5	8	4	2	80
3	3	2	8	13	6	6	62
1	5	10	10	17	16	19	23

^a número de marcadores evaluados en cada raza simulada. El valor detallado corresponde al promedio de los porcentajes de asignación obtenidos de algunas de las posibles combinaciones de microsatélites tomadas de a 1, 3, 5, 7 y 9. En azul se indican los porcentajes de asignación correctos.

Tabla 32. Porcentaje de asignación correcto de los individuos, número de alelos esperados promedio, heterocigosidad promedio e índice F_{ST} para cada microsatélite. Los datos se ordenaron según los valores decrecientes de la variable proporción de asignaciones correctas.

Locus	Proporción de asig. correctas	N° alelos esp.	Heterocigosidad	F_{ST}
TGLA227	0,56	7,4	0,75	0,19
TGLA122	0,55	7,5	0,71	0,16
TGLA53	0,55	7,3	0,71	0,12
BM2113	0,55	7,3	0,75	0,14
INRA023	0,52	7,0	0,73	0,15
ETH225	0,45	5,8	0,73	0,14
MGTG7	0,38	5,7	0,61	0,07
SPS115	0,38	5,9	0,63	0,06
BM1824	0,32	4,1	0,65	0,12

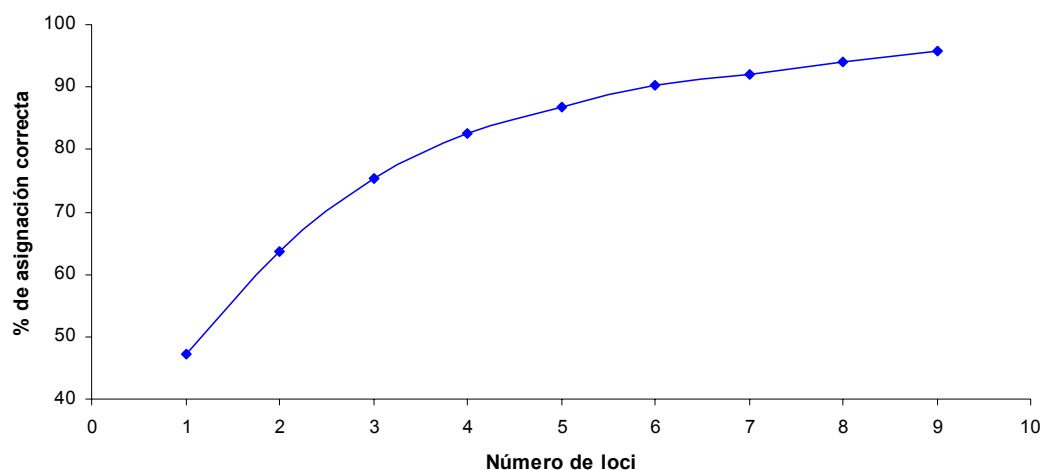


Figura 17. Porcentaje de asignación correcto de los individuos en función del número de loci analizados. Para cada uno de ellos, se indica el promedio obtenido para el conjunto de razas estudiadas.

4.9 Estadísticos forenses

4.9.1 Poder de exclusión

Una forma de cuantificar la eficacia de un conjunto particular de marcadores genéticos consiste en calcular la probabilidad de exclusión *a priori* (PE), la que se define como la probabilidad que un sistema genético específico brinde evidencias que conduzcan a la exclusión de un determinado suceso (por ejemplo, la paternidad discutida de un padre, la correspondencia entre la evidencia y la referencia en casos forenses, etc).

En el presente estudio, se evaluó el poder de exclusión de nueve microsatélites (*BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53*) en las razas bovinas de mayor importancia económica de la Provincia de Buenos Aires (Aberdeen Angus, Holando, Hereford, Nelore, Brahman) y en una población general formada por todos los individuos tipificados de estas razas.

En la tabla 33, se detallan los valores obtenidos del poder de exclusión combinado cuando se considera la exclusión de al menos un locus (PEC_S) y de al menos dos loci (PEC_D). Estos índices de exclusión se calcularon para cuatro situaciones diferentes: (i) exclusión de un padre conociendo los genotipos de la cría y su madre $-PE(p/m, c)-$; (ii) exclusión de un padre conociendo sólo el genotipo de la cría $-PE(p/c)-$; (iii) exclusión del padre y la madre de una cría $-PE(p, m/c)-$ y (iv) identificación individual $PE(e/r)$. El estadístico PEC_S superó el valor de 0,99 en todas las razas estudiadas, excepto en las paternidades donde no se dispuso de la información genética de la madre $-PE(p/c)-$. Cuando se consideró el criterio de exclusión de más de un loci, los valores observados de PEC_D decrecieron notablemente y más aún en los casos de $PE(p/c)-$ donde se obtuvieron los valores más inferiores (0,75 y 0,76 en las razas Nelore y Brahman, respectivamente). Las razas de origen índico presentaron los valores de exclusión más bajos en todas las situaciones analizadas. Por el contrario, los valores de exclusión superiores se alcanzaron en los casos de identificación individual $-PE(e/r)-$, observándose un rango de 0,99999703 a 0,99999999997.

Tabla 33. Estimación del poder de exclusión combinado en al menos un locus (PEC_S) y en uno o más loci (PEC_D) para cuatro situaciones diferentes: exclusión de un padre conociendo los genotipos de la cría y su madre $-PE(p/m, c)-$, exclusión de un padre conociendo sólo el genotipo de la cría $-PE(p/c)-$, exclusión del padre y la madre de una cría $-PE(p, m/c)-$ e identificación individual $PE(e/r)$. Se incluyen las razas más importantes que se crían en la provincia de Buenos Aires y en una población general formada por los individuos de estas razas.

		A. Angus	Hereford	Holando	Brahman	Nelore	Conjunto de Razas
PEC _s	PE(p/m,c)	0,997566547	0,997334703	0,9996293684	0,99555890	0,99614302	0,99980874961
	PE(p/c)	0,964762181	0,961872054	0,9910499998	0,94386224	0,95308088	0,99433240474
	PE(p,m/c)	0,999962038	0,999959003	0,9999983243	0,99992385	0,99993835	0,99999957721
	PE(e/r)	0,999999992	0,999999991	0,9999999998	0,99999996	0,99999995	0,99999999997
PEC _d	PE(p/m,c)	0,975833803	0,974605723	0,9947510061	0,96208032	0,96272652	0,99693388192
	PE(p/c)	0,816996254	0,809900951	0,9338481925	0,75121221	0,76530010	0,95309508881
	PE(p,m/c)	0,999187013	0,999170812	0,9999426543	0,99860545	0,99859020	0,99998230817
	PE(e/r)	0,999999434	0,999999462	0,9999999865	0,99999829	0,99999703	0,99999999562

4.10 Resumen de los casos analizados

4.10.1 Asignación de paternidades en situaciones de apareamiento múltiple

Con el fin de evaluar la utilidad de la batería de microsatélites utilizados y la metodología estadística, se resolvió un caso complejo de asignación de paternidad en una disputa judicial entre dos criadores de la raza Holstein. Como consecuencia de las extensas inundaciones ocurridas en la provincia de Buenos Aires en el año 2001, parte de los alambrados que separaban dos establecimientos de producción lechera de la raza Holando fueron parcialmente destruidos, ocasionando la mezcla de algunos animales. Este hecho, desencadenó una disputa judicial por la apropiación indebida de cinco terneros por parte de uno de los criadores. Para resolver este caso se trató de determinar la paternidad de cinco toros pertenecientes a los dos establecimientos (P1, P2, P3, P9 y P10) para cada una de las cinco crías disputadas (C4, C5, C6, C7 y C8). Debido al manejo de cría de tipo extensivo de los criadores de ambos campos no se contó con la información de la madre correspondiente a cada uno de los terneros. Cabe aclarar que los cinco toros analizados no conformaron la totalidad de los padres putativos de las cinco crías, debido a que algunos de los posibles progenitores no fueron muestreados.

Para determinar la paternidad se realizó la extracción de ADN mediante el método de DNAzol™ de las muestras de sangre de los diez animales incluidos en el estudio. Posteriormente, se tipificaron 9 microsatélites (*BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53*) y el locus de clase II *BoLA-DRB3* (tabla 34). El método estadístico utilizado consistió en la determinación de la paternidad del padre más probable mediante el procedimiento de asignación categórica incluido en el programa Cervus® 2.0. En la tabla 35 se detallan los resultados obtenidos para cada cría, incluyendo el LOD score (logaritmo del índice *L*, probabilidad de paternidad de un determinado padre relativa a la probabilidad de paternidad de un padre arbitrario de la población) y el índice + (logaritmo del cociente entre las razones de verosimilitud de los dos padres putativos más probables). Para evaluar el nivel de confianza del índice + se simularon 10.000 inferencias de paternidad contemplando los siguientes parámetros: número y proporción de padres muestreados, proporción de loci tipificados y tasa de error (1%).

Los resultados obtenidos mostraron que solamente la cría C5 evidenció la exclusión en más de un loci para los cinco padres. Las crías C4 y C7 no pudieron ser excluidas del padre P10; mientras que la C8 no fue excluida del toro P9. Las tres crías fueron asignadas a un sólo padre con un 95% de significancia, presentado un LOD score que varió desde 2,53 a 3,55. Los machos P1 y P2 presentaron la exclusión en un sólo alelo con respecto a la cría C6. La inconcordancia en un sólo locus no se consideró como evidencia concluyente de la exclusión de estos machos putativos como padres de esta cría, pues como se mencionó

anteriormente dichas diferencias pueden surgir de errores de tipificación, de la presencia de alelos nulos y de mutaciones. Sin embargo, aplicando el criterio de doble exclusión y el índice + la paternidad fue asignada al macho P1.

Tabla 34. Genotipos detectados en los nueve microsatélites analizados y en el locus *BoLA-DRB3* para cada animal estudiado (cinco crías C4, C5, C6, C7 y C8 y cinco padres alegados P1, P2, P3, P9 y P10).

Muestra	BM2113	BM1824	TGLA122	TGLA227	INRA023	MGTG7	SPS115	ETH225	TGLA53	BoLA-DRB3
P1	128 128	179 189	140 182	103 103	203 211	308 308	248 248	139 147	161 167	15 22
P2	128 138	179 183	150 152	75 107	207 215	294 294	244 244	147 149	157 187	6 15
P3	128 128	187 189	140 164	89 103	203 203	292 308	244 248	147 147	157 161	10 37
O4	128 138	181 183	174 174	103 103	209 213	292 308	244 244	147 149	171 187	16 19
O5	128 140	179 189	136 138	75 89	207 207	292 308	244 248	ND	161 165	15 22
O6	128 134	179 183	140 150	75 85	203 207	308 308	244 248	147 149	157 161	15 22
O7	128 138	179 189	140 140	75 79	207 213	292 308	244 244	149 151	161 187	16 22
O8	128 138	179 179	140 150	75 113	203 211	292 292	244 248	147 149	159 161	24 30
P9	128 138	179 179	150 150	85 113	203 207	292 304	244 248	147 151	159 171	3 24
P10	128 134	179 181	140 174	79 103	213 215	292 298	244 244	147 151	183 187	16 19

ND: no detectado.

Tabla 35. Resumen de los resultados obtenidos en la resolución del caso de *Paternidades en Situaciones de Apareamiento Múltiple*: padres asignados (con un 95% de confianza), valores de LOD score y del índice + para cada paternidad.

Cría	Padre asignado	LOD score	índice +
O4	P10	2.53	2.53
O5	NA	NE	NE
O6	P1	6.11×10^{-1}	1.63×10^{-1}
O7	P10	3.55	3.55
O8	P9	3.51	3.51

NA: paternidad no asignada; NE: no estimado.

4.10.2 Identificación individual en casos de abigeato

En este trabajo se analizaron un total de 108 muestras correspondientes a 35 casos de robo de ganado bovino localizados en la provincia de Buenos Aires. Debido al estado de descomposición de muchas de las muestras analizadas sólo se pudieron resolver 25 de los 35 casos analizados. En la tabla 36 se detallan los distintos tipos de muestras y el número de ellas que resultaron positivas para PCR en al menos un locus. Una observación importante con respecto a la remisión del material hacia el laboratorio fue que la gran mayoría de las muestras enviadas en alcohol pudieron ser tipificadas sin grandes inconvenientes por la técnica de PCR, independientemente del tipo de tejido u órgano considerado. Generalmente, las muestras que llegaron en avanzado grado de descomposición y las fijadas en formol resultaron negativas para PCR pese a los sucesivos intentos de extracción de ADN.

Tabla 36. Tipo de muestras analizadas correspondientes a un total de 35 casos de abigeato de la provincia de Buenos Aires. Se consideró como muestras positivas, a aquellas que presentaron al menos una amplificación positiva en la reacción de PCR.

Tipo de muestras	Muestras analizadas	Muestras positivas	Muestras negativas
Carne	97	79	18
Cuero/pelos	4	2	2
Órganos	3	3	0
Sangre fresca	3	2	1
Manchas de sangre	1	0	1
Total	108	86	22

En 11 de los 25 casos analizados positivamente se observó la exclusión genética en al menos 2 locus entre los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia) con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia). Basados en el criterio de doble exclusión se concluyó que la evidencia y la referencia pertenecieron a diferentes animales. En el resto de los casos analizados (14) al menos una muestra de referencia y otra de la evidencia presentaron el mismo genotipo en todos los marcadores analizados. Debido a que el perfil genético encontrado, en teoría, puede ser compartido por otro individuo de la población se estimó el índice L . Como se mencionó anteriormente dicho índice cuantifica el peso de la evidencia genética en el caso de coincidencia entre los genotipos de la muestras de referencia (G_r) y evidencia (G_e). En la mayoría de los casos estudiados no se contó con la información referente a la raza de origen de la muestra

secuestrada a los sospechosos de robo. Como consecuencia de ello, la población de los posibles individuos que potencialmente pueden haber contribuido a la evidencia está formada por los animales de las diferentes razas o subpoblaciones de bovinos que conviven en la provincia de Buenos Aires.

En la tabla 37 se detallan los valores del índice L para 11 muestras correspondientes a 10 casos de abigeato donde el genotipo de la evidencia coincidió con el de la referencia. El índice L se calculó siguiendo tres criterios diferentes. En el primero de ellos, se estimó considerando que el animal que aportó la evidencia provenía de alguna de las siguientes razas bovinas: Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Nelore y Brahman. En el segundo criterio, se contempló la hipótesis que el animal que contribuyó a la evidencia fue un individuo de la especie bovina de la provincia de Buenos Aires, sin el conocimiento de la raza particular a la cual perteneció. En la mayoría de los casos analizados los valores obtenidos para el índice L variaron notablemente entre las cinco razas estudiadas. Sin embargo, las mayores diferencias se observaron entre las subpoblaciones de origen cebuino y taurino, mientras que las tres razas europeas presentaron valores similares. Al comparar los valores estimados para L en cada muestra para cada una de las razas se observó que en ocho muestras de las once analizados la raza Aberdeen Angus fue la que mostró los valores superiores dicho índice. Además, la raza Hereford y la raza Brahman mostraron los mayores valores en dos y una muestra, respectivamente. En el caso número 8 los valores obtenidos de L fueron muy similares entre las razas Brahman ($1,09E-09$) y Aberdeen Angus ($4,15E-09$), seguido por la raza Nelore ($9,74E-09$). Los valores de L calculados en la población general se hallaron dentro del rango presentado por el conjunto las razas estudiadas.

Con el fin de no introducir errores en el cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de las génicas en una población se requiere que la misma posea una estructura genética homogénea. Ésto no se cumple en la especie bovina, la que se compone de grupos de individuos o razas relativamente aisladas entre sí desde el punto de vista reproductivo. El tercer criterio utilizado en el cálculo del índice L incorpora la estructura poblacional mediante el empleo del valor del parámetro F_{ST} de la población general. Como se observa en la tabla 37, los valores del índice L estimados de esta manera aumentaron en varios órdenes de magnitud con respecto a la raza que presentó en cada caso el mayor valor de dicho índice.

En el presente trabajo, se utilizó otra metodología alternativa y conservativa de evaluar el índice L . Este enfoque alternativo se basó en determinar primero el origen racial de la evidencia mediante la aplicación de los métodos asignación de individuos y posteriormente, estimar el índice L empleando las frecuencias de la raza asignada. De esta manera, en los diez casos analizados, la raza que resultó asignada se correspondió con la que presentó el mayor valor del índice L .

Tabla 37. Índice L estimado en 10 casos de abigeato. Se indica en cada uno, el número de microsatélites analizados y los valores del índice L cuando se consideró diferentes criterios para elección de la población de origen del individuo que aportó la evidencia. Se indica en color azul la raza en donde se observó el valor superior de L . Las frecuencias génicas de la población general se calcularon sobre la base de la totalidad de los individuos analizados de las cinco razas de bovinas más comunes criadas en la provincia de Buenos Aires.

Casos	Número de Locus	Brahman	Nelore	Aberdeen Angus	Hereford	Holando	Población general	Ajuste por F_{ST}
1	6	1,27E-11	9,18E-12	9,51E-11	1,10E-10	1,88E-11	6,62E-11	2,24E-06
2	5	6,28E-11	5,71E-11	2,58E-10	1,19E-09	4,88E-10	4,58E-10	9,91E-06
3	6	8,13E-14	1,25E-12	1,31E-09	7,08E-11	2,22E-09	9,66E-11	2,01E-06
4	5	4,40E-08	1,05E-08	4,70E-07	1,42E-08	6,62E-07	1,21E-07	6,67E-05
5.a	5	7,55E-10	3,20E-10	1,75E-06	9,14E-09	1,29E-08	8,84E-09	5,33E-05
5.b	5	9,75E-10	1,02E-09	3,77E-06	1,32E-08	2,58E-08	2,01E-08	1,10E-04
6	7	3,77E-14	2,85E-15	4,07E-09	2,24E-11	1,10E-12	4,11E-12	5,25E-07
7	7	3,42E-14	8,42E-16	1,46E-10	9,54E-14	1,39E-11	1,01E-12	9,36E-08
8	7	1,09E-09	9,74E-09	4,15E-09	6,96E-10	5,13E-11	3,81E-09	7,19E-06
9	8	2,06E-17	4,10E-16	1,01E-11	5,42E-13	4,35E-13	1,05E-13	2,29E-08
10	6	5,88E-14	3,09E-16	8,68E-10	3,49E-11	8,12E-11	4,40E-12	2,34E-06

5.1 Análisis de la diversidad genética

El estudio de la biodiversidad aborda principalmente la problemática de la conservación y extinción de especies silvestres (Soulé y Wilcox, 1980; Soulé, 1985; Bouzat, 1994). Sin embargo, las razas domésticas también constituyen una parte importante de la diversidad biológica (Hall y Bradley, 1995), pues éstas poseen alelos y combinaciones de alelos únicas como resultado del propio proceso de domesticación mediante selección artificial.

El mantenimiento de la diversidad genética es considerado una de las condiciones fundamentales para la supervivencia a largo plazo de las especies. Es por esta razón que la genética poblacional y evolutiva ocupan un rol importante en la biología de la conservación, llegando a definir un campo de estudio actualmente conocido como Genética de la Conservación. El objetivo principal de esta disciplina es contribuir a la preservación de la diversidad de las especies, de manera de mantener así su potencial evolutivo (Schonewald-Cox *et al.*, 1983). La genética de la conservación no sólo permite comprender el significado de la diversidad genética, sino también plantear estrategias de manejo y conservación de esta variabilidad (Frankel, 1970; Frankel y Soulé, 1981).

Durante los últimos años el estudio de la diversidad biológica ha pasado a ser un tema central de investigación en el tratamiento de la problemática de la conservación y extinción tanto de especies silvestres como domésticas. La domesticación de animales silvestres ha producido lo que actualmente conocemos como "razas domésticas", es decir "grupos de animales seleccionados por el hombre con apariencia uniforme que permita distinguirlos de otros miembros de la misma especie" (Clutton-Brock, 1987). Hall y Ruane (1993) han estimado que actualmente el número de razas domésticas en el mundo llega a unas 3213, de las cuales 780 son razas bovinas.

La mayoría de las razas bovinas se encuentran genéticamente aisladas y su origen se remonta a un reducido grupo de animales fundadores. Esta situación se ha visto agravada en las razas nativas o autóctonas por la drástica reducción poblacional, debido al uso generalizado de unas pocas razas altamente seleccionadas. Sin embargo, estas últimas a pesar de contar con poblaciones de millones de individuos, debido al uso extensivo de las modernas técnicas de inseminación artificial y a la utilización de unos pocos machos de elite, poseen un reducido tamaño poblacional efectivo y un bajo nivel de diversidad genética. Es por estas razones, que la FAO ha realizado esfuerzos tendientes a la preservación de la variabilidad genética de las diferentes razas.

La utilización de marcadores genéticos es fundamental para el manejo y conservación de razas autóctonas. La caracterización de las razas, basada originalmente en caracteres fenotípicos, ha incorporado en los últimos años marcadores de tipo bioquímicos y

de ADN (Miller, 1966; Baker y Manwell, 1980; Kidd *et al.*, 1980; Manwell y Baker, 1980; Bowling y Ryder, 1987; Bowling, 1994; Loftus *et al.*, 1994a; Medjugorak, 1994; Peral García, 1994; Peral García *et al.*, 1996). La evaluación de la estructura poblacional mediante el análisis de los niveles de heterocigosis y endocría a través de dichos marcadores es fundamental si se considera a la raza como unidad de conservación. La genética de la conservación establece el marco teórico necesario para el desarrollo de estrategias que tiendan a mantener la variabilidad genética de las diferentes razas bovinas.

En el presente trabajo se analizaron nueve microsatélites autosómicos (*BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MGTG7* y *TGLA53*) en dos razas cebuinas (Brahman y Nelore), cinco taurinas europeas (Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Jersey y Retinta) y cuatro taurinas criollas americanas (Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña). En los 324 individuos analizados se detectaron un total de 104 alelos en los 9 loci tipificados. El N_{aob} promedio para todas las razas resultó ser de 6,8, variando entre 3,7 en la raza Jersey y 7,8 en el Criollo Chaqueño Boliviano. Existe una correlación entre el valor de N_{aob} y el tamaño de la muestra. Por esta razón y con el fin de remover el desvío introducido en el N_{aob} por dicha causa, este estimador se corrigió para una muestra de 20 individuos tomados al azar. Cuando se compararon los N_{aes} entre razas, los menores valores se observaron en las razas Británicas (Jersey, Hereford y Aberdeen Angus). La raza Jersey, además, presentó la menor heterocigosidad esperada promedio con un valor de 0,6. En el otro extremo se hallaron las razas Holando (0,79), la Criolla Saavedreña (0,78) y la Criolla Chaqueña Boliviana (0,77).

A pesar que en el presente trabajo sólo se analizaron 10 individuos de la raza Jersey, el reducido nivel de diversidad genético observado en dicha población ha sido reportado previamente en otros estudios. En los trabajos de caracterización genética mediante polimorfismos bioquímicos y microsatélites que incluyeron a Jersey, se evidenció en esta raza los valores más reducidos de N_a y H_e (McHugh *et al.*, 1997; 1997; Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997; Kantanen *et al.*, 2000). Estos trabajos además revelaron que las razas británicas poseían valores de diversidad inferiores a los encontrados en el resto de las razas europeas. Este hecho podría ser consecuencia del efecto fundador, causado por la reducida variabilidad genética de las poblaciones bovinas que inicialmente contribuyeron a la formación de cada raza (Feliuss, 1995). La introducción de las modernas tecnologías de manejo y reproducción que se comenzaron aplicar en las islas británicas a mediados del siglo pasado, pueden también haber contribuido a los bajos niveles de variabilidad observados (McHugh *et al.*, 1997).

A pesar de poseer valores intermedios en el número de alelos, las razas cebuinas estudiadas presentaron, después de la raza Jersey, los valores más reducidos de

heterocigosis. Esta discrepancia observada entre la H_e y el N_a se debió a la presencia en varios de los loci estudiados de alelos en muy baja frecuencia y más aún a la existencia, en la mayoría de los loci, de alelos con frecuencia génicas elevadas. Con la excepción del *INRA023* en la raza Nelore, todos los loci de las razas cebuinas, presentaron al menos un alelo con frecuencias superiores al 30%, superando la mitad de ellos el 50%. En coincidencia con estos resultados, MacHugh y colaboradores (1997) hallaron valores intermedios de heterocigosis y número de alelos en razas cebuinas de la India, al compararlas con razas británicas y nativas africanas.

La mayoría de las razas criollas y la raza Holando, presentaron los mayores valores de H_e y N_a . Georges y Andersson (1996) estimaron que la población mundial de esta raza europea, compuesta por millones de individuos distribuidos por todo el mundo, tendría un tamaño efectivo de alrededor de 1.000 como consecuencia del uso masivo de unos pocos machos de elite y de las técnicas de inseminación artificial. Sobre la base de esta información, *a priori*, se esperarían encontrar bajos niveles de diversidad genética en la raza Holando. Sin embargo, los altos valores observados en la raza Holstein de Argentina coinciden con los reportados en otros estudios basados en microsatélites (MacHugh *et al.*, 1997) y en grupos sanguíneos (Blott *et al.*, 1998).

Como se describió en la introducción, las razas criollas americanas se originaron a partir de los animales traídos por los conquistadores españoles o portugueses a finales del siglo XV y principios del siglo XVI. El poblamiento bovino de América se produjo a partir de sucesivos procesos migratorios en dirección norte-sur, producidos a partir de un número reducido de animales. Los animales introducidos, se multiplicaron rápidamente y desde allí se dispersaron por todo el sur del continente. Desde la introducción de los primeros bovinos en América durante el siglo XV hasta mediados del siglo XIX, el bovino criollo constituyó el único ganado existente en el Nuevo Mundo.

La introducción de los primeros reproductores de origen británico con el fin de producir un animal que se adaptara mejor a las nuevas exigencias del mercado, trajo como consecuencia una rápida disminución poblacional de las razas criollas, quedando las mismas relegadas a zonas marginales del continente donde las razas británicas no lograron adaptarse. A mediados del presente siglo, comienza en Sudamérica la introducción de las razas índicas. Éstas, con su alta resistencia al calor y debido al vigor híbrido producido en sus cruza con razas británicas y criollas, se expandieron rápidamente en ambientes subtropicales y tropicales, donde había sobrevivido el ganado criollo puro. Esta expansión tuvo como consecuencia una nueva reducción poblacional.

Estos hechos podrían haber conducido a la pérdida de alelos en sistemas altamente polimórficos como los microsatélites y a una reducción de la heterocigosidad. Sin embargo, en comparación con las demás razas, las criollas presentaron valores intermedios o

superiores tanto en el N_a como en la H_e . Esta observación podría ser consecuencia de factores históricos y demográficos. Una explicación plausible, estaría dada por el hecho que el grupo fundador podría haber tenido un origen múltiple. Como se mencionó anteriormente, los bovinos introducidos por los conquistadores provenían de los alrededores de los puertos de embarque de Andalucía e islas Canarias. Además, podrían haber contribuido a estas poblaciones animales provenientes de Portugal, del norte de España, de la costa occidental de África, de las Islas Madeiras y Cabo Verde, lo que habría contribuido posiblemente a una alta diversidad genética en el grupo fundador. Posteriormente, el rápido crecimiento poblacional sufrido por las poblaciones bovinas en los primeros años de la colonización habría minimizado la pérdida de la riqueza alélica aportada por el grupo fundador (Primo, 1992). Otro factor que podría haber contribuido en la variabilidad genética observada, es la utilización de sistemas extensivos de cría con reducidos niveles de selección artificial en el manejo de las poblaciones criollas. Por último, en los últimos 100 años la introducción en América de las razas europeas e índicas pudo haber contribuido con nuevos alelos a través de procesos de introgresión génica. Este fenómeno, estaría avalado por la presencia de alelos diagnósticos de cebú en varias poblaciones criollas. La mezcla de genes índicos se discutirá en detalle en la sección *Estructura poblacional y relaciones filogenéticas entre las razas*. La contribución en mayor o menor medida de estos factores habría compensado la reducción poblacional sufrida por las poblaciones criollas en el último siglo, y explicaría los niveles considerables de diversidad genética observados en el presente trabajo.

5.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento

En una población mendeliana se considera que un locus determinado presenta HWE si las proporciones genotípicas observadas en la población pueden ser completamente especificadas por las frecuencias génicas del locus en cuestión. O en otras palabras, los alelos de un locus se encuentran distribuidos azarosamente en la población y por ende no existe asociación entre los pares de genes que un individuo recibe de sus padres. Las perturbaciones en el HWE pueden ser consecuencia de varios factores, entre los que se incluyen principalmente a:

- *Errores experimentales (por ejemplo presencia de alelos nulos).*
- *Reproducción no azarosa (por ejemplo endocría o exocría).*
- *Subdivisión Poblacional (efecto Wahlund).*
- *Selección.*
- *Migración o flujo genético.*

- Factores cronológicos de muestreo (por ejemplo muestras tomadas en diferentes años).

En los estudios que involucran el análisis de un conjunto de marcadores genéticos en varias poblaciones, la distribución de los desequilibrios de Hardy-Weinberg puede orientar hacia el reconocimiento de los posibles factores que lo producen. Por ejemplo, si sólo unos pocos microsatélites se encuentran en desequilibrio en muchas poblaciones, se podría atribuir el desequilibrio a la selección natural o a la presencia de alelos nulos. Por el contrario, si el desequilibrio ocurre en la mayoría de los marcadores de una población, se puede argumentar la presencia de una subestructura poblacional, flujo genético, apareamiento no aleatorio, etc.

Las poblaciones bovinas generalmente violan la mayoría de los supuestos del HWE, ya que son poblaciones finitas, con apareamientos preferenciales, con una marcada desproporción entre sexos, bajo una fuerte presión de selección artificial, con altos niveles de endocria y/o migración. Es por esta razón, que *a priori* se esperaría encontrar un alto porcentaje de desequilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, los estudios de genética de poblaciones realizados en una amplia gama de razas bovinas basados en el análisis de diferentes tipos de marcadores genéticos, mostraron que en la mayoría de los casos el porcentaje de desequilibrios resultó ser menor que el esperado por azar (MacHugh *et al.*, 1997; Martín-Burriel *et al.*, 1999; Kantanen *et al.*, 2000; Mateus *et al.*, 2004).

En este trabajo, el HWE se evaluó a través del índice de F_{IS} para cada locus en las once razas analizadas. El valor de probabilidad se calculó mediante el método exacto descrito por Gou y Thompson (1992). El nivel de significancia global del HWE para todos los loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada loci se determinó utilizando el método de Fisher.

En total, 19 de las 99 combinaciones locus-población (9 loci en 11 poblaciones) mostraron desviaciones significativas del HWE con valores de probabilidad inferiores al 5%. El número observado de desequilibrios fue mayor al esperado simplemente por azar (aproximadamente cinco). La proporción de desequilibrios fue similar en los nueve loci analizados. Sin embargo, la comparación de los marcadores en desequilibrio entre las razas evidenció una marcada diferencia entre ellas. Las razas Nelore y Hereford presentaron seis y cuatro desequilibrios, respectivamente, de los 19 observados. Por el contrario en las cuatro razas criollas analizadas, solamente dos loci no se encontraron en HWE.

La distribución homogénea de desequilibrios entre los marcadores, no sostiene la hipótesis que atribuye el desequilibrio de Hardy-Weinberg a la presencia de alelos nulos u otros errores de tipo experimental. Sin embargo, los alelos nulos se presentan en general en razas o grupos de individuos donde la mutación en la región 3' de hibridación de los primers aparece con una frecuencia apreciable. Esto origina un desequilibrio hacia la homocigosis

en el marcador que presenta la mutación, debido a la subtipificación del marcador afectado. Otra argumentación en contra de la presencia de alelos nulos, se apoya en el hecho que la mayoría de los marcadores analizados en este trabajo forman parte del panel de microsatélites recomendados por la ISAG para identificación individual y resolución de paternidades, y por el proyecto de biodiversidad de la FAO para estudios de caracterización de razas bovina. Uno de los criterios tomados en cuenta por estas instituciones fue precisamente la ausencia de alelos nulos en los marcadores propuestos.

La prueba global de HWE para todos los loci tomados en conjunto en cada población evidenció desequilibrio en las poblaciones de Nelore, Hereford y Aberdeen Angus. El resultado obtenido para las razas Nelore y Hereford se pudo atribuir al hecho que los individuos analizados en cada una de ellas no pertenecen a una población real. La primera se compone de animales pertenecientes a dos muestras (Arroyo del medio, Jujuy y Todos Santos, Bolivia). Esta última es un centro de inseminación artificial, por lo tanto, los individuos muestreados provenían de varios establecimientos ganaderos de la zona. De una forma similar parte de los ejemplares tipificados de la raza Hereford corresponden al laboratorio de Inmunología de la Sociedad Rural de Uruguay, que recibe muestras de varios establecimientos de cría de ese país. Los 59 individuos tipificados de la raza Aberdeen Angus, se obtuvieron de cuatro cabañas diferentes. Tres de las cuales se ubican en el norte de la provincia de Buenos Aires, y otra pertenece al partido de Lobería (cabaña Flores Chicas). Cuando se realizó una prueba de desequilibrio agrupando las poblaciones del norte, todos los marcadores se presentaron en HWE. Por el contrario, el rodeo de Flores Chicas presentó desequilibrio en los microsatélites *TGLA53* y *BM1824*, mostrando un exceso y defecto de heterocigotas, respectivamente. Estos resultados evidencian que los dos desequilibrios de Hardy-Weinberg observados en la raza Aberdeen Angus serían consecuencia del efecto de la población de Flores Chicas y no por el mero resultado de la subdivisión poblacional. Debido a que esta raza se encuentra sujeta a una constante presión de selección artificial, no se descarta a este factor como uno de los causantes del desequilibrio observado. La mayoría de los animales que se analizaron en Flores Chicas fueron machos, además el manejo reproductivo de este establecimiento se basa en la utilización de unos pocos toros, práctica habitual en la mayoría de las razas bovinas. De esta manera, es posible que un toro introducido en la población haya contribuido con un alelo que estaba ausente o presente en muy baja frecuencia hasta ese momento en el establecimiento, produciendo varios hijos heterocigotas para este alelo. Este hecho, fue observado en Flores Chicas, donde 19 de los 35 animales tipificados presentaron el alelo 173 en heterocigosis, mientras que no se observó ningún individuo homocigota para dicha variante.

Se entiende como desequilibrio de ligamiento a la asociación no azarosa de alelos de diferentes loci en los gametos. Entonces, si los desvíos de Hardy-Weinberg son considerados como desequilibrios intralocus, las desviaciones del equilibrio gamético pueden tratarse como desequilibrios interloci. Los desequilibrios gaméticos pueden estar ocasionados por una variedad de factores, que incluyen al ligamiento físico de los genes en una misma región cromosómica, fenómenos epistáticos, deriva genética, migración, mezcla genética, etc. (Lewontin, 1998).

En el presente trabajo se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher el desequilibrio gamético para las 36 combinaciones de loci en cada una de las 11 poblaciones analizadas. Se observaron un total de 18 desequilibrios de ligamiento en las 396 tablas de contingencia analizadas. Este valor es inferior a los 19,6 desequilibrios de ligamiento esperados por azar considerando un error de tipo I del 5%. La proporción de desequilibrios entre los loci fue similar, observándose un rango de 0 a 2 razas en desequilibrio por par de marcadores estudiados. Sin embargo, la comparación del número de microsatélites en desequilibrio de ligamiento entre las razas evidenció una cierta heterogeneidad. Mientras que sólo dos razas concentraron 11 de los 18 desequilibrios observados (Aberdeen Angus = 6, Hereford = 5), las demás razas analizadas presentaron uno o ningún desequilibrio de ligamiento, exceptuando la raza Criolla Argentina que presentó tres. La prueba global de desequilibrio de Fisher y la corrección del nivel de significancia por el método de Bonferroni, evidenciaron el equilibrio de ligamiento en todas las poblaciones y marcadores analizados.

Todos los marcadores autosómicos seleccionados en este trabajo se localizan en diferentes cromosomas. La presencia de varios loci en desequilibrio de ligamiento en las razas Aberdeen Angus y Hereford podría ser consecuencia de mezcla genética o subestructuración poblacional, como se mencionó anteriormente para el desequilibrio de Hardy-Weinberg.

5.3 Estructura poblacional y relaciones filogenéticas entre las razas

Numerosos estudios han tenido como objetivo principal el análisis de las relaciones entre las distintas razas bovinas. Este enfoque es posible si se asume que los marcadores genéticos utilizados son selectivamente neutros, y que las poblaciones están en equilibrio bajo deriva y migración, por lo que la similitud entre las razas refleja el ancestro común. Algunos autores sostienen que los procesos de selección no han modificado las frecuencias génicas originales, las que serían consecuencia de la historia particular de cada raza, de los movimientos migratorios y de la distribución geográfica actual (Baker y Manwell, 1980; Manwell y Baker, 1980; Medjugorac *et al.*, 1994). Es por esta razón que, las distintas razas

pueden ser agrupadas sobre la base de sus frecuencias génicas, coincidiendo dichas agrupaciones con las realizadas previamente mediante datos históricos y morfológicos. Recientemente, trabajos realizados con microsatélites, ADN mitocondrial y con polimorfismos del cromosoma Y han estudiado los centros de domesticación, las relaciones genéticas, las rutas migratorias y los procesos de introgresión en razas de Europa, África y Asia (Bradley *et al.*, 1994; 1996; Lotfus *et al.*, 1994a; 1994b; MacHugh *et al.*, 1994; 1997; 1998; Kantanen *et al.*, 2000; Cañón *et al.*, 2001; Troy *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en dichos estudios coincidieron con las conclusiones obtenidas previamente a partir de polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos (Baker y Manwell, 1980; Manwell y Baker, 1980; Medjugorac *et al.*, 1994).

En el presente trabajo se utilizaron distintas herramientas para evaluar la estructura y las relaciones genéticas de las poblaciones, entre las que se incluyen el estudio de la distribución de las frecuencias génicas, los test de diferenciación poblacional, los índices de fijación, el análisis de AMOVA, la construcción de árboles filogenéticos y el análisis multivariado.

En las once razas estudiadas se detectaron un total de once alelos privativos (10,6%), tres en la raza Nelore, cuatro en Holando, tres en Aberdeen Angus y uno en Retinta. Sin embargo, las frecuencias génicas de los alelos privativos fueron menores a 0,1, con la excepción del alelo 144 del locus *BM2113* en la raza Nelore que se encontró en una frecuencia de 0,1. Las demás variantes se encontraron presentes en más de una de las razas bovinas analizadas. Por lo tanto, las principales diferencias entre las razas y entre los grupos de razas se basaron fundamentalmente en sus respectivas frecuencias génicas, y en menor medida por diferencias en el tamaño de los alelos presentes. Cabe recalcar que, algunas variantes genéticas de algunos de los microsatélites, como por ejemplo *TGLA227* y *ETH225*, sólo se detectaron en las razas indicas.

5.3.1 Diferenciación genética

En el presente trabajo se calcularon los test de diferenciación genética y genotípica para cada uno de los 9 microsatélites analizados entre las 11 razas bovinas estudiadas. Además, se estimó la diferenciación génica y genotípica para cada par de poblaciones. A pesar que algunos STRs como el *MGTG7* y el *SPS115*, presentaron el mismo alelo mayoritario en todas las razas, todos los loci mostraron diferencias significativas a nivel génico y genotípico entre las 11 poblaciones analizadas ($p < 0,01$). En cuanto a la comparación entre cada par de poblaciones, solamente las razas Criolla Argentina y Criolla Chaqueña Boliviana no presentaron diferencias significativas entre sus frecuencias génicas.

En estas dos razas, solamente el locus *ETH225* evidenció valores de probabilidad inferiores al 5% para el test de diferenciación genética.

Las razas Criolla Chaqueña Boliviana y Criolla Argentina son muy parecidas fenotípicamente, siendo unas de las pocas razas americanas que, por no haber sido seleccionadas por color de capa, presentan todos los pelajes descriptos para la especie (Primo, 1992). Por otra parte, el área donde habita el bovino Chaqueño Boliviano corresponde a la misma región biogeográfica que la ocupada por gran parte del Criollo Argentino. Más allá de los límites políticos, el chaco argentino y boliviano no sólo comparte las mismas condiciones ambientales y biogeográficas, sino que también constituyen una unidad desde el punto de vista histórico y social. Una estrecha similitud entre estas dos razas a nivel de ADN fue puesta de manifiesto en un estudio previo de caracterización genética realizado mediante el análisis de ocho genes estructurales (Lirón, 1999), lo cual apoyaría también la idea de que forman parte de la misma unidad poblacional y de conservación.

Otros estudios realizados con grupos sanguíneos, polimorfismos bioquímicos y microsatélites en diferentes razas bovinas de todo el mundo también han evidenciado una extensa diferenciación genética entre la mayoría o en todas poblaciones analizadas (Blott *et al.*, 1998; MacHugh *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un limitado flujo génico entre las razas bovinas modernas que ha ocasionado una diferenciación genética significativa entre ellas.

5.3.2 Estructura genética. Índices de fijación y análisis de la varianza

En la presente tesis, la subdivisión poblacional se evaluó mediante el cálculo de los índices de fijación: F_{ST} (Weir y Cockherham, 1984), G_{ST} (Nei, 1973), R_{ST} (Slatkin, 1995) y el análisis de la varianza (Weir y Cockerham, 1984).

El valor promedio estimado para el índice F_{ST} y G_{ST} fue cercano al 8%. Estos valores son equivalentes a los obtenidos en otros estudios de diversidad genética que utilizaron microsatélites. Así por ejemplo, el valor de subdivisión fue del 7-11% en razas bovinas europeas (MacHugh *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000., Cañón *et al.*, 2001; Mateus *et al.*, 2004), del 6% en cerdos (Martínez *et al.*, 2000) y del 8% en equinos (Cañón *et al.*, 2000). Como se mencionó en el punto anterior, los niveles de diferenciación genética y los valores de F_{ST} estimados indican un reducido flujo genético entre las razas bovinas.

Los valores estimados de F_{ST} y G_{ST} variaron en forma considerable entre los marcadores utilizados, desde 0,023 en el locus *SPS115* hasta 0,14 en el locus *TGLA227*. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos, e indican una extensa variación en la habilidad que poseen los diferentes microsatélites para diferenciar

genéticamente las poblaciones (MacHugh *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000). Además, en el presente trabajo se estimó el índice R_{ST} , el que se basa en el modelo *Step Wise Model* (SMM) que tiene en cuenta tanto las frecuencias génicas como el tamaño de los alelos. El valor promedio hallado para este índice (14,4%) en todos los loci fue mayor al obtenido por el F_{ST} y G_{ST} , lo que implica que la diferenciación entre las poblaciones no sólo esta dada por las frecuencias génicas sino también por el tamaño de los alelos. Las diferencias del valor del índice R_{ST} entre los loci fueron mucho más acentuadas que las observadas con los otros estimadores de subdivisión poblacional. Así por ejemplo, los loci *BM1824*, *MGTG7* y *TGLA53* presentaron valores inferiores al 3% mientras que en el otro extremo los microsatélites *TGLA227* y *ETH225* evidenciaron valores del 38% y 41%, respectivamente.

Otra forma de evaluar la estructura genética de las poblaciones es mediante el análisis molecular de varianza o AMOVA, el cual consiste en la partición de la varianza genética total en componentes de covarianzas debidos a diferencias entre los individuos dentro de cada población, entre las poblaciones y entre los grupos de poblaciones (Weir, 1996). Un primer análisis de la varianza se realizó en las 11 razas bovinas utilizando los nueve microsatélites incluidos en el presente trabajo. El porcentaje de variación entre las razas fue equivalente al índice F_{ST} . El segundo AMOVA se realizó separando las razas analizadas en dos grupos según su origen cebuino o taurino. En este caso, el porcentaje de variación entre estos grupos fue de 7,8% frente a un 5,8% obtenido entre las poblaciones dentro de cada grupo. Estos resultados estarían indicando que la mayor parte de las diferencias genéticas halladas entre las razas estudiadas se corresponde con su origen. Algunos marcadores como el *ETH225* y el *TGLA227* presentaron altos porcentajes de variación entre las razas cebuinas y taurinas (20% y 19%, respectivamente) en comparación con las diferencias observadas entre las poblaciones dentro de estos grupos (3,2% y 6,8%, respectivamente). Por otro lado, los loci *MGTG7* y *SPS115* aportaron con menos del 1% a la diferenciación entre las razas taurinas y cebuinas.

La hipótesis más aceptada actualmente sobre el origen del ganado cebú sostiene que el tipo *Bos indicus* fue domesticado en forma independiente del *Bos taurus* en algún lugar de la India. Estudios previos basados en polimorfismos de proteínas, grupos sanguíneos, RFLPs y microsatélites han demostrado una gran divergencia entre los dos grupos mayores de bovinos (Brend, 1972; Naik, 1978; Manwel y Baker, 1980). Mediante el análisis de secuencias correspondientes a la región de control del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha estimado una divergencia mínima de 210.000 años para los dos taxa (Loftus *et al.*, 1994a; Bradley *et al.*, 1996). MacHugh y colaboradores (1997) estimaron la divergencia entre los grupos taurinos y cebuinos en unos 610.000-850.000 años mediante el análisis de microsatélites. Estos datos son apoyados por estudios basados en haplotipos del cromosoma Y (Bradley *et al.*, 1994).

La gran divergencia existente entre los genomas cebuinos y taurinos se vio reflejada en los resultados obtenidos en el análisis de AMOVA que se realizó separando las razas estudiadas pertenecientes a dichos grupos. La mayor parte de la variación hallada en los nueve microsatélites en las once razas estudiadas se explica por su pertenencia a uno de estos dos grandes grupos. En la figura 18, se resumen las frecuencias génicas obtenidas para los microsatélites *ETH225* y *TGLA227*, dado que presentaron la mayor variación entre las razas cebuinas y taurinas. Esta comparación evidenció la presencia de algunos alelos diagnósticos para las razas índicas, ya que estas variantes no se hallaron en las primeras (*TGLA227-79*, *ETH225-153*, *ETH225-157*, *ETH225-159*). Para la determinación de los alelos diagnósticos no se consideró a las razas criollas, pues se ha reportado la introgresión de genes índicos en alguna de estas poblaciones (Giovambattista *et al.*, 2000; Rípoli, 2002). Como se observa en la figura 18, las diferencias entre las razas cebuinas y taurinas no sólo se basaron en las frecuencias génicas sino también en el tamaño de los alelos. Llamativamente, las variantes genéticas mayoritarias de las razas índicas en los STRs *ETH225* y *TGLA227* se encuentran desplazadas hacia uno de los extremos de la distribución.

Asumiendo que los microsatélites poseen un polimorfismo neutral, las principales fuerzas evolutivas que han contribuido a la diversidad observada en las razas estudiadas son la deriva genética, la migración y las mutaciones. El aislamiento reproductivo como consecuencia de factores geográficos y culturales (manejos reproductivos) ha reducido el tamaño efectivo de las poblaciones y ha contribuido a la subdivisión genética detectada en los estudios de caracterización de razas con diversos marcadores genéticos. Por otra parte, la migración ha actuado como fuerza opuesta a la mutación, reduciendo las diferencias acumuladas por los otros procesos. Por último la mutación, fuente última de toda variación, opera en el mismo sentido que la deriva incrementando las diferencias encontradas entre las razas. No obstante, la migración, la deriva y la mutación han ejercido distintas fuerzas relativas en la determinación de las diferencias genéticas reflejadas en la distribución de frecuencias génicas presentes en los diferentes grupos de razas estudiadas. Por ejemplo, en las razas europeas, las cuales han permanecido relativamente aisladas genéticamente desde su formación hace menos de 200 años, la deriva habría cumplido un papel preponderante en las diferencias observadas en las frecuencias de los STRs (MacHugh *et al.*, 1997; Kantanen *et al.*, 2000; Cañón *et al.*, 2001). Por el contrario, la mutación en estas razas habría tenido una menor importancia debido al poco tiempo de separación entre ellas. En contraste con el origen de las razas europeas y americanas, las razas cebuinas y taurinas se habrían domesticado independientemente y habrían divergido hace más de 250.000 años. En este periodo las mutaciones habrían cumplido un papel muy importante en la distinción de los dos principales grupos de bovinos.

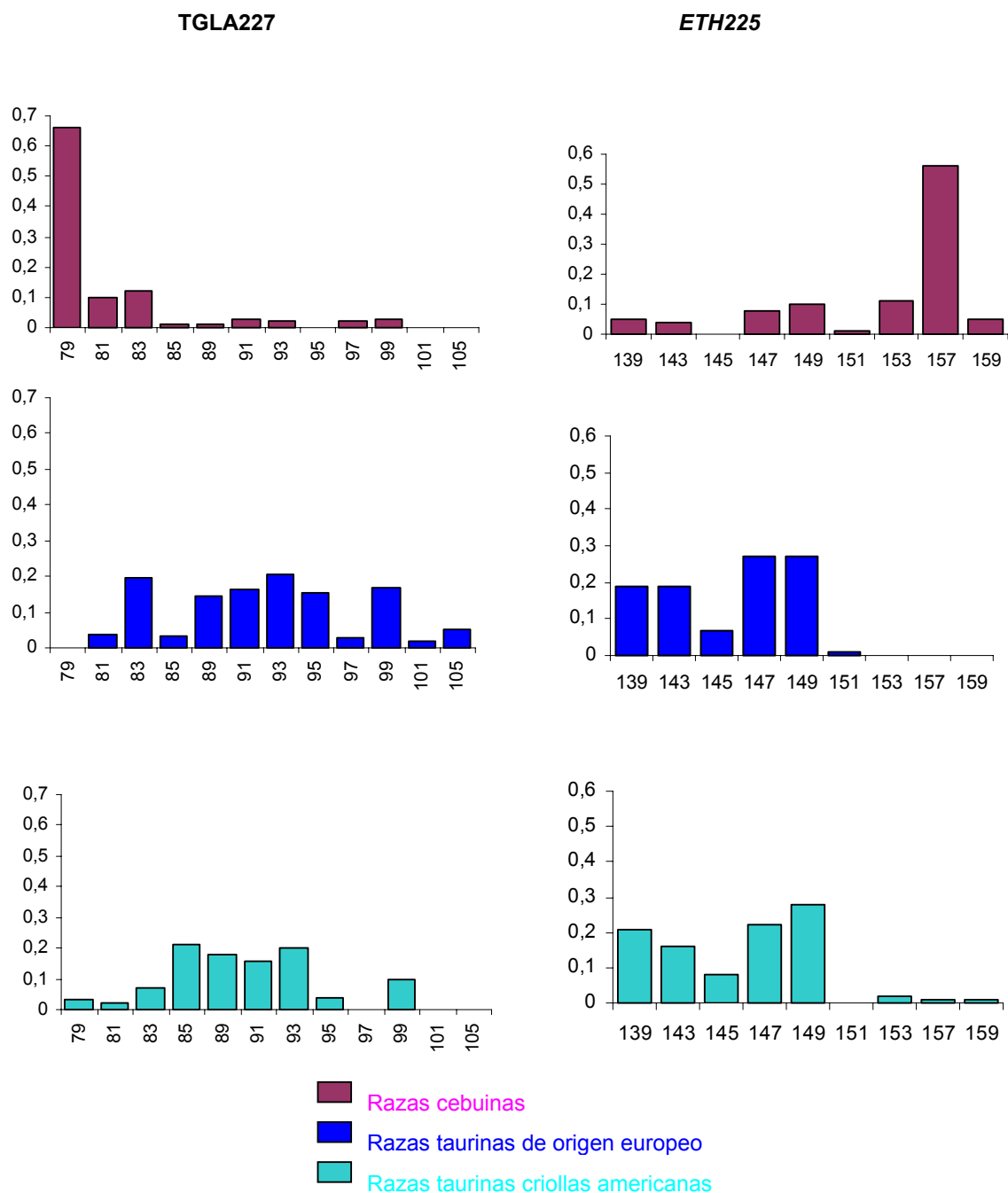


Figura 18. Distribución de las frecuencias génicas promedio estimadas para el locus *TGLA227* y *ETH225* agrupando las razas bovinas según su origen en tres grupos: i) cebuinas: Brahman y Nelore; ii) taurinas de origen europeo: Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Jersey y Retinta; y iii) taurinas Criollas Americanas: Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana, Criolla Saavedreña y Criolla Yacumeña.

Usualmente, se han considerado dos modelos teóricos extremos de mutación para los microsatélites: el modelo de alelos infinitos –*infinite allele model*, IAM- (Kimura y Crow, 1964) y el modelo de mutaciones de a pasos –*stepwise mutation model*, SMM- (Kimura y Ohta, 1978). El SMM describe las mutaciones como un proceso de ganancia o pérdida de sólo una unidad de repetición, donde los alelos de una población pueden mutar hacia estados adyacentes a las variantes presentes. En contraste, bajo el IAM, las mutaciones involucran cambios en cualquier número de repeticiones en tandem y siempre originan alelos nuevos, que no están presentes en la población. Numerosos estudios han concluido que el SMM se ajusta mejor a los datos poblacionales (Shriver *et al.*, 1993; Valdés *et al.*, 1993), aunque se han reportado frecuentemente mutaciones en más de una repetición (Jeffreys *et al.*, 1995, Valdes *et al.*, 1993).

Si se tiene en cuenta al SMM, la distribución observada en los microsatélites *ETH225* y *TGLA227* en las razas cebuinas, estaría acorde con el elevado tiempo estimado de separación de este grupo con respecto a las otras razas. Di Rienzo y colaboradores (1994) introducen el modelo de dos fases –*two phase model*, TPM-, donde las mutaciones frecuentemente implican cambios en una repetición pero en menor medida pueden provocar cambios en varias unidades. Una explicación alternativa del espectro de frecuencias génicas observadas en los loci *ETH225* y *TGLA227* se basaría en dicho modelo, considerando que los alelos presentes en los extremos de la distribución se habrían originado por mutaciones que comprenden varias repeticiones. Esta argumentación prescinde de un tiempo de separación elevado entre los grupos cebuino y taurino, necesario para acumular mutaciones de una sólo repetición.

Por último, se efectuó un tercer análisis de la varianza que incluyó solamente las razas taurinas agrupadas según su origen europeo o americano (razas criollas). El porcentaje de variación entre las razas criollas y las europeas alcanzó solamente el 1% *versus* un 6% entre las poblaciones dentro de cada grupo. Estos resultados indican que, al contrario de lo sucedido entre las razas cebuinas y taurinas, las razas criollas americanas no se diferencian tan claramente de las europeas. Esto podría ser explicado como consecuencia del tiempo reducido de separación de ambos grupos o de una introgresión de genes europeos en las razas criollas posterior a su origen.

5.3.3. Árboles filogenéticos y análisis multivariado

Con el fin de determinar las relaciones genéticas entre poblaciones o razas, dos métodos son comúnmente utilizados en la literatura: la reconstrucción filogenética y el análisis multivariado. Generalmente, la metodología más utilizada en el análisis de los datos consiste en el cálculo de distancias genéticas y la construcción de árboles. Alternativamente,

la representación de las relaciones genéticas entre las poblaciones puede obtenerse utilizando métodos multivariados. Estas técnicas condensan la información de varios alelos y loci en unas pocas variables sintéticas. Existe una cierta conexión entre los árboles filogenéticos y los métodos multivariados. Los primeros nodos de un árbol generalmente representan las primeras dimensiones de este último análisis.

Con el objetivo de evaluar las relaciones filogenéticas entre las razas bovinas estudiadas, se calcularon tres medidas de distancias genéticas: D_A (Nei *et al.*, 1983), D_C (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) y D_{SW} (Shriver *et al.*, 1995). A partir de cada una de las matrices de distancia genética se construyeron dos fenogramas empleando los métodos de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y NJ (Saitou y Nei, 1987). La topología de los árboles varió considerablemente entre los fenogramas contruidos a partir de las distancias clásicas D_A y D_C *versus* la D_{SW} , y entre los árboles generados por el método de agrupación UPGMA *versus* el de NJ. En los árboles contruidos con el método UPGMA a partir de las distancias D_A y D_C se observaron dos *cluster* principales que incluían las razas de origen índico y taurino, respectivamente. Dicha agrupación se observó en todos los árboles realizados, presentando siempre valores de *bootstrap* cercanos al 100%. Como se mencionó anteriormente, esta clara divergencia entre estos grupos principales de bovinos se ha obtenido en estudios previos basados en polimorfismos de proteínas, grupos sanguíneos, RFLPs y microsatélites (Brend, 1972; Naik, 1978; Manwel y Baker, 1980; MacHugh *et al.*, 1997; Hanote *et al.*, 2002).

En los árboles contruidos con el método de UPGMA a partir de las distancias D_A y D_C , el grupo taurino se subdividió a su vez en dos *clusters* que incluyeron a las razas de origen europeo y a las razas iberoamericanas, respectivamente. Estos resultados se corresponden con los datos históricos que establecen que las razas criollas americanas se habrían originado a partir de los animales traídos por los europeos durante los primeros años de la conquista hace unos 500 años. Takesaki y Nei (1996) han recomendado la utilización de las distancias genéticas D_C y D_A para la construcción de árboles filogenéticos a partir de frecuencias génicas en poblaciones relacionadas, donde la deriva genética es la principal determinante de la diferenciación evolutiva. A su vez, de acuerdo a Nei (1987) el método UPGMA generalmente produce una topología razonable de los árboles cuando se comparan individuos con tiempos generacionales y fisiología similar, como las poblaciones de una misma especie. La estructura interna de los nodos correspondientes a las razas europeas y criollas americanas no es fuertemente apoyada por los valores de *bootstrap*, esto refleja probablemente un origen simultáneo de estas razas y/o una mezcla genética entre ellas. Estos bajos niveles de *bootstrap* coinciden con los reportados en otros estudios de relaciones filogenéticas entre razas relacionadas de bovinos (McHugh *et al.*, 1997; Cañon *et al.*, 2001).

En los fenogramas construidos con el algoritmo NJ, desaparece la distinción entre razas americanas y europeas. Aunque no surge una topología evidente en la comparación de estos árboles, las razas cebuinas se encontraron muy alejadas del resto de las razas taurinas, lo que refleja el origen independiente de este grupo. Por el contrario las razas taurinas criollas y europeas se entremezclaron por todo el árbol y tendieron a separarse escasamente de la raíz del dendograma. Esta estructura denota la dicotomía existente en el tiempo relativo de evolución independiente de las razas incluidas en el presente trabajo (más de 200.000 años para las cebuinas, 500 años para las criollas Americanas y menos de 200 años para las europeas). La distancia D_{SW} , que se basa en el SMM y por lo tanto tiene en cuenta el tamaño de los alelos, reforzó la separación de Nelore y Brahman de las demás poblaciones. Como se discutió previamente, las mutaciones tuvieron un papel importante en la divergencia genética observada entre los dos grupos principales de bovinos. Sin embargo, entre las razas taurinas la mutación no ha tenido el tiempo suficiente para ejercer su fuerza diversificadora.

Una interesante observación de los árboles construidos con el método de NJ, es la agrupación de las razas Criolla Yacumeña y Retinta con las cebuinas. Este comportamiento podría deberse a un cierto grado de introgresión de genes cebuinos en estas razas taurinas. Las razas bovinas españolas se clasifican en tres grupos diferentes: *Red convex*, *Brown concave* y *Black orthoide*. Dichos bovinos han arribado a la península Ibérica siguiendo las principales migraciones humanas. Una de las rutas de inmigración de bovinos provino del medio oriente y atravesó Europa. Estas poblaciones están hoy representadas por las razas del grupo *Brown concave*. Otra ruta procedió probablemente de África, a través del estrecho de Gibraltar y estaría representada en la actualidad por los bovinos del grupo *Red convex* (Felix, 1995). A este último grupo pertenecen la raza Alentejana de Portugal y la raza andaluza Retinta (Felix, 1995; Cañon *et al.*, 2001). El tercer grupo, el *Black orthoide* (también denominado ibérico), es considerado como un ejemplo de los antiguos bovinos salvajes, que existieron en la península Ibérica antes de la llegada de las otras migraciones (Sanchez-Belda, 1984). Según otra hipótesis, el grupo Ibérico sería descendiente del Lonhorn Hamítico, introducido por los berberiscos de África del Norte, quienes invadieron la península Ibérica en tiempos prehistóricos (Felix, 1995). MacHugh y colaboradores (1997) han demostrado una introgresión apreciable de genes índicos en las poblaciones de taurus africanas. La pertenencia de la raza Retinta al grupo *Red convex* originado de África, podría explicar su agrupación con las razas cebuinas en los árboles filogenéticos. Con respecto, a la raza Criolla Yacumeña, una explicación plausible sobre su agrupación con las cebuinas se basaría en la mezcla genética reciente con razas índicas.

La topología variable de los árboles filogenéticos encontrada en las razas europeas y criollas americanas según las distancias y los algoritmos de construcción utilizados, así

como los bajos niveles de *bootstrap* observados en la mayoría de los nodos, pueden ser producidos por la mezcla genética de algunas razas. Este fenómeno contradice los principios generales de los métodos de reconstrucción filogenética (Felsenstein, 1982). Cabe mencionar que la introgresión es un hecho frecuente en la dinámica poblacional de las razas bovinas (Grosclaude *et al.*, 1990; MacHugh *et al.*, 1997, Cymbrón *et al.*, 1999, Giovambattista *et al.*, 2000; Mirol *et al.*, 2003). Otra explicación de los resultados obtenidos se apoya en el número de marcadores genéticos utilizados en este trabajo. Sobre la base de estudios teóricos, Takezaki y Nei (1996) han concluido que uno de los factores importantes que influyen en la posición correcta de las poblaciones en un árbol filogenético es el número de loci utilizados. Sin embargo, numerosos estudios realizados con razas históricamente relacionadas en diferentes especies de mamíferos han obtenido bajos valores de *bootstrap* a pesar de haber incluido una mayor cantidad de marcadores genéticos (Cavalli-Sforza y Piazza 1993; Bowcock *et al.*, 1994; MacHugh *et al.*, 1997; Wimmers *et al.*, 2000; Koskinen y Bredbacka, 2000; Moazami-Goudarzi y Laloe, 2002). Pese a que existe una diferenciación genética significativa entre las razas, la estructura no robusta de los árboles puede ser explicada por discrepancias en la topología manifestada por cada uno de los locus analizados. Laval y colaboradores (2000), en un trabajo de caracterización de cerdos europeos con 25 microsatélites, sugirieron la presencia de una divergencia de las razas en forma de estrella (varias poblaciones se originan al mismo tiempo). De acuerdo con este esquema, las distancias genéticas esperadas entre las razas serían iguales y cualquier diferencia observada entre ellas sería producto de la deriva genética. A su vez, bajo este modo de divergencia, se espera una incongruencia en la estructura determinada por cada locus, así como también una independencia del número de marcadores genéticos utilizados.

Una alternativa a la utilización de los árboles filogenéticos para el estudio de las relaciones genéticas entre las poblaciones o especies, es la aplicación de las técnicas multivariantes. Estas metodologías no asumen la ausencia de mezcla genética entre las poblaciones estudiadas y permite la incorporación de diferentes tipos de marcadores genéticos (polimorfismos bioquímicos, grupos sanguíneos, microsatélites, SNPs, etc.) y morfológicos. Con el fin de resumir las relaciones entre las razas se realizó el análisis de componentes principales (ACP). Para este análisis se utilizaron las frecuencias génicas transformadas según Cavalli-Sforza (1994) correspondientes a los 98 alelos encontrados en las todas las razas con la excepción de Jersey. La inclusión de esta raza en el ACP generó distorsiones en la representación espacial de los CP, probablemente debido al escaso número de animales tipificados. En este caso, el primer CP fue explicado por la separación de la raza Jersey de todas las demás. Lo mismo sucedió en los árboles filogenéticos que incluyeron dicha raza (resultados no mostrados). Sin embargo, numerosos estudios filogenéticos que han incorporado a la raza Jersey, han obtenido resultados similares (Baker

y Manwel, 1980; Medjugorac *et al.*, 1994; Blott *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000). Kantanen y colaboradores (2000), en un estudio de 20 razas europeas con 19 polimorfismos bioquímicos y de grupos sanguíneos y con 10 microsatélites han concluido que la raza Jersey no poseía ninguna relación filogenética cercana con ninguna de las 19 razas restantes. Debido a las distorsiones ocasionadas en los árboles filogenéticos por la raza Jersey y al número escaso de animales tipificados (N = 10), se decidió excluir a dicha raza de los análisis filogenéticos y multivariados.

Los resultados obtenidos por ACP se corresponden con los datos históricos sobre el origen de los tres principales grupos de razas incluidas en este estudio. Las tres primeras dimensiones del ACP explicaron un total de 67% de la varianza. El primer CP (40%) dividió las razas en dos grupos claramente diferenciados que se correspondieron con su origen taurino e índico. El segundo CP (15%) subdividió las razas taurinas en un *cluster* europeo y en otro iberoamericano, aunque esta división no fue tan marcada como en el primer CP. El tercer CP (12%), no aportó ninguna información relevante y solo diferenció la raza Hereford de las demás. Por lo tanto, la representación gráfica de los dos primeros CP permitió discriminar los tres grupos principales de razas según su origen histórico.

El primer CP, separó las razas cebuinas y taurinas revelando un compromiso en la estructura de las poblaciones estudiadas. Además, se corresponde con la primera división y con los altos valores de *bootstrap* hallados en los árboles filogenéticos. Varios alelos contribuyeron en gran medida a la determinación de dicho componente, los cuales se presentaron con frecuencias génicas considerables en las razas Nelore y Brahman; por el contrario, en las demás razas taurinas estuvieron ausentes o en bajas frecuencias. Estos alelos podrían utilizarse como diagnósticos para medir la introgresión de genes índicos en las razas criollas americanas. Cuando se observa la distribución de las razas a lo largo del primer CP, la raza Retinta y las criollas se ubican en una relación intermedia entre las cebuinas por un lado y las taurinas europeas por el otro, aunque a una distancia más cercana a estas últimas. Esta posición intermedia apoya la hipótesis sobre la introgresión de genes índicos reportada para estas razas y que será discutida en detalle posteriormente. A su vez, la raza Brahman se halló en una posición más cercana a las taurinas. Estos resultados se condicen con la formación y características de manejo de dicha raza originaria de los Estados Unidos. La sociedad de criadores de la raza Brahman posee un libro de registro abierto que permite la mezcla con ganado taurino; aceptándose la inscripción de animales luego de cuatro generaciones de cruza absorbentes con ganado índico.

El segundo CP discriminó a las razas taurinas europeas e hispanoamericanas. Cuando se compararon las frecuencias génicas de los alelos que más aportaron al CP2, no se observó una clara divergencia en las frecuencias génicas entre los dos conjuntos de razas. La raza Retinta se agrupó con las razas criollas. La separación de las razas a lo largo

de este eje, se corresponde con la segunda gran división de razas observada en los árboles contruidos con el método de UPGMA utilizando las distancias D_A y D_C . La raza Criolla Argentina y la raza Criolla Chaqueña Boliviana se ubicaron muy cercanas a lo largo de los dos primeros ejes del ACP. Cabe mencionar que estas razas fueron las únicas que en el test de diferenciación genética no presentaron diferencias significativas entre sus frecuencias génicas.

En resumen, la disposición de las razas en los dos primeros ejes del análisis de componentes principales se correspondió con los datos históricos que explican el origen y diferenciación de los principales grupos de razas bovinas estudiadas.

5.4 Introgresión de genes índicos en las razas criollas sudamericanas

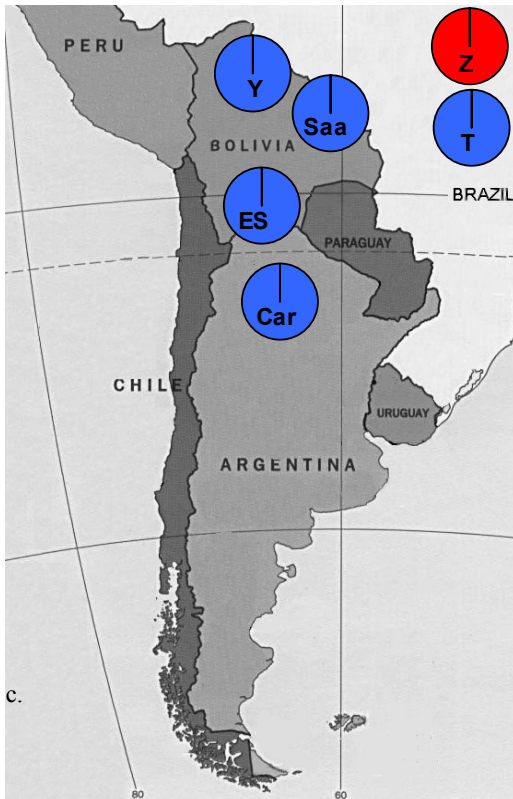
En el curso de la evolución, las poblaciones que han permanecido aisladas entre sí por largos períodos de tiempo a causa de factores geográficos, ecológicos o culturales ocasionalmente pueden entrar en contacto. Este hecho genera poblaciones híbridas con ciertas características genéticas, como por ejemplo la presencia de frecuencias alélicas intermedias a las poblaciones parentales (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1995). Se han propuesto varios estadísticos con el fin de estimar la contribución relativa de las poblaciones parentales a la población híbrida (Chakraborty, 1986), la mayoría de los cuales se basan en la utilización de las frecuencias génicas.

La estimación del porcentaje de introgresión de genes índicos o taurinos en las razas criollas se realizó mediante la aplicación de dos metodologías. La primera se basó en calcular el porcentaje de introgresión de 5 cinco alelos privativos cebuinos (*ETH225.153*, *ETH225.157*, *ETH225.159*, *TGLA227.79* y *TGLA122.136*). Las cuatro razas criollas presentaron evidencias de mezcla, aunque con frecuencias inferiores al 10%. La raza argentina evidenció los valores inferiores de introgresión génica promedio para los tres loci. Por el contrario, las razas criollas bolivianas alcanzaron valores superiores de mezcla génica. El segundo procedimiento utilizado para evaluar la introgresión índica se basó en las frecuencias génicas y en el tamaño de todos los alelos encontrados en los nueve microsatélites autosómicos analizados utilizando el coeficiente de mezcla m_Y (Bertorelle y Excoffier, 1998). Los valores hallados con este índice fueron superiores a los calculados por el método de alelos privativos, aunque no superaron el 11%. De la misma forma que lo obtenido con la metodología basada en alelos privativos, la raza Criolla Argentina presentó los valores inferiores de mezcla ($m_Y = 2,6\%$), mientras que las razas bolivianas alcanzaron valores cercanos al 10% (figura 19a).

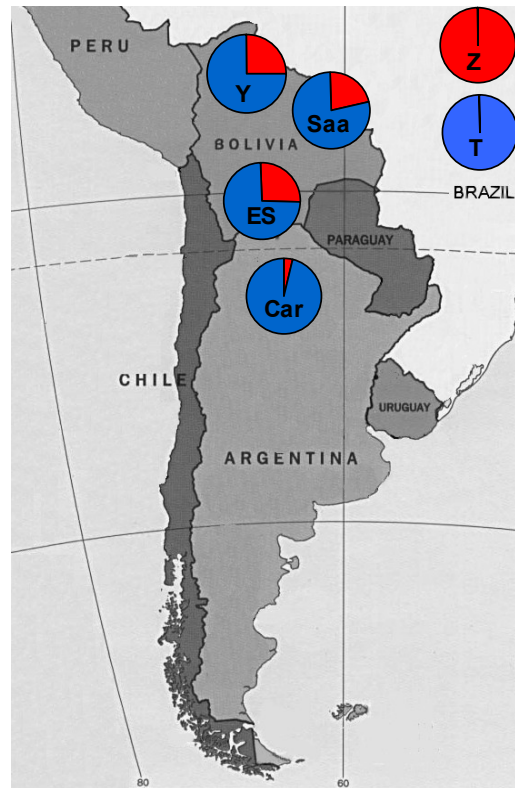
A nivel citogenético, los dos tipos mayores de bovinos (cebuinos y taurinos) pueden diferenciarse mediante el análisis de la morfología del cromosoma Y (Kieffer y Cartwrigh, 1968). Mientras que los taurinos poseen un cromosoma Y de tipo submetacéntrico, las razas índicas presentan un cromosoma de tipo acrocéntrico. Estas diferencias morfológicas tienen su correspondencia a nivel molecular. En este sentido, se ha reportado la presencia de alelos diagnósticos en marcadores de tipo microsatélites (Hanotte *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000) y en loci estructurales como el *SRY* y el *ZFY* (Kikkawa *et al.*, 2003; Clawson *et al.*, 2004). En el presente trabajo el porcentaje de introgresión de genes índicos por vía paterna, se calculó a partir de las frecuencias génicas de dos microsatélites de la región no recombinante del cromosoma Y (*INRA124* e *INRA189*). Dichos STRs poseen dos alelos de 124 y 88 pb, respectivamente, que han sido reportados como alelos privativos del grupo índico (Hanotte *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000). La totalidad de los animales que presentaron el alelo 124 del locus *INRA124* también evidenciaron el alelo de 88 pb en el *INRA189*. El porcentaje de introgresión estimado a partir de los marcadores del cromosoma Y fue aproximadamente de dos órdenes de magnitud superior al calculado mediante los marcadores autosómicos. En la raza Criolla Argentina se observó un porcentaje de introgresión cebuina del 4%, mientras que las criollas bolivianas presentaron valores de mezcla que variaron desde el 22 al 26% (figura 19b).

Los trabajos pioneros sobre ADN mitocondrial bovino demostraron la existencia de dos principales haplogrupos, que representan los linajes taurino y cebuino (Loftus *et al.*, 1994a; Bradlet *et al.*, 1996). Posteriormente, varios trabajos que analizaron la región de control del ADN mitocondrial en razas taurinas de Europa, África y Cercano Oriente demostraron la presencia de cuatro haplogrupos principales. Mientras que tres de ellos fueron encontrados en Europa y en el Cercano Oriente, el restante correspondió solamente a los animales de África, con excepción de algunos individuos del sur de Portugal que tendrían un origen africano. Estos datos junto a la evidencia de una filogenia en forma de estrella, avalan la hipótesis de una domesticación independiente en África (Bradley *et al.*, 1996; Troy *et al.*, 2001). Recientemente, varios autores han estudiado la región de control del ADN mitocondrial en razas criollas sudamericanas, detectando sólo la presencia de secuencias características de *Bos taurus* europeos y africanos (Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Mirol *et al.*, 2003; Caravajal-Carmona *et al.*, 2003). En la figura 19a se representa los porcentajes de haplotipos taurinos (100%) y cebuinos (0%) en las razas criollas de Argentina y Bolivia.

a.



b.



c.

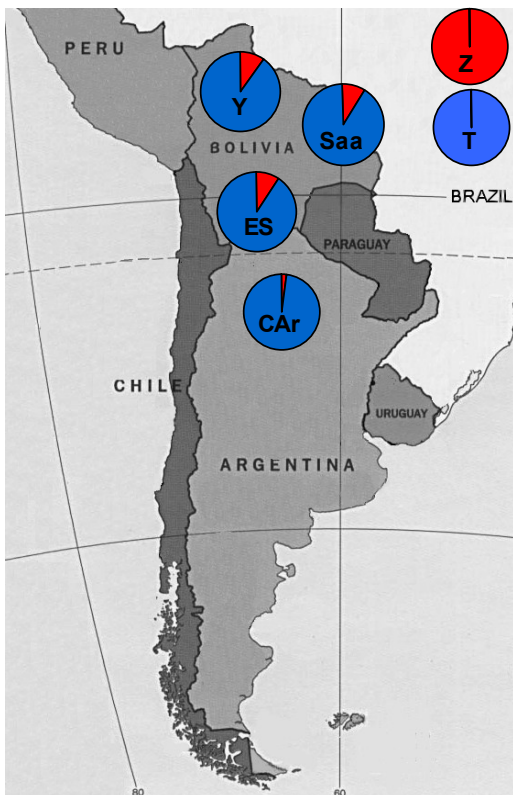


Figura 19. Introgresión de genes índicos en las razas Criolla Argentina (CAr), Criolla Chaqueña Boliviana (ES), Criolla Saavedreña (Saa) y Criolla Yacumeña (Y). Se representa el porcentaje de mezcla para tres tipos de marcadores: a) ADN mitocondrial (tomado de Miretti *et al.*, 2002; Mirol *et al.*, 2003); b) Microsatélites del cromosoma Y; c) Microsatélites autosómicos. El porcentaje de mezcla para los haplotipos mitocondriales y del cromosoma Y se calculó por conteo directo y para los loci autosómicos mediante el índice mY. Z y T corresponden a genes taurinos y cebuinos, respectivamente.

Si se ordenan los marcadores mitocondriales, autosómicos y holándricos según el porcentaje de introgresión presentada, en un extremo se encuentra el ADN mitocondrial con un 0% de genes índicos y en el otro los marcadores del cromosoma Y con aproximadamente un 20%. Por otra parte, los marcadores autosómicos evidenciaron valores intermedios (alrededor del 10%) con respecto a los loci de herencia uniparental. Durante la segunda mitad del siglo XX, las razas cebuinas son introducidas masivamente en Bolivia y en el norte de Argentina desde Brasil con el fin de mejorar la ganadería en zonas tropicales y subtropicales. Esta introducción produjo una drástica disminución en el tamaño y grado de pureza de las poblaciones criollas, causada principalmente por cruzamientos absorbentes. En coincidencia con las evidencias históricas, el patrón de mezcla observado en los tres tipos de marcadores revelaría que la introgresión en los criollos sudamericanos ha ocurrido por vía paterna principalmente mediante la introducción de machos cebuinos a Bolivia y Argentina desde Brasil. Además, el gradiente noreste-suroeste de introgresión de genes índicos reportado para las razas criollas sudamericana revela que los mayores niveles de mezcla se encuentran en las zonas tropicales de Brasil y los menores en las regiones templadas de Argentina y Uruguay, presentando Bolivia valores intermedios (Tabasco *et al.*, 1985; Postiglioni *et al.*, 1998; Giovambattista *et al.*, 2001). Estas evidencias también sugieren un papel importante del clima y posiblemente de la altitud, que habrían servido como barrera a la expansión de las razas cebuinas, y junto con los factores históricos habrían determinado el patrón de mezcla observado en las razas criollas estudiadas. Cabe destacar que, similares patrones de introgresión por vía paterna se han observado en razas bovinas del continente africano y del sudeste asiático (MacHugh *et al.*, 1996; Kikkawa *et al.*, 2003; Clawson *et al.*, 2004).

Algunos autores, han sugerido que el acervo genético de los criollos americanos presenta componentes de origen africano, los que habrían provenido desde la península ibérica o de las costas africanas (Felius, 1995; Rouse, 1973). Dos de los microsatélites estudiados en este trabajo, uno autosómico y otro correspondiente al cromosoma Y, presentan alelos que se han reportado como privativos o diagnósticos de razas taurinas africanas. MacHugh (1996) describió al alelo de 122 pb del locus *BM2113* como un alelo diagnóstico de las razas taurinas africanas. Este alelo se halló presente con una frecuencia de 0,38 en las razas taurinas de África, 0,02 en las cebuinas y estuvo ausente en las taurinas europeas. Sin embargo, en este trabajo no se evidenció la presencia de dicho alelo en ninguno de los animales criollos analizados y sólo la raza Retinta presentó dicha variante con una frecuencia de 0,05. La ausencia del alelo 122 se ha reportado en otras seis razas criollas de México (Russell *et al.*, 2000).

El otro marcador descripto como privativo de razas africanas fue el microsatélite holándrico *INRA189*. Edwards y colaboradores (2000) describieron la presencia en la raza

N'Dama (taurina africana) de dos alelos de 90 pb y 104 pb con una frecuencia de 0,83 y 0,17, respectivamente. Estas variantes no se detectaron en las otras razas también estudiadas por estos autores (Hereford, Nelore y Ongole). El análisis del locus *INRA189*, en el presente trabajo evidenció la presencia del alelo de 90 pb solamente en la raza criolla Saavedreña, en una proporción del 17%.

En resumen, los marcadores de tipo autosómico y holándrico estudiados en este trabajo no evidenciaron en las razas Criolla Argentina, Criolla Chaqueña Boliviana y Criolla Yacumeña la presencia de alelos característicos de bovinos taurinos africanos, siendo la excepción la raza Saavedreña que presentó alelos africanos del cromosoma Y. Por el contrario, como se mencionó anteriormente, varios trabajos simultáneos que estudiaron la región de control del ADN mitocondrial en diversas razas bovinas criollas sudamericanas (argentinas, bolivianas, brasileras, colombianas e islas caribeñas) demostraron la presencia, con frecuencias variables, de haplotipos correspondientes al haplogrupo taurino africano (Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Mirol *et al.*, 2003; Caravajal-Carmona *et al.*, 2003). Las considerables variaciones observadas en la incidencia de los alelos diagnósticos africanos en las razas criollas americanas podrían ser consecuencia de factores históricos, demográficos y de manejo reproductivo, tales como: i) la presencia de varias rutas migratorias procedentes de diferentes orígenes (Portugal, España, y posiblemente de las Islas Canarias, Cabo Verde, Madeiras y diferentes colonias africanas); ii) sucesivos cuellos de botellas a lo largo de las rutas de expansión de los criollos en Sudamérica; y iii) el uso de cruzamientos absorbentes mediante la utilización de machos.

Sobre la base del estudio de los loci autosómicos, holándricos y mitocondriales se puede resumir que el acervo genético de los bovinos criollos se habría formado por genes de origen taurino europeo y en menor medida africanos. Además, el germoplasma actual de algunas poblaciones tendría hasta un 10% de genes de origen índico.

5.5 Asignación de los individuos a sus razas de origen

En los últimos tiempos se ha generalizado el uso de marcadores genéticos con elevado grado de polimorfismo, como los microsatélites en los estudios de diversidad y estructura genética de las poblaciones. Asociado a estas aplicaciones ha surgido un creciente interés sobre la posibilidad de utilizar estos marcadores para asignar individuos a determinadas poblaciones o razas. La metodología de asignación se ha utilizado para diferentes propósitos, como por ejemplo la demarcación de poblaciones (Paetkau *et al.*, 1995; MacHugh *et al.*, 1998; Primer *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 1999; Bjornstad y Roed., 2002), estudios poblacionales en especies migratorias (Haig *et al.*, 1997), determinación del

origen de poblaciones contemporáneas (Nielsen *et al.*, 1997) y resolución de casos forenses (Primmer *et al.*, 2000). Además, estas técnicas son potencialmente aplicables a la conservación y manejo de recursos genéticos, así como también a la trazabilidad de alimentos procedentes de especies domesticas o silvestres.

En el presente trabajo se utilizaron dos procedimientos de asignación de individuos a sus respectivas razas, uno basado en las distancias genéticas D_{AS} (*allele shared distance*, Bowcock *et al.*, 1994) y D_{SWASM} (*stepwise allele shared distance measure*, MacHugh, 1996) y el algoritmo NJ y el otro basado en las frecuencias génicas. Se incluyeron en este análisis solamente las razas criadas en la Argentina. A pesar que la distancia D_{AS} no tiene en cuenta la información contenida en el número de repeticiones de los microsatélites, esta medida mostró una mayor eficiencia para la agrupación de los individuos a sus respectivas razas en comparación con la distancia D_{SWASM} . Esta última, presentó a las razas cebuinas formando un cluster con las ramas de mayor tamaño, comparadas con las presentadas por las razas taurinas. Esto se debió a diferencias en el número de repeticiones de los alelos hallados en los animales de origen índico. Bajo el modelo de mutaciones SMM, estas diferencias se interpretan como un mayor tiempo de separación de los individuos pertenecientes a este grupo de razas y concuerda con la topología de los árboles de poblaciones y la distancia que presentaron las razas en el análisis de componentes principales.

Con respecto a los individuos de origen taurino, en ambos dendogramas se observaron diferentes niveles de exactitud en la agrupación de los animales a sus respectivas razas. Las razas europeas Abeerden Angus, Jersey y Hereford presentaron entre 70 y 80% de los individuos correctamente agrupados. Los animales de las razas Criolla Argentina y Holando se encontraron dispersos por el resto del árbol junto con los individuos no agrupados de las demás razas. El dendograma construido a partir de la distancia D_{AS} presentó una topología levemente superior a la obtenida con la distancia D_{SWASM} . Esto se debería a un papel preponderante de la deriva genética con respecto a la mutación en la diferenciación de las razas europeas e índicas.

El segundo procedimiento de asignación de los individuos a sus respectivas razas utilizado se basó en las frecuencias génicas. De la misma manera que en la construcción de los árboles filogenéticos de individuos, se incluyeron en este análisis solamente las siete razas criadas en la Argentina. El nivel de asignaciones correctas de los individuos a sus respectivas razas se incrementó dramáticamente con la adición de los primeros marcadores. Solamente con 4 microsatélites se obtuvo un porcentaje promedio de asignación correcta superior al 80%. El posterior incremento en el número de loci produjo un aumento progresivamente más lento en la tasa de determinaciones correctas. Utilizando los 9

marcadores este porcentaje varió desde un 91% en la raza Holando hasta un 100% en Jersey, obteniéndose un valor promedio de 96% para el total de las razas

Al igual que lo descrito para los árboles de individuos, el porcentaje de asignación correcta fue diferente en las distintas razas estudiadas. Las razas cebuinas Nelore y Brahman presentaron un porcentaje de asignación del 95%, aunque la totalidad de los individuos mal asignados lo hicieron en la otra raza del mismo origen. De la misma manera, las poblaciones de origen taurino, distribuyeron el error entre las demás razas del mismo origen. La distribución del error estructurada en los dos principales grupos de bovinos (cebuinos y taurinos) coincide con la gran diferenciación genética que existe entre ellos y que ha sido discutida anteriormente. Cabe mencionar que la raza Jersey presentó un 100% de individuos bien asignados cuando se analizaron 6 o más marcadores. El promedio mínimo de asignación correcta de los individuos simulados de la raza Jersey fue del 86% con sólo un marcador. Esta precisión es consecuencia de la gran divergencia genética que presenta Jersey con el resto de las razas europeas (Baker y Manwel, 1980; Medjugorac *et al.*, 1994; Blott *et al.*, 1998; Kantanen *et al.*, 2000).

La alta eficiencia en los niveles de asignación de los individuos a sus razas obtenida en este trabajo con los nueve microsatélites estudiados, concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios (Buchanan *et al.*, 1994; MacHugh *et al.*, 1998; Díez-Tascon *et al.*, 2000; Cañón *et al.*, 2000, 2001; Maudet *et al.*, 2002; Moazami-Goudarzi y Laloe, 2002). En contraste con los elevados valores de asignación correcta, estos trabajos han obtenido una pobre estructuración de las poblaciones, manifestada en los bajos niveles de *bootstrap* encontrados en los árboles filogenéticos. La estructura poco robusta de los dendogramas no es necesariamente una desventaja para los procedimientos de asignación de individuos, ya que esta metodología se beneficia con la independencia de los marcadores genéticos (Moazami-Goudarzi y Laloe, 2002). La falta de correlación entre los loci con respecto a la topología de un árbol filogenético, permite diferenciar las poblaciones con menos marcadores. De esta manera, cada uno de los locus o unos pocos de ellos podrían diferenciar una población distinta, debido a la presencia de distintivas frecuencias génicas.

Bjornstad y Roed (2002) evaluaron, utilizando los datos de 26 microsatélites en ocho razas de caballos, los factores que podrían afectar la precisión en la asignación correcta de individuos a sus razas de origen. Estos autores reportaron una correlación positiva entre los niveles de asignación correcta y el número de alelos, y en menor medida con la diferenciación poblacional medida a través del índice F_{ST} . Por el contrario, no encontraron una asociación significativa con la heterocigosidad. Por otra parte, Blott y colaboradores (1999) realizaron el mismo análisis con 20 microsatélites en siete razas bovinas europeas, observando una asociación significativa entre la asignación correcta respecto al número de alelos y la heterocigosidad. Sin embargo, no hallaron correlación con el índice F_{ST} .

En el presente estudio, los marcadores más eficientes en la determinación del origen racial de los individuos fueron los que presentaron un mayor número de alelos y en menor medida los que mostraron valores superiores de F_{ST} . Sin embargo, no se observó una asociación evidente entre la proporción de asignaciones correctas y los heterocigosidad esperada promedio. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Bjornstad y Roed (2002) para las tres variables analizadas. En cambio difieren de los resultados obtenidos por Blott y colaboradores (1999), en cuanto a la importancia de la heterocigosidad y el F_{ST} . La asociación entre el número de alelos y la exactitud en la determinación de la raza de origen de los individuos revela la importancia de seleccionar marcadores genéticos, como los microsatélites, que presenten un número elevado de alelos. Blott y colaboradores (1999) compararon la habilidad de los microsatélites frente a loci bialélicos para discriminar entre siete razas bovinas. Estos autores concluyeron que para alcanzar una tasa de error del 5% se requieren aproximadamente 10 STR. En contraste, se necesitaron 65 loci bialélicos para alcanzar dicho error.

Los marcadores más eficaces para la asignación racial de los individuos serían aquellos que presenten fijados diferentes alelos en las distintas razas (alelos privativos). La mayoría de las razas bovinas modernas, se han seleccionado y se distinguen por unas pocas diferencias fenotípicas como el color de capa, presencia de cuernos, etc. Actualmente, se han identificado algunos de los genes que controlan esos caracteres (Georges *et al.*, 1993; Grobet, *et al.*, 1997) y es posible que en un futuro no muy lejano se conozca la mayoría de ellos. Con esta información se podrían desarrollar unos pocos marcadores basados en el polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) que diferencien la mayoría de razas (Georges y Andersson, 1996). Las nuevas tecnologías de automatización desarrolladas para la tipificación genética de estos loci, permitirían un análisis más rápido y efectivo (Delahunty *et al.*, 1996). Sin embargo, los microsatélites han demostrado ser más eficientes que los marcadores bialélicos y actualmente serían los marcadores de elección para los test de asignación racial.

5.6 Estadísticos forenses

5.6.1 Poder de exclusión

La tipificación mediante marcadores genéticos es utilizada frecuentemente por las asociaciones de criadores de animales domésticos para complementar la información proveniente de los registros genealógicos o pedigríes de sus animales y con el fin de mantener la pureza y el tipo de la raza. Además, esta metodología se utiliza habitualmente para confirmar el material genético en los test de progenie y experimentos de selección. La

capacidad de cualquier sistema de marcadores para excluir una relación genética determinada está condicionada por los genotipos de los individuos tipificados, la frecuencia de los alelos presentes en la población y el número de loci analizados. Los marcadores más informativos son los que presentan herencia codominante. Desde el inicio de esta práctica hasta la actualidad, la identificación se ha llevado a cabo mediante polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos. Sin embargo, durante los últimos años, países como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y la Comunidad Europea, han implementado planes nacionales para el estudio de los genomas de las diferentes especies de animales domésticos. Sin embargo, en la Argentina la tipificación de los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos siguen siendo los estándares oficiales para la certificación de paternidad y la inscripción de productos. Por el contrario, la mayoría de las asociaciones de criadores de los países desarrollados ya han incorporado las pruebas de ADN con el fin de reemplazar las técnicas tradicionales por las basadas en microsatélites, utilizando de forma única la certificación mediante polimorfismos de ADN.

Una forma de cuantificar la eficacia de un conjunto particular de marcadores genéticos consiste en calcular la probabilidad de exclusión *a priori* (PE), la que se define como la probabilidad que un sistema genético específico brinde evidencias que conduzcan a la exclusión de un determinado suceso (Ejemplo, la paternidad discutida de un padre, la correspondencia entre la evidencia y la referencia en casos forenses, etc.). En el presente trabajo, se evaluó el poder de exclusión de nueve microsatélites (*BM2113*, *BM1824*, *SPS115*, *INRA023*, *ETH225*, *TGLA122*, *TGLA227*, *MG77* y *TGLA53*) en las razas bovinas de mayor importancia económica de la provincia de Buenos Aires (Aberdeen Angus, Holando, Hereford, Nelore y Brahman). Este índice se evaluó en el contexto de cuatro escenarios que se presentan frecuentemente en los casos de paternidad e identificación individual: (i) exclusión de un padre conociendo los genotipos de la cría y su madre; (ii) exclusión de un padre conociendo sólo el genotipo de la cría; (iii) exclusión de ambos progenitores y (iv) identificación individual. El poder de exclusión simple (inconcordancia de al menos un alelo) superó el valor de 0,99 en todas las razas estudiadas, excepto en las paternidades donde no se dispuso de la información genética de la madre. Para reducir el efecto de los errores de tipificación genética, de las mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y de la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995) se ha sugerido la aplicación del criterio de exclusión en más de un locus (Chakraborty *et al.*, 1974). Bajo este criterio, los valores de poder de exclusión obtenidos decrecieron notablemente y más aún en las paternidades donde no se contó con el genotipo materno. Así por ejemplo, en las razas Nelore y Brahman se obtuvieron los menores valores de exclusión (0,75 y 0,76, respectivamente). Por el contrario, los mayores valores de exclusión se alcanzaron en los casos de identificación individual, observándose un rango de 0,99999703 a 0,99999999997. De forma clásica con más de una o dos

exclusiones se considera la exclusión del caso como probada. Sin embargo en la actualidad se ha ido generalizando la utilización de un criterio no absoluto en la interpretación de las discordancias genéticas. De todas maneras los valores hallados de simple exclusión superiores a 0,996 en los casos de paternidad donde se contó con la información de la madre se podrían considerar como aceptables. Más aún, el poder de exclusión obtenido en los casos de identificación individual es razonablemente alto. Sin embargo, en los casos de paternidad en donde no se posee el genotipo materno los valores de exclusión resultaron insuficientes (la PEC_s varió de 0,94 en Brahman a 0,991 en Holando). En este tipo de casos para alcanzar un valor aceptable de exclusión se hace necesario aumentar el número de marcadores analizados.

En la figura 20, se representa la probabilidad combinada de simple exclusión correspondiente a un número variable de loci (de 1 a 30) con 2, 3, 4 y 5 alelos equifrecuentes. Se representan las dos situaciones más comunes de paternidad: i) presencia de los genotipos de la cría, el padre y la madre; ii) genotipo de la madre desconocido. Los valores de exclusión para el segundo caso de paternidad, considerando 9 marcadores (el número de marcadores analizados en el presente trabajo), varió desde 0,699 para marcadores con dos alelos hasta 0,992 para sistemas con cinco variantes con igual frecuencia. Los valores experimentales encontrados en este trabajo para los nueve marcadores estudiados se correspondieron con el estimado para 4 o 5 loci equifrecuentes. Según la comparación de los cálculos teóricos y experimentales, se necesitarían 12 marcadores con 4 alelos equifrecuentes para alcanzar un valor medianamente aceptable de exclusión de 0,99. Para obtener el mismo valor utilizando 2 alelos, se necesitarían un total de 32 marcadores con frecuencias iguales.

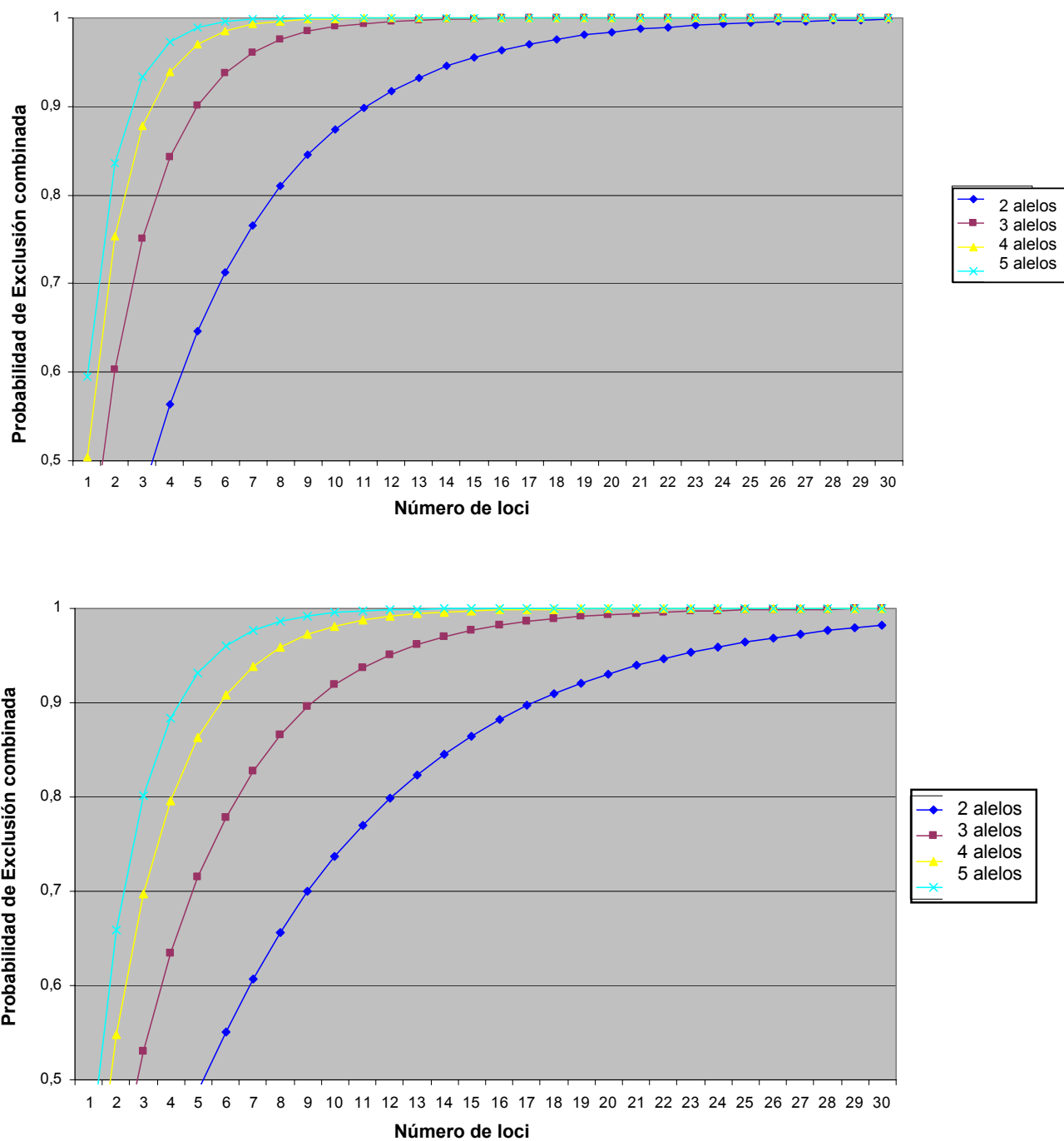


Figura 20. Probabilidad de exclusión combinada de un número variable de loci con 2, 3, 4 y 5 alelos con iguales frecuencias génicas. Se representan dos situaciones frecuentes de paternidad: a) presencia de los genotipos de la cría, el padre y la madre; b) genotipo de la madre desconocido.

Como se observa en la figura 20, el número de loci analizados para alcanzar un valor aceptable de exclusión en las situaciones frecuentes de paternidad es crítico. En el caso, donde se cuenta con el genotipo de la madre, la cría y el padre, se necesitarían 5 marcadores genéticos con 5 alelos para alcanzar un valor de 0,99 o 22 loci bialélicos para lograr la misma cifra. Si bien estos cálculos son teóricos, ya que implican la presencia de marcadores con alelos de igual frecuencia, es común encontrar microsatélites que posean variantes con frecuencias similares. Por otra parte, valores semejantes se pueden obtener con STRs que posean un mayor número de alelos como los estudiados en este trabajo (N_a promedio = 6,8) con frecuencias no tan equivalentes. Sin embargo, para marcadores con loci bialélicos como los SNPs, ésta situación sería mucho más difícil de lograr. En conclusión, los loci multialélicos como los microsatélites, serían los marcadores genéticos de elección para la resolución de paternidades discutidas.

5.6.2 Resumen de los casos analizados

Asignación de paternidades en situaciones de apareamiento múltiple

Clásicamente, en la inferencia de paternidades se excluyen todos los posibles padres candidatos de un descendiente particular utilizando la información genética disponible. Si el procedimiento genera solamente la exclusión de todos los padres alegados excepto uno, la paternidad se asigna a dicho individuo. Ésta es la metodología utilizada frecuentemente en la determinación de paternidades humanas y de animales domésticos (Chakraborty *et al.*, 1974; Jamieson *et al.*, 1997). Sin embargo, la aplicación de la regla de exclusión se torna insuficiente para resolver paternidades cuando se consideran poblaciones naturales o especies domésticas de manejo extensivo. Este tipo de práctica es habitual en los criadores de ganado bovino de la Argentina, donde es muy común la utilización de un sistema de monta colectiva. Esta forma de cría, se traduce en la aparición de casos de paternidad caracterizados por la presencia de varios machos candidatos y usualmente en la falta de información genética de la madre. En este contexto es frecuente que más de un padre putativo resulten no excluidos de la paternidad de una cría determinada (Meagher, 1986). Otro problema del método de exclusión es que considera la inconcordancia entre los genotipos de un padre putativo y la cría como evidencia conclusiva de exclusión de la paternidad. Sin embargo, en la práctica estas diferencias pueden originarse por errores de tipificación de los marcadores genéticos, por mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y por la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995). Para superar los problemas del método de exclusión en la asignación de paternidades se han desarrollado dos metodologías alternativas: i) asignación fraccionaria (Devlin *et al.*, 1988; Roeder *et al.*, 1989; Smouse *et*

al., 1994, Neff *et al.*, 2001); y ii) asignación categórica (Meagher, 1986; Marshall *et al.*, 1998; Slate *et al.*, 2000).

Con el fin de evaluar la utilidad de la batería de microsatélites utilizados y la metodología estadística se estudió un caso complejo de asignación de paternidades. El caso correspondió a una disputa judicial entre dos criadores de la raza Holando de la provincia de Buenos Aires por la apropiación indebida de cinco terneros. La metodología propuesta consistió en la determinación de la paternidad de 5 crías y 5 padres candidatos, sin la información del genotipo materno de ninguna de las crías. Para ello, se tipificaron en los 10 animales los 9 microsatélites analizados en esta tesis y el locus *BoLA-DRB3*. El método estadístico utilizado consistió en la determinación de la paternidad del padre más probable mediante el procedimiento de asignación categórica implementado en el programa Cervus® 2.0. La paternidad de cada padre putativo para cada cría, se evaluó mediante el cálculo del LOD score (logaritmo del índice L , probabilidad de paternidad de un determinado padre relativa a la probabilidad de paternidad de un padre arbitrario de la población) y el índice $+$ (logaritmo del cociente entre las razones de verosimilitud de los dos padres putativos más probables). Además, para evaluar el nivel de confianza del índice $+$ se simularon 10.000 inferencias de paternidad contemplando los siguientes parámetros: número y proporción de padres muestreados, proporción de loci tipificados y tasa de error (1%).

Los resultados obtenidos mostraron que solamente la cría C5 evidenció la exclusión en más de un loci para los cinco padres. Las crías C4 y C7 no pudieron ser excluidas del padre P10; mientras que la C8 no fue excluida del toro P9. Las tres crías fueron asignadas a un sólo padre con un 95% de significancia, presentado un LOD score que varió desde 2,53 a 3,55. Los machos P1 y P2 presentaron la exclusión en un sólo alelo con respecto a la cría C6. La inconcordancia en un sólo locus no se consideró como evidencia concluyente de la exclusión de estos machos putativos como padres de esta cría, pues como se mencionó anteriormente dichas diferencias pueden surgir de errores de tipificación, de la presencia de alelos nulos y de mutaciones. Sin embargo, aplicando el criterio de doble exclusión y el índice $+$ la paternidad fue asignada al macho P1. Los resultados obtenidos evidencian que el método de asignación categórica es un criterio probabilístico de gran utilidad para asignar una cría a un macho determinado en casos complejos de paternidad donde dos o más reproductores no han podido ser excluidos.

Identificación individual en casos de abigeato

La sustracción de ganado es un hecho frecuente en la República Argentina. Los animales robados son generalmente faenados en el lugar del hecho, dejando restos biológicos que se pueden emplear como material periciable. A su vez, cuando los

sospechosos son detenidos con la posible carne robada, ésta también se tipifica del mismo modo que las muestras anteriores. Los casos de abigeato se resuelven analizando las muestras obtenidas en ambos sitios y realizando el estudio comparativo mediante las tipificaciones del ADN. En el presente trabajo se analizaron un total de 108 muestras correspondientes a 35 casos de robo de ganado bovino que ocurrieron en la provincia de Buenos Aires. Debido al estado de descomposición de muchas de las muestras analizadas sólo se pudieron resolver el 71% de los casos. La gran mayoría de las muestras enviadas en alcohol pudieron ser tipificadas sin grandes inconvenientes por la técnica de PCR, independientemente del tipo de tejido u órgano considerado. Sin embargo, las muestras que llegaron en avanzado grado de descomposición y las fijadas en formol resultaron frecuentemente negativas para PCR pese a los sucesivos intentos de extracción de ADN. Estos resultados indicarían que la forma de conservación y remisión de las muestras son factores de suma importancia para la recuperación de ADN de calidad periciable.

Una vez realizada la tipificación de los marcadores genéticos, la metodología estadística empleada en la resolución de dichos casos se basó en comparar el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente (referencia) con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia). Para concluir que las muestras de referencia y evidencia no pertenecieron al mismo individuo se utilizó el principio de doble exclusión con el objeto de reducir el efecto de los errores de tipificación genética, de las mutaciones (Chakraborty *et al.*, 1974) y de la presencia de alelos nulos (Pemberton *et al.*, 1995). En el 44% de los 25 casos analizados positivamente se observó la exclusión genética en al menos 2 loci entre las muestras de referencia y las evidencias, concluyéndose que dichas muestras pertenecieron a diferentes animales.

En el resto de los casos analizados, al menos una muestra de referencia y otra perteneciente a la evidencia presentaron el mismo genotipo en todos los marcadores analizados. La coincidencia entre el perfil genético de las dos muestras, no puede interpretarse como una prueba absoluta de que ellas pertenezcan al mismo individuo. Esto se debe a que el perfil genético encontrado, en teoría, puede ser compartido por otro individuo tomado al azar de la población. Por ende, es necesario estimar cuál es la probabilidad que ese perfil genético se presente en la población general (índice L) y de esta manera cuantificar el peso de la evidencia genética. Si la muestra de referencia no pertenece al mismo individuo que la evidencia secuestrada al sospechoso de robo, sino que corresponde a otro individuo diferente de la población se asume que el individuo que aporta la evidencia no está relacionado genéticamente con el animal faenado (esta argumentación corresponde a la hipótesis de la defensa). En este caso el índice L puede ser estimado como el recíproco de las frecuencias genotípicas en la población.

En los casos de abigeato estudiados en este trabajo no se contó con la información referente a la raza de origen de la muestra secuestrada a los sospechosos de robo. En consecuencia, la población de los individuos que potencialmente pueden haber contribuido a la evidencia estuvo compuesta por los animales de las diferentes razas o subpoblaciones de animales que conviven en la provincia de Buenos Aires (en los casos forenses se consideró a las razas como subpoblaciones de la población general compuesta por los bovinos de una zona determinada). Usualmente, la raza o subpoblación a la cual pertenece la evidencia es irrelevante, porque se pretende calcular la probabilidad de concordancia genética de las muestras asumiendo que el perfil genético encontrado corresponde a otro individuo de la población. Una forma de resolver esta situación, es calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas de la población general, la que estaría formada por los individuos de las razas más importantes de cría de la provincia de Buenos Aires (Aberdeen Angus, Hereford, Holando, Nelore y Brahman). Los valores hallados para el índice L considerando dicha población general variaron de $1,2 \text{ E-}07$ a $4,1 \text{ E-}12$.

Sin embargo, para inferir las frecuencias genotípicas a partir de las génicas de una población se requiere que las frecuencias génicas de las subpoblaciones que la componen sean homogéneas. Esta suposición ha sido un tema de intensos debates en la comunidad de las ciencias forenses humanas (Evetts y Weir, 1998). Algunos autores han sugerido que un criterio conservador, sería considerar que el individuo que aportó la evidencia y el sospechoso de contribuir a la referencia pertenecen a la misma subpoblación (Balding y Nichols, 1994). Estos autores asumen que estos individuos elegidos de la subpoblación serían probablemente más similares que si fueran tomados al azar de la población general. Sin embargo, generalmente se desconoce el origen de dicha subpoblación. Una forma de incorporar la estructura poblacional en el cálculo del índice forense, es mediante la utilización del índice F_{ST} de la población general (Evetts y Weir, 1998). Algunos autores han concluido que las razas o grupos humanos no se diferencian notablemente entre sí y por lo tanto recomiendan no aplicar la corrección mediante F_{ST} . Esto no ocurre en la especie bovina, la cual se compone de grupos de individuos o razas relativamente aisladas entre sí desde el punto de vista genético. En el presente trabajo, cuando se aplicó la corrección por F_{ST} el índice L varió de $1,1 \text{ E-}04$ a $9,4 \text{ E-}08$. Los resultados así obtenidos fueron varios ordenes de magnitud superiores a los calculados sin el ajuste por estructuración poblacional. Uno de los criterios seguidos en este trabajo para el cálculo del índice L , se basó en utilizar la metodología estadística más conservadora (aquella que favorece a la hipótesis de la inocencia del acusado). No obstante, los valores corregidos del índice L fueron excesivamente minimizados.

Otra manera de considerar la estructura poblacional consistió en evaluar en cada uno de los casos de abigeato el índice L para cada una de las razas bovinas (Aberdeen Angus,

Hereford, Holando, Nelore y Brahman). En la mayoría de los casos examinados los valores obtenidos para dicho índice variaron notablemente entre las cinco razas estudiadas. Sin embargo, las mayores diferencias se observaron entre las subpoblaciones de origen cebuino y taurino, mientras que las tres razas europeas presentaron valores similares. Los valores de L calculados en la población general se hallaron dentro del rango presentado por el conjunto de las razas estudiadas. Al comparar los valores estimados para L para cada una de las razas se observó que en ocho muestras de las once analizadas la raza Aberdeen Angus mostró los mayores valores de dicho índice. Además, la raza Hereford y la raza Brahman mostraron los mayores valores en las muestras restantes. Una forma conservadora de realizar el cálculo de L podría basarse en elegir la raza que presentó los valores mayores de dicho índice. En los diez casos analizados, estas estimaciones variaron de $1,7 \text{ E-}06$ a $1,0 \text{ E-}11$. Estos resultados fueron siempre superiores a los calculados en la población general. Llamativamente, en el caso número 8 los valores obtenidos de L fueron muy similares entre las razas Brahman y Aberdeen Angus. Esta muestra podría corresponder a una cruce entre dichas razas, una práctica ganadera bastante frecuente en nuestro país.

En el presente trabajo, se propone utilizar otra forma conservadora de evaluar el índice L . Este enfoque alternativo se basa en determinar primero el origen racial de la evidencia mediante la aplicación de los métodos asignación de individuos y posteriormente, estimar el índice L empleando las frecuencias de la raza asignada. Esta argumentación se basa en que la raza asignada a la evidencia, sería la que ostenta valores más conservadores de L . Las once muestras pertenecientes a los diez casos de abigeato analizados, se asignaron en todos los casos a la raza que presentó los mayores valores del índice L . De esta manera, la metodología de asignación de los individuos a sus razas de origen demostró ser de utilidad en el campo de la genética forense de animales domésticos.

A continuación se detallan las principales conclusiones obtenidas en el presente trabajo.

- A pesar que los bovinos criollos descenden de un reducido grupo fundador, y han sufrido drásticas reducciones poblacionales, estas poblaciones presentaron valores superiores o intermedios de variabilidad genética.
- Las poblaciones locales de razas europeas e índicas presentaron valores de diversidad genética semejantes a los reportados en otras regiones.
- El cálculo de los niveles de diferenciación genética y los valores de F_{ST} estimados entre las razas evidenciaron un limitado flujo génico entre ellas. Las principales diferencias entre las razas y entre los grupos de razas se basaron fundamentalmente en sus respectivas frecuencias génicas, y en menor medida por diferencias en el tamaño de las variantes alélicas y en la presencia de alelos privados.
- Las razas Criolla Argentina y Criolla Chaqueña Boliviana no presentaron diferencias significativas en sus frecuencias génicas, por lo que podrían formar parte de la misma unidad poblacional.
- Los mayores niveles de diferenciación génica observados en las razas analizadas serían consecuencia de la principal y más antigua divergencia de los bovinos (grupo taurino y cebuino). La ausencia de una evidente estructuración de la variabilidad genética dentro del grupo taurino indicaría un origen simultáneo y más reciente de las razas pertenecientes a este grupo.
- El acervo genético de los bovinos criollos se habría formado por genes de origen taurino europeo y, en menor medida africano. Además, el germoplasma actual de algunas poblaciones tendría hasta un 10% de genes autosómicos de origen índico. La comparación de los resultados obtenidos con los marcadores autosómicos, holándricos y mitocondriales mostraron que los criollos sudamericanos presentan un patrón genético característico de introgresión de genes índicos a través de la línea paterna.
- Los nueve microsatélites analizados en las principales razas bovinas de la Provincia de Buenos Aires permitieron asignar los individuos a sus razas de origen con un error promedio del 4%. Los marcadores más eficientes para dicho propósito fueron los que presentaron un mayor número de alelos y en menor medida los que mostraron valores

superiores de F_{ST} . La asociación entre el número de alelos y la exactitud en la determinación de la raza de origen de los individuos revela la importancia de seleccionar marcadores genéticos, como los microsatélites, que presenten un número elevado de alelos.

- El poder de exclusión calculado para los casos de identificación individual y las paternidades superó el valor de 0,99 en todas las razas estudiadas, excepto en las paternidades donde no se dispuso de la información genética de la madre. En este último caso sería necesario incluir al menos 12 microsatélites para obtener valores aceptables de probabilidad.
- Las metodologías experimentales y estadísticas utilizadas junto a la información producto de la caracterización de las poblaciones locales permitieron resolver casos de abigeato y de paternidades complejas, aportando evidencias concretas para la resolución de este tipo de disputas judiciales.
- Dada la estructuración poblacional presente en la especie bovina, un buen criterio para el cálculo del índice L sería la selección de la raza con mayor valor de probabilidad. En este contexto, las técnicas de asignación racial serían de gran utilidad para la elección de dicha raza. La aplicación de este criterio conservador permite optimizar la valoración de la evidencia genética en la resolución los casos de hurto de ganado.

- AALTONEN L.A., PELTOMAKI P., LEACH F.S., SISTONEN P., PYKKANEN L., MECKLIN L. JARVINEN H., POWELL S.M., JEN J., HAMILTON S.R. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816.
- AITKIN C.G. 1995. Statistics and evaluation of evidence for forensic scientists. John Wiley y Sons, Chichester, Gran Bretaña.
- ALBÀ M.M., SANTIBÁÑEZ-KOREF M.F., HANCOCK J.M. 2001. The comparative genomics of glutamine codon repetition: a category of genes that includes repeat expansion disease genes is prominent in humans and mice and rare in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* 52: 249–259.
- AMOS W., SAWCER S.J., FEAKES R.W., RUBINSZTEIN D.C. 1996. Microsatellite show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* 13: 390-391.
- ANDERSSON - EKLUND L., DANELL B., RENDEL. 1991. Association between blood group blood protein polymorphisms and breeding values for production traits in Swedish Red and White Dairy Bulls. *Animal Genetics* 24: 361-376.
- ARMOUR J., ALONSO ALEGRE S., MILES S., WILLIAMS L., BADGE R. 2001. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein D., Schlötterer C., Eds. Oxford University press, Gran Bretaña.
- ARRANZ SANTOS J.J. 1994. Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y de DNA (Variaciones puntuales y microsatélites). Tesis doctoral de la Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal I.
- ARRANZ SANTOS J.J., BAYON Y., SAN PRIMITIVO F. 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics* 27: 415 - 419.
- ASTOLFI P., PAGNACCO G., GUGLIELMINO-MATESSI C.R. 1983. Phylogenetic analysis of native Italian cattle breeds. *Z. Tierz. Zücht. Biol.* 100: 87-100.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMANN J.G., STRUHL K.. 1990. En: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 2. John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY, pp A.15.
- AVISE J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman y Hall Eds. Nueva York, London. 511 pp.
- BACHTROG D., WEISS S., ZANGERL B., BREM G., SCHLÖTTERER C. 1999. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution* 16: 602–610.
- BAKER A.C., MANWELL C. 1980. Chemical classification of cattle. I. Breed groups. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 11: 127-150.

- BALDING D.J., NICHOLS R.A. 1994. DNA profile matches probability calculation: how to allow for population stractification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Science International* 64: 125-140.
- BANCHS I., BOSCH A., GUIMERA J., LAZARO C., PUIG A., ESTIVILL X. 1994. New alleles at microsatellite loci in CEPH families mainly arise from somatic mutation in the lymphoblastoid cell line. *Human Mutation* 3: 365-372.
- BARENDSE W., ARMITAGE S. M., KOSSAREK L. M., SHALOM A., WEISS B. K., CREIGHTON P., MCCARTHY F., RON M., TEALE A. J., FRIES R., MCGRAW R. A., MORE S. S., GEORGES M., SOLLER M., WOMACK J. E., HETZEL D. J., KIRKPATRICK J., RYAN A. M., CLAYTON D., LI L., NEIBERGS H. L., ZHANG N., GROSSE W. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6: 227 - 237.
- BARENESE W., ARMITAJE S., HETZEL D.J. 1991. Human apolipoprotein B (ADOB) detects a polymorphism rsal in cattle. *Animal Genetics* 22: 444.
- BASSAM B.J., CAETANO ANOLES G., GRESITOLF M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Annal Biochemistry* 196:80.
- BELL G. I., JURKA J. 1997 The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *Journal of Molecular Evolution* 44: 414–421.
- BENSAID A., KAUSHAL A., MACHUGH N.D., SHAPIRO S.Z., TEALE A.J. 1989. Biochemic characterization of activation associated bovine Class I major histocompatibility complex antigens. *Animal Genetics*, 20: 241-255.
- BERTORELLE G., EXCOFFIER L. 1998. Inferring admixture proportions from molecular data *Molecular Biology and Evolution* 15: 1298-1311.
- BISHOP M.D., KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., SUNDEN S.L., HAWKINS G.A., SOLINAS TOLDO S., FRIES R., GROSZ M.D., YOO J., BEATTIE J.W. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- BJØRNSTAD G., RØED K.H. 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics* 32: 59–65.
- BJØRNSTAD G., RØED. K. H. 2002. Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Animal Genetics*, 33: 264–270
- BLOTT S.C., WILLIAMS J.L., HALLEY C.S. 1998. Genetic relationships among European cattle breeds. *Animal Genetics* 29: 273-282.
- BLOTT S.C., WILLIAMS J.L., HALEY C.S. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-619.

- BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- BOUZAT J. L. 1994. La variabilidad genética y la conservación de poblaciones naturales. *Ciencia Hoy* 5: 14-20.
- BOUZAT J.L., GIOVAMBATTISTA G., GOLIJOW C.D., DULOUT F.N., LOJO M.M. 1998. Genética de la conservación de razas autóctonas: el Ganado Criollo Argentino. *Interciencia* 23:151-157.
- BOWCOCK A.M., RUIZ-LINARES A., TOMFOHRDE J., MINCH E., KIDD J.R., CAVALLI - SFORZA L.L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- BOWLING A.T., RYDER O.A. 1987. Genetic study of blood markers in Przewalski's horses. *Journal of Heredity* 78: 75-80.
- BOWLING A. T. 1994. Population genetics of Great Basin Feral horses. *Animal Genetics* 25: 67-74.
- BOYD W.C. 1954. Tables and nomograms for calculating chances of excluding paternity. *American Journal of Human Genetics* 6: 426-433.
- BRADLEY D. G., MACHUGH E., LOFTUS R. T., SOW R. S., HOSTE C. H., CUNNINGHAM P. 1994. Zebu-taurine variation in Y-chromosomal DNA: a sensitive assay for genetics introgression in West African trypanotolerant cattle populations. *Animal Genetics* 25:1-12.
- BRADLEY D. G., MACHUGH E., CUNNINGHAM P., LOFTUS R. T. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 93:5131-5135.
- BRAEND M. 1972. Studies on the relationship between cattle breeds in Africa, Asia and Europe: evidence obtained by studies of blood groups and protein polymorphisms. *World Review of Animal Production* 8: 9-14.
- BRITTEN R.J., KOHNE D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- BUCHANAN F.C., ADAMS L.J., LITTLEJOHN L.J., MADDOX R.P., CRAWFORD A.M. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22: 397-403.
- BULDYREV S. V., GOLDBERGER A. L., HAVLIN S., MANTEGNA R. N., MATSA M. E., PENG C.-K., SIMONS M., STANLEY H. E. 1995. Long-range correlation properties of coding and noncoding DNA sequences: GenBank analysis. *Phys. Rev. E* 51: 5084-091.

- CAÑON 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.
- CAÑON J., ALEXANDRINO P., BESSA I., CARLEOS C., CARRETERO Y., DUNNER S., FERRAN N., GARCIA D., JORDANA J., LALOE D., PEREIRA A., SANCHEZ A., MOAZAMI-GOUDARZI K. 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation propose. *Genetics Seletion and Evolution* 33: 311-332.
- CARROL J.D. 1981. INDSCAL En: Introduction to multidimensional scaling. Ed. Schiffman S.S., Reynolds M.L., Young F.W., Academic Press, Nueva York., pp 371-389.
- CARVAJAL-CARMONA L.G., BERMUDEZ N.R., MORENO F.L., MARQUEZ M.E., ESTRADA J.L., DAVIES S., DERR J., BEDOYA G., OSSA J.E., RUIZ-LINARES A. 1998. Genetic diversity of Colombian Criollo cattle. *Animal Genetics* 29: 10-23.
- CARVAJAL-CARMONA L.G., BERMUDEZ N., OLIVERA-ANGEL M., ESTRADA L., OSSA J., BEDOYA G., RUIZ-LINARES A. 2003. Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics* 165: 1457-14563.
- CAVALLI-SFORZA L.L., Edwards A.W. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- CAVALLI-SFORZA L.L. 1969. Human diversity. *Proceedings of XII International Congress. Genetics* 3:405.
- CAVALLI-SFORZA L. L., BODMER W. F. 1981. *Genética de las poblaciones humanas*. Ed. Omega, Barcelona.
- CAVALLI-SFORZA L.L., PIAZZA A., MENOZZI P., MOUNTAIN J. 1988. Reconstruction of human evolution: Bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 85: 6002-6006.
- CAVALLI-SFORZA L.L., PIAZZA A. 1993. Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *European Journal of Human Genetics* 1: 3-18.
- CAVALLI-SFORZA L.L., MENOZZI P., PIAZZA A. 1994. *The history and geography of human genes*. Princeton, N.J. Princeton University Press.
- CHAKRABORTY R., SHAW M., SCHULL W.J. 1974. Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics* 26: 477-488.
- CHAKRABORTY R. 1986. Gene admixture in human populations: models and predictions. *Yearbook of Physiological Anthropology* 29: 1-43.
- CHAKRABORTY R., KIMMEL M., STIVERS D.N., DAVISON J., DEKA R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 94:1041-1046.

- CHARLIER C., FARNIR F., BERZI P., VANMANNSHOVEN P., BROUWERS B., VROMANS H., GEORGES M. 1996. Identity-by-descent mapping of recessive traits in livestock: Application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. *Genome Research* 6: 580-589.
- CHEN K.H., CANN H., CHEN T.C., VAN WEST B., CAVALLI-SFORZA L. 1985. Genetic markers of an aboriginal Taiwanese population. *American Journal of Physiological Anthropology* 66: 327-337.
- CHUNG M.Y., RANUM L.P., DUVICK L.A., SERVADIO A., ZOGHBI A.Y., ORR H.T. 1993. Evidence of mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature Genetics* 5: 254-258.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI-GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULLEY J.L., LEVEZIEL H., CIANCI D. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 73: 3259-3268.
- CLAWSON M.L., HEATON M.P., CHITKO-MCKOWN C.G., FOX J.M., SMITH T.P., SNELLING W.M., KEELE J.W., LAEGREID W.W. 2004. *Beta-2-microglobulin* haplotypes in U.S. beef cattle and association with failure of passive transfer in newborn calves. *Mammalian Genome* 15: 227-236.
- CLUTTON-BROCK J. 1987. A natural history of domesticated mammals. Cambridge University Press and British Museum (Natural History).
- CLUTTON-BROCK J. 1989. Cattle in ancient North Africa. En: The walking larder: patterns of domestication, pastoralism and predation. CLUTTON-BROCK J. Ed., Londres, UnwinHyman, pp. 200-206.
- COCKERHAM C.C. 1963. Estimation of genetics variances. *Statistical Genetics and Plant Breeding*. NAS-NRC 982: 53- 94.
- COCKERHAM C.C. 1969. The variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- COOPER T.N., KRAWCZAK M. 1993. Human gene mutation. Bios, Oxford.
- CORCUERA J. 1982. El enigma de la vaca ñata. *Todo es Historia* 176: 21-31.
- CORNUET J.M., LUIKART G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- 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.
- COX R. A. 1968. Methods in enzymology. Grossmann L., Moldave E., Eds. Vol 12. Part B, Academic Press, Orlando, Florida, pp 120-129.

- CROW J.F., KIMURA M. 1970. An introduction to population genetics. Nueva York, Harperand Row.
- CYMBRON T., LOFTUS R.T., MALHEIRO M.I., BRADLEY D.G. 1999. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 266: 597-603.
- DAMIANI G., FERRETTI L., ROGNONI G., SGARAMELLI V. 1990. Restriction fragment length polymorphism analysis of the *kappa-casein* locus in cattle. Animal Genetics 21:107-114.
- DAMIANI G., PILLA F., LEONNE P., CACCIO S. 1992. Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine beta-casein B variant. Animal Genetics 23: 561-565.
- DE LUCA J.C., ZUFRIATEGUI L., RIPOLI M.V., GIOVAMBATTISTA G., ROJAS F.V., DULOUT F.N. 1999. Cytogenetic study of "Saavedreño" Creole cattle. Cytologia 65:7-11.
- DE SAL PAZ A.R. 1986. Características genéticas y criterios selectivos en ganado Criollo. En: Ganado Bovino Criollo. Subcom. Asesor del Árido Subtropical Arg. de la SeCyT y Or. Gráfica Ed. pag. 12-16.
- DEKA R., CHAKRABORTY R., FERREL R.E. 1991. A population genetics study of sixth VNTR loci in three ethnically defined population. Genomics 11: 83-92.
- DEL LAMA S.N., ZAGO M.A. 1996. Identification of *κ-casein* and *β-lactoglobulin* genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* populations. Brazilian Journal of Genetics 19:73-77.
- DELAHUNTY C., ANKENER W., DENG Q., ENG J., NICKERSON D. 1996. Testing the feasibility of DNA typing for human identification by PCR and oligonucleotide ligation assay. American Journal of Human Genetics 58: 1239-1246.
- DENICOURT D., SABOUR M.P., MCALLISTER A.J. 1990. Detection of bovine *κ-casein* genomic variants by the polymerase chain reaction method. Animal Genetics 21: 215-216.
- DEVLIN B., ROEDER K., ELLSTRAND N.C. 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. Theoretical and Applied Genetics 76: 369-380.
- DI RIENZO A., PETERSON A.C., GARZA J.C., VALDES A.M., SLATKIN M., FREIMER N.B. 1994. Mutational processes at simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Science USA 91: 3166-3170.
- DIB C., FAURE S., FIZAMES C., SAMSON D., DROUOT N., VIGNAL A., MILLASSEAU P., MARC S., HAZAN J., SEBOUN E., LATHROP M., GYAPAY G., MORISSETE J.,

- WEISSENBAACH J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380:152–154
- DIETRICH W., KATZ H., LINCOLN S.E., SHI H.E., FRIEDMAN J., DRACOPOLI N., LANDER E. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423.
- DIETRICH W.F., MILLER J., STEEN R., MERCHANT M.A., DAMRON-BOLES D., HUSAIN Z., DREDGE R., DALY M.J., INGALLS K.A., O'CONNOR T.J. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380: 149-152.
- DIEZ-TASCON C., LITTLEJHON R. P., ALMEIDA P. A., CRAWFORD A. M. 2000. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* 31: 243–251.
- DOKHOLYAN N.V., BULDYREV S.V., HAVLIN S., STANLEY H.E. 2000. Distributions of dimeric tandem repeats in non-coding and coding DNA sequences. *Journal of Theoretical Biology* 202: 273-282.
- DONNELLY P., TAVARÉ S. 1995. Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annual Review of Genetics* 29: 401-421.
- EDWARDS A., CIVITELLO A., HAMMON H.A., KASKEY C.T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 49: 746-756.
- EDWARDS A., HAMMOND H.A., JIN L., CASKEY C.T., CHAKRABORTY R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12: 241-253.
- EDWARDS C.J., GAILLARD C., BRADLEY D.G., MACHUGH D.E. 2000. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics* 31: 127-130.
- EGGEN A., SOLINAS TOLDA S., DIETZ A.B., WOMACK J.E., STRANZINGER G., FRIES R. 1992. RASA contains a polymorphic microsatellite and maps to bovine syntenic group U22 on chromosome 7q24-qter. *Mammalian Genome* 3: 559-563.
- ELLEGREN H. 1993. Genome analysis with microsatellite markers. Department of animal breeding and genetics, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- EPSTEIN H. 1971. The origin of the domestic animals of Africa. 1st Ed. Nueva York, Africana.
- EPSTEIN H., MASON I.L. 1984. Cattle. *En: Evolution of domesticated animals*. 1st Ed. Londres, Longman, pp 6-27.
- ERLICH H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplification, Stockton Press, Nueva York, NY, 246 pp.

- ESTOUP A., GARNERY L., SOLIGNAC M., CORNUET J.M. 1995. Microsatellite variation in Money bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140: 679-695.
- ESTOUP A., CORNUET J.M. 1999. Microsatellite evolution: inference from population data. En: Microsatellites, evolution and application. Eds Goldstein D.B., Schöterer C. Oxford University Press, Oxford, pp 49-65.
- EVETT I. W., WEIR B.S. 1998. Interpreting DNA evidence. Sinauer, Sanderland MA.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E, QUATTRO J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application of human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136: 343-359.
- FAVRE L., BALLOUX F., GOUDET J., PERRIN N. 1997. Female-based dispersal in the monogamous mammal *Crocodylus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of Royal Society of London B* 264: 127-132.
- FELIUS M. 1995. Cattle Breeds: an encyclopaedia. Doctinchem: Misset.
- FELSENSTEIN J. 1982. How can we infer geography and history from gene frequencies? *Journal of Theoretical Biology* 96: 9-20.
- FERNANDEZ F.M., DE SAL PAZ A.R. 1986. Variantes genéticas de β -lactoglobulinas en ganado bovino Criollo. En Segundas jornadas Nacionales de Ganado Bovino Criollo. 1:159-163.
- FERRETTI L., LEONE P., SGARAMELLA V. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Research* 18: 6829-6833.
- FORD E.B. 1965. Polymorphism. *Biology Reviews* 20:73 - 88.
- FRANKEL O.H. 1970. Variation, the essence of life. Sir William Macleay Memorial Lecture. *Proc. Linn. Soc.* 95:158-169.
- FRANKEL O.H., SOULÉ M.E. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRIES R. 1993. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Animal Genetics* 24: 111 - 110.
- GARZA J.C., SLATKIN M., FREIMER N.B. 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology Evolution* 12: 594-603.
- GASTIER J.M., PULIDO J.C., SUNDEN S., BRODY T., BUETOW K.H., MURRAY J.C., WEBER J.L., HUDSON T.J., SHEFFIELD V.C., DUYK G.M. 1995. Survey of trinucleotide repeat in the human genome: assessment of their utility as genetic marker. *Human Molecular Genetics* 4: 1829-1836.

- GATESY J., YELON D., DESALLE R., VRBA E.S. 1992. Phylogeny of the Bovidae (Artiodactyla, Mammalia) based on mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 433-446.
- GELDERMANN H. 1975. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. 1. Methods of Theoretical and Applied Genetics 46: 319 - 330.
- GELDERMANN H. 1976. Biochemische Aspekte in der Haustiergenetik. 2. Zielrichtungen biochemisch-genetischer Arbeiten in der Haustiergenetik. *Züchtungskunde* 48: 339 - 361.
- GELDERMANN H., PIEPPER U., ROTH B. 1985. Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theoretical and Applied Genetics* 70: 138 - 146.
- GELHAUS A., SCHNITTGER L., MEHLITZ D., HORSTMANN R. D., MEYER C. G. 1995. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel *BoLA-DRB3* alleles. *Animal Genetics* 26: 147-153.
- GEORGES M.A., LEQUARRE S., CASTELLI R., HANSET G., VASSART Y. 1988. DNA fingerprints in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 47:127-131.
- GEORGES M., LATHROP M., HILBERT P., MARCOTTE A., SCHWERS A., SWILLENS S., VASSART G., HANSET Y. 1990. DNA fingerprints for linkage studies in cattle. *Genomics* 6: 461-474.
- GEORGES M., MASSEY J. 1992. Polymorphic DNA markers in Bovidae. World Intellectual Property Organisation, Geneva.
- GEORGES M., LATHROP M., DIETZ A. B, LEFORT A., LIBERT F., MISHRA A., NIELSEN D., SARGEANT L. S., STEELE M. R., ZHAO X., LEIPOLD H., WOMACK E. 1993. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated QTL. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90: 1058-1062.
- GEORGES M., DRINKWATER R., KING T., MISHRA A., MOORE S. S., NIELSEN D., SARGEANT L.S., SORENSEN A., STEELE M.R., ZHAO X., WOMACK J.E., HETZEL J. 1993. Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nature Genetics* 4: 206-210.
- GEORGES M., NIELSEN D., MACKINNON M., MISHRA A., OKINOTO R., PASQUINO A.T, SARGEANT L.S., SORENSEN A., STEELE M.R., ZHAO X. 1995. Mapping quantitative traits loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907 - 920.
- GEORGES M., ANDERSSON L. 1996. Livestock genomics comes of age. *Genome Research* 6: 907-921.

- GERARD C., CHRISTOPHE D., COMPERE T., VASSART G. 1990. The poly (purine) poly (pyrimidine) sequence in the 5' end of the thyroglobulin gene used as a probe identifies a DNA fingerprint in man. *Nucleic Acids Research* 18: 4297.
- GERBI S. A. 1975. Interdigitated repeated sequences in bovine satellite DNA. *Nature* 253: 367-370.
- GILBERTI H. 1961. Historia económica de la ganadería argentina. Hyspamerica Solar/Hachette.
- GIOVAMBATTISTA G., DULOUT F. N., LOJO M. M. 1995. Analisis del locus *TGLA44* (*DU17S3*) en la raza ganado bovino Criollo Argentino. XXVI Congreso Argentino de Genética. San Carlos de Bariloche.
- GIOVAMBATTISTA G. 1996. Estudio de la variabilidad (polimorfismos) genética en poblaciones de bovinos (*Bos taurus*) de la raza Criolla. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, U.N.L.P., La Plata, Argentina.
- GIOVAMBATTISTA G., GOLIJOW C.D., DULOUT F.N., LOJO M.M. 1996. Gene frequencies of *DRB3.2* locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics* 27: 55-56.
- GIOVAMBATTISTA G., PERAL GARCIA P., KIENAST M., RIPOLI M.V., DULOUT F.N. 1997. Nuevas tendencias en la identificación de los animals domésticos. *Agro Sur* 25: 106-113.
- GIOVAMBATTISTA G., RIPOLI M.V., DE LUCA J.C., MIROL P.M., LIRÓN J.P., DULOUT F.N. 2000. Male-mediated introgression of *Bos indicus* genes into Argentine and Bolivian Creole cattle breeds. *Animal Genetics* 31: 302-305.
- GIOVAMBATTISTA G., RIPOLI M.V., PERAL GARCIA P., BOUZAT J.L. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Animal Genetics* 32: 240-247.
- GLOWATZKI-MULLIS M.L., GAILLARD C., WIGGER G., FRIES R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics* 26: 7-12.
- GOLDSTEIN D.B., CLARK A.G. 1995. Microsatellite variation in North American population of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* 23: 3882-3886.
- GOLDSTEIN D.B., RUIZ LINARES A., CAVALLI -SFORZA L.L., FELDMAN M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- GOLIJOW C.D. 1996. Estudio de la reducción de la variabilidad genética por acción de la selección artificial en poblaciones de *Bos taurus*. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- GOLIJOW C.D., GIOVAMBATTISTA G., POLI M., DULOUT F.N., LOJO M.M. 1996. κ -casein gene frequencies support subdivision and historical origin of Argentine Creole cattle. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 583-588.

- GOU S.W., THOMPSON E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- GOUDET J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- GOUDET J., RAYMOND M., DE MEEUS T., ROUSSET F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 933-1940.
- GRIGSON C. 1980. The craniology and relationships of four species of *Bos*. 5. *Bos indicus* L. *Journal of Archaeological Science* 7: 3-32.
- GROBET L., ROYO MARTIN L.J., PONCELET D., PIROTTIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MENISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., HANSET R., GEORGES M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nature Genetics* 17:71-74.
- GROSCLAUDE F. 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *INRA Prod. Anim.* 1: 5-17.
- GROSCLAUDE F., AUPETIT R.Y., LEFEBRE J., ME'RIAUX J.C. 1990. Essai d'analyse des relations géne'tiques entre les races bovines françaises a` l'aide du polymorphisme biochimique. *Genetics Selection and Evolution* 22: 317-338.
- GUO S.W., THOMPSON E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- GWAKISA P.S., KEMP S.J., TEALE A.J. 1994. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Animal Genetics* 25: 89-94.
- HABERFELD A., CAHANER A., YOFEE O., PLOTSKY Y., HILLEL J. 1991. DNA Fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Animal Genetics* 22: 229-306.
- HABERFELD A., KALAY D., WEISBERGER P., GAL O., HILLIEL J. 1993. Application of multilocus molecular markers in cattle breeding. 1. Minisatellites y Microsatellites. *Journal of Dairy Science* 76: 645-652.
- HAIG S.M., GRATTO-TREVOR C.L., MULLINS T.D., COLWELL M.A. 1997. Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Molecular Ecology* 6: 413-27.
- HALDANE J.B. 1954. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* 52: 131-635.
- HALL S.J., RUANE J. 1993. Livestock breeds and their conservation: a global overview. *Conservation Biology* 7: 815-825.

- HAMADA H., PETRINO M.G., TAKUNAGA T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 79: 6465-6469.
- HANCOCK J.M. 1995. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution* 41: 1038-1047.
- HANCOCK J.M. 2002. Genome size and the accumulation of simple sequence repeats: implications of new data from genome sequencing projects. *Genetica* 115: 93-103.
- HANOTTE O., OKOMO M., VERJEE Y., REGE E., TEALE A. 1997. A polymorphic Y chromosome microsatellite locus in cattle. *Animal Genetics* 28: 318-319.
- HANOTTE O., OKONO M., BRADLEY D.G., VERJEE Y., OCHIENG J.W., TEALE A., REGE E.O. 1998. Geographic distribution and frequency of taurine *Bos taurus* and zebu *B. indicus* Y chromosome haplotypes amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Animal Genetics* 29 (Suppl. 1): 9.
- HANOTTE O., BRADLEY D.G., OCHIENG J.W., VERJEE Y., HILL E.W., REGE E.O. 2002. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science* 296: 336-339.
- HARR B., SCHLÖTERER C. 2000. Long alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics* 155: 1213-1220.
- HARRIS H. 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proceedings of the Royal Society London, Ser. B* 164: 298-310.
- HART R.W., SETLOW R.B. 1974. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 71: 2169-2173.
- HART G.L., BASTIAANSEN J., DENTINE M.R., KIRKPATRICK B.W. 1993. Detection of four-allele single strand conformation polymorphism (SSCP) in the bovine prolactin gene 5' flank. *Animal Genetics* 24:149.
- HEDRICK P.W. 1992. Shooting the RAPDs. *Nature* 355:679-680.
- HERRMANN B., HUMMEL S. 1994. Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical and forensic specimens. Springer-Verlag, Nueva York.
- HEYER E., PUYMIRAT J., DIJLTJES P., BAKKER E., KNIJFF P. 1997. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequency using deep rooting pedigrees. *Human Molecular Genetics* 6: 799-803.
- HILL M.O. 1974. Correspondence analysis: a neglected multivariate technique. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 36: 340-354.

- HUDSON R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. En: Oxford Surveys in Evolutionary Biology, Vol. 7, Futuyma D., Antonovics J., Eds. Oxford University Press, Oxford, pp. 1–44.
- HUDSON T.J., ENGELSTEIN M., LEE M.K., HO E.C., RUBENFIELD M.J. 1992. Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms. *Genomics* 13: 622-629.
- HUNTER R.L., MARKERT C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.
- INCHAUSTI D., TAGLE E.C. 1980. *Bovine* *tecnica*. Ed. El Ateneo. 492 pp.
- INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. 1990. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, CA, 482 pp.
- IONOV Y., PEINADO M.A., MALKHOSYAN S., SHIBATA D., PERUCHO M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeat sequence revealed a new mechanism for colorectal carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561.
- IRVIN D.M., PRAGER E.M., WILSON A.C. 1992. Evolutionary genetics of ruminants lysozymes. *Animal Genetics* 23: 193-202.
- ISRAEL C., WELLER J.I. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science* 83: 181-187.
- JADOT M., LALOUEX J., BURNY A., KETTMANN R. 1992. Detection of bovine *β -lactoglobulin* genomic variants by the polymerase chain reaction method and molecular hybridization. *Animal Genetics* 23: 77 - 80.
- JAMIESON A., TAYLOR C.S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400.
- JARNE P., DAVID P., VIARD F. 1998. Microsatellites, transposable elements and the X chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 15: 28–34.
- JEFFREYS A.J., WILSON V., THEIN S.L. 1985a. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- JEFFREYS A.J., WILSON V., NEUMANN R., KEYTE J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research* 16: 10953-10971.
- JEFFREYS A.J., WILSON V., THEIN S.L. 1985b. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- JEFFREYS A.J., MACLEOD A., TAMAKI K., NEIL D.L., MONCKTON D.G. 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209.
- JEFFREYS A.J., TAMAKI K., MACLEOD A., MONCKTON D.G., NEILL D.L., ARMOUR J.A. 1994. Complex gene conversion events in germ line mutation at human minisatellites. *Nature Genetics* 6: 136-145.

- JIN L., SHRIVER M., BOERWINKLE E., CHAKRABORTY R. 1996. A measure of genetic distance for the stepwise mutation model and its application in highly polymorphic tandem repeat loci. *Genet. Res.*
- KANTANEN J., OLSAKER I., HOLM L.E., LIEN S., VILKKI J., BRUSGAARD K., EYTHORSDDOTTIR E., DANELL B., ADALSTEINSSON S. 2000. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity* 91: 446-457.
- KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., MCGRAW R.A., SONSTEGARD T.S., SMITH T.P.L., LOPEZ-CORRALES N.L., BEATTIE C.W. 1997. A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7: 235 - 249.
- KEMENES P.A., REGITANO L.C.A., ROSA A.J.M., PACKER I.U., RAZOOK A.G., FIGUEIREDO L.A., SILVA N.A., ETCHEGARAY M.A.L., COUTINHO L.L. 1999. κ -casein, β -lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim y Santa Gertrudis cattle. *Genetics and Molecular Biology* 22: 539-541.
- KEMP S.J., TEALE A.J. 1994. Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *Bos taurus*. *Animal Genetics* 25: 83-88.
- KIDD K.K., PIRCHNER F. 1971. Genetic relationships of Austrian cattle breeds. *Animal Blood Groups Biochemistry and Genetics* 2: 145-158.
- KIDD K.K., CAVALLI-SFORZA L. 1974. The role of genetic drift in the differentiation of Icelandic and Norwegian cattle. *Evolution*, 28: 381-395.
- KIDD K.K., STONE W.H., CRIMELLA C., CARENZI C., CASATI C., ROGNONI M. 1980. Immunogenetics and population genetic analysis of Iberian cattle. *Animal Blood Groups Biochemistry and Genetics* 11: 21-38.
- KIEFFER N.M., CARTWRIGHT T.C. 1968. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. *Journal of Heredity* 59: 35-36.
- KIKKAWA Y., TAKADA T., SUTOPO, NOMURA K., NAMIKAWA T., YONEKAWA H., AMANO T. 2003. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Animal Genetics* 34: 96-101.
- KIMURA M., CROW J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- KIMURA M., OHTA T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 75: 2868-2872.
- KINGHORN B.P., KENNEDY B.W., SMITH C. 1993. A method of screening for genes of major effect. *Genetics* 134: 351-360.

- KIRBBY L.T. 1990. DNA fingerprinting. Stockton press, Nueva York, 375 pp.
- KIRKPATRICK B. W., HUFF B.M., CASAS-CARRILLO E. 1993. Double-strand conformation polymorphism as a source of highly polymorphic genetic markers. *Animal Genetics* 24: 155-162.
- KOSKINEN M.T., BREDBACKA P. 2000. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Animal Genetics* 31:310-317.
- KUNKEL T.A. 1993. Slippery DNA and diseases. *Nature* 365: 207-208.
- LAVAL G., IANNUCELLI N., LEGAULT C., MILAN D., GROENEN M.A., GIUFFRA E., ANDERSSON L., NISSEN P.H., JORGENSEN C.B., BEECKMANN P., GELDERMANN H., FOULLEY J.L., CHEVALET C., OLLIVIER L. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection and Evolution* 32:187-203.
- LENSTRA J.A., VAN BOXTEL J.A.F., ZWAAGSTRA K.A., SCHWERIN M. 1993. Short interspersed nuclear element (SINE) sequence of the bovine. *Animal Genetics* 24: 33-40.
- LEVINSON G., GUTMAN G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4:203-221.
- LEWIN H.A., SCHMITT K., HUBERT R., VAN EIJK M.J.T., ARNHEIM N. 1992. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: Genetics mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics* 13: 44 - 48.
- LEWONTIN R.C., HUBBY J. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudobsucura*. *Genetics* 54: 595-609.
- LIRÓN J.P. 1999. Caracterización genética de la Raza Bovina Criolla Chaqueña Boliviana. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, U.N.A.M.
- LIRÓN J.P., RIPOLI M.V., DE LUCA J.C., PERAL-GARCÍA P., GIOVAMBATTISTA G. 2002. Analisis of Genetic Diversity and Population Structure in Argentine and Bolivian Creole Cattle using Five Loci Related to Milk Production. *Genetics and Molecular Biology* 25: 413-419.
- LITT M., LUTY J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- LOFTUS R.T., MACHUGH D.E., BRADLEY D.G., SHARP P.M., CUNNINGHAM E.P. 1994a. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 2757-2761.

- LOFTUS R.T., MACHUGH D.E., NGERE L.O., BALAIN D.S., BADI A.M., BRADLEY D.G., CUNNINGHAM E.P. 1994b. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal Genetics* 25: 265-271.
- LUCOTTE G. 1977. Le polymorphisme biochimique et les facteurs de son maintien. Masson. París, Francia.
- MAC KECHNI J.D., MEYN K. 1991. Breed identification and development. En: Cattle genetics resources. Hickman C., Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 201-220.
- MACHUGH D.E., LOFTUS R.T., BRADLEY D.G., SHARP P.M., CUNNINGHAM P. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proceedings of the Royal Society of London* 256: 25-31.
- MACHUGH D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. PhD Thesis, Universidad de Dublin, Irlanda.
- MACHUGH D.E., SHRIVER M.D., LOFTUS R.T., CUNNINGHAM P., BRADLEY D.G.. 1997. Microsatellite DNA variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146: 1071-1086.
- MACHUGH D.E., LOFTUS R.T., CUNNINGHAM P., BRADLEY D.G.. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 micrisatellite markers. *Animal Genetics* 29: 1-8.
- MACHUGH D.E., TROY C.S., McCORMICK F., OLSAKER I., EYTHÓRSDOTTIR E., BRADLEY D.G. 1999. Early medieval cattle remains from a Scandinavian settlement in Dublin: genetic analysis and comparison with extant breeds. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354: 99-109.
- MAGEE D.A., MEGHEN C., HARRISON S., TROY C.S., CYMBRON T., GAILLARD C., MORROW A., MAILLARD J.C., BRADLEY D.G. 2002. A partial African ancestry for the creole cattle populations of the Caribbean. *Journal of Heredity* 93: 429-432.
- MANNEN H., TSUJI S., MUKAI F., GOTO N., OHTAGAKI S. 1993. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationships coefficients. *Journal of Heredity* 84: 166-169.
- MANWELL C., BAKER M.A. 1980. Chemical classification of cattle. 2. Phylogenetic tree and specific status of the Zebu. *Animal Blood Groups Biochemics and Genetics* 11:151-162.
- MARDIA K.V., KENT J.T., BIBBY J.M. 1979. Multivariate analysis. Academic Press, Nueva York, pp 213-246.
- MARSHALL T.C., SLATE J., KRUUK L.E., PEMBERTON J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

- MARTIN-BURRIEL I., GARCIA-MURO E., ZARAGOZA P. 1999. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 30: 177–182.
- MARTINEZ A.M., DELGADO J.V., RODERO A., VEGA-PLA J.L. 2000. Genetics structure of the Iberian pig breed using microsatellite. *Animal Genetics* 31: 295-301.
- MARTINEZ R.D., GIOVAMBATTISTA G., RIPOLI M.V., DE LUCA J.C., DULUOT F.N. 2003. Patagonian Argentine Creole cattle polymorphism: comparison with North-West populations of this breed. *Research in Veterinary Science* 74: 287-290.
- MATEUS J.C., PENEDO M.C., ALVES V.C., RAMOS M., RANGEL-FIGUEIREDO T. 2004. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 35: 106-113.
- MAUDET C., LUIKART G., TABERLET P. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80: 942–950.
- MEADOW R.H. 1984. Animal domestication in the Middle East: a view from the Eastern margin. In: *Animals and Archaeology: 3. Early Herders and their Flocks*. CLUTTON-BROCK J, GRIGSON C, Eds. Oxford University Press, Oxford, pp 309-337.
- MEAGHER T.R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaeaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *The American Naturalist* 128: 199-215.
- MEDJUGORAC I., KUSTERMANN W., LAZAR P., RUSS I., PIRCHNER F. 1994. Marker-derived phylogeny of European cattle supports demic expansion of agriculture. *Animal Genetics* 25:19-27.
- MEIRELLES F.V., ROSA A.J.M., LOBO R.B., GARCÍA J. M., SMITH L.C., DUARTE F.A.M. 1999. Is the american zebu really *Bos indicus*?. *Genetics and Molecular Biology* 22, 4: 543-546.
- MESELSON M., YUAN R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217: 1110-1114.
- MIKKO S., ANDERSSON L. 1995. Extensive MHC class II diversity in African and European cattle. *Immunogenetics* 42: 408 - 413.
- MILLER J.M., KOOPMAN M. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from bovine gene. *Animal Genetics* 21: 77-82.
- MILLER W. J. 1966. Blood groups in Longhorn cattle. *Genetics* 54: 391-404.
- MIRETTI M.M., FERRO J.A., FERRO M.I., LARA M.A., CONTEL E.P.B. 1998. Genetic variability at the *BoLA-DRB3* locus in South American native and exotic cattle breeds. *Animal Genetics* 29: 24-31.

- MIRETTI M.M., PEREIRA H.A., POLI M.A., CONTEL E.P.B., FERRO J.A. 2002. African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *The Journal of Heredity* 93: 323-330.
- MIROL P.M., GIOVAMBATTISTA G., LIRON J.P., DULOUT F.N. 2003. African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. *Heredity* 91: 248-254.
- MOAZAMI-GOUDARZI K., LALOE D., FURET J.P., GROUSCLAUDE F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics* 28: 338-345.
- MOAZAMI-GOUDARZI K., LALOE D. 2002. Is a multivariate consensus representation of genetics relationships among populations always meaningful?. *Genetics* 162: 473-484.
- MOORE S.S., BYRNE K. 1993. Dinucleotide polymorphism at the bovine histamine H1 receptor locus. *Animal Genetics* 24: 150.
- MORENO OSORIO, F.L. 1998. Diversidad y relaciones filogenéticas del ganado Criollo Colombiano. Tesis de Magister en Genética de Poblaciones Animales. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- MORRAL N., NUNES V., CASALS T., ESTIVILL X. 1991. CA/GT microsatellite within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossing over. *Genomics* 10: 692-698.
- MOXON E.R., RAINEY P.B., NOWAK M.A., LENSKI R.E. 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology* 4: 24-33.
- MULLIS K., FALOONA F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* 155: 335-350.
- NAIK S.N. 1978. Origin and domestication of zebu cattle (*Bos indicus*). *Journal of Human Evolution* 7: 23-30.
- NAKAMURA Y., LEPPERT M., O'CONNELL P., WOLFT-HOLM R., CULVER M., MARTIN C., FUJIMOTO E., HOFF M., KUMLIM E., WHITE R. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping and
- NEEL J.V. 1973. "Private" genetic variants and the frequency of mutation among South American Indians. *Proceedings National Academy of Science USA* 70: 3311-3315.
- NEFF B.D., REPKA J., GROSS M.R. 2001. A bayesian framework for parentage analysis: the value of genetic and other biological. *Theoretical Population Biology* 59: 315-331.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Nature* 106: 283-292.
- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 70: 3321-3323.

- NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, Nueva Cork, 512 pp.
- NEI M., CHESSER R.K. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annual Human Genetics* 47: 253-259.
- NEI M., ROYCHOUDHURY A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
- NEI M., TAJIMA F., TATENO Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.
- NEI M., TAKEZAKI N. 1996. Reconstruction of phylogenetics trees from microsatellites (STR) loci. *Animal Genetics* 27(Suppl. 2): 1-16.
- NEVES A., DA S. 1918. Primeira Conferencia Nacional Pecuaria. Secretaria de Agricultura, Comércio e Obras Publicas do Estado de Sao Paulo - S.P. 149p.
- NEVO E. 1978. Genetic variation in natural populationns: phatterns and theory. *Theoret. Pop. Biol.* 13: 121-177.
- NEIBERGS H.L., DIETZ A.B, WOMACK J.E. 1993. Single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) detected in five bovine genes. *Animal Genetics* 24: 81-84.
- NIELSEN E.E., HANSEN M.M., LOESCHCKE V. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology* 6: 487-92.
- NIJMAN I.J., BRADLEY D.G., HANOTTE O., OTSEN M., LENSTRA J.A. 1999. Satellite DNA polymorphisms and AFLP correlate with *Bos indicus-taurus* hybridization. *Animal Genetics* 30: 265-273.
- ORTH K., HUNG J., GAZDAR A., BOWCOCK A., MATHIS J. M., SAMBROOK J. 1994. Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 9495-9499.
- PAETKAU D., CALVERT W., STIRLING I., STROBECK C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- PARK C.H., RUSS I., DA Y., LEWIN H.A. 1995. Genetic mapping of F13A to BTA23 by sperm typing: Difference in recombination rate between bulls in the DYA-PRL interval. *Genomics* 27:113-118.
- PAYNE W.J. 1991. Domestication: a forward step in civilisation. En: *Cattle Genetic Resources*. HICKMAN C.G., Ed., Amsterdam: Elsevier, pp 51-72.
- PEMBERTON J.M, SLATE J., BANCROFT D.R., BARRETT J.A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 4: 249-252.
- PENA S.D., DE SOUZA K.T., DE ANDRADE M., CHAKRABORTY R. 1994. Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von

- Willebrand factor gene. Proceedings of the National Academy of Science USA 91: 723-727.
- PEPIN L.A.U., LEPINGLE A., BERTHIER J.L., BENSAID A., VAIMAN D. 1995. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. Heredity 74: 53–61.
- 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 Doctoral de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. U.N.L.P. La Plata, Argentina.
- PERAL GARCÍA P., GOLIJOW C.D., GIOVAMBATTISTA G., LOJO M.M., DULOUT F.N. 1999. Analysis of *ELA-DRB* exon 2 polymorphism by PCR-RFLP. Journal of Equine Science 10:13-16.
- PINDER S.J., PERRY B.N., SKIDMORE C.J., SAVVA D. 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. Animal Genetics 22:11-20.
- POLI M.A. 1986. Asociación entre factores sanguíneos, transferrinas, genes Ps, Bs y aspectos productivos en bovinos criollos. RIA, XXI, N 2:67-76.
- POLI M.A., ANTONINI A.G. 1991. Genetic structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole cattle. Hereditas 115: 177-182.
- POSTIGLIONI A., RINCÓN G., KELLY L., D'ANGELO M., GAGLIARDI R., DE ANDRÉS CARA D. 1998. Caracterización Genética de los Bovinos Criollos del Uruguay. II Estudio de su Variabilidad Genética. Archivos de Zootecnia 47: 225-231.
- POSTIGLIONI A., RINCÓN G., KELLY L., LLAMBÍ S., FERNANDEZ G., D'ANGELO M., GAGLIARDI G., TRUJILLO J., DE BETHENCOURT M., GUEVARA K., CASTELLANO A., ARRUGA M.V. 2002. Biodiversidad Genética en Bovinos Criollos del Uruguay. Análisis con Marcadores Moleculares. Archivos de Zootecnia 51: 195-202.
- PRIMMER C.R., ELLEGREN H., SAINO N., MØLLER A.P. 1996. Directional evolution in germ line microsatellite mutation. Nature Genetics 13: 391-393.
- PRIMMER C.R., AHO T., PIIRONEN J., ESTOUP A., CORNUET J.M., RANTA E. 1999. Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from the Nordic region: implications for conservation. Hereditas 130: 277–89.
- PRIMMER C.R., KOSKINEN M.T., PIIRONEN J. 2000. The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. Proceedings of Royal Society of London B 267: 1699–704.

- PRIMO A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las Américas: Quinientos años después. Archivos de Zootecnia (extra):421-432.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
- QUINTEROS I. R., MULLER A.O., TEJEDOR E.D., GARCIA VALENTI H., BISCHOFF J.R. 1973. Algunos marcadores genéticos en bovinos criollos de Argentina 1. Inmunogenética. Analecta Veterinaria 4 y 5: 1-3.
- QUINTEROS I. R., MILLER W.J., TEJEDOR E.D., POLI M.A., ANTONINI DE RUIZ A.A. 1980. Investigaciones inmunogenéticas en el Bovino Criollo Argentino. Marcadores genéticos. Analecta Veterinaria XII (1-3): 37-60.
- QUINTEROS I. R., MILLER W.J., TEJEDOR E.D., POLI M.A., ANTONINI DE RUIZ A.A., DOMINGUEZ T., BISCHOFF J.R., SAL PAZ F. 1981. Algunas comprobaciones orientadas a estudios relacionados entre marcadores inmunogenéticos y procesos selectivos en Bovino Criollo. Analecta Veterinaria XII (1-3): 95-103.
- QUINTEROS I.R., TEJEDOR E.D., BORTOLOZZI J., HINES H.C., MILLER W. J., POLI M.A., SAL PAZ F. 1983. Segregation of transferrins in creole cattle in Argentina. India Vet. J. 60:93-98.
- RABASA C.E., SAL PAZ A., SAL PAZ F., BERGMANN F., RABASA S.L. 1977. Genética de pelajes en Bovinos Criollos. Mendeliana 1: 81-90.
- RANNALA B., MOUNTAIN J.L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceeding of the National Academy of Science USA 94: 9197-9201.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995a. GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995b. An exact test for population differentiation. Evolution: 49, 1280–1283.
- RICHARDS R.I., SHUTERLAND G.R. 1994. Simple repeat DNA is not replicated simply. Nature Genetics 6:114-116.
- RICHARDSON K.K., CROSBY R.M., GOOD P.J. ROSEN N.L., MAYFIELD J.E. 1986. Bovine DNA contains a single major family of interspersed repetitive sequences. European Journal of Biochemistry 154: 349-354.
- RÍPOLI M.V. 2002. Detección de QTLs (quantitative traits loci) para la producción lechera a través del uso de marcadores genéticos en bovinos criollos argentinos y criollos saavedreños. Su aplicación en programas piloto de selección asistida por marcadores (MAS). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, U.N.L.P., La Plata, Argentina.

- ROEDER K., DEVLIN B., LINDSAY B.G. 1989. Application of maximum likelihood methods to population genetic data for the estimation of individual fertilities. *Biometrics* 45: 363-379.
- RON M., GENIS I., EZRA E., YOFFE O., WELLER J.I., SHANI M. 1992. Mitochondrial DNA polymorphism and determination of effects on economic traits in dairy cattle. *Animal Biotechnology* 3: 201 - 219.
- RON M., Y. BLANC, M. BAND, E. EZRA, and J. 1. WELLER.1996. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implications for Genetic Improvement. *Journal of Dairy Science* 79:676-681.
- RON M., YOFFE O., WELLER J.I. 1993. Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Animal Genetics* 24: 183 - 186.
- ROQUES S., DUCHESNE P., BERNATCHEZ L. 1999. Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redÆsh (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Molecular Ecology* 8: 1703-1017.
- ROUSE J.E. 1977. The Criollo. Spanish in the Americas. University of Oklahoma Press, Norman, pp 303.
- ROUSSET F., RAYMOND M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419.
- SAITOU N, NEI M. 1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- SANCHEZ-BELDA A. 1984. Razas bovinas españolas. Publicaciones de Extensión Agraria: Madrid, España.
- SANTIBÁÑEZ-KOREF M.F. *et al.* 2001. A relationships between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 18: 2119-2123.
- SAUNDERS N.J., JEFFRIES A.C., PEDEN J.F., HOOD D.W., TETTELIN H., RAPPUOLI R., MOXON E.R. 2000. Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* MC58. *Mol. Microbiol.* 37: 207–215.
- SCHONEWALD-COX C.M., CHAMBERS S., MACBRYDE B., THOMAS W. 1983. Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- SCHUG M.D., MACKAY T.F., AQUADRO C.F. 1997. Low mutation rate of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* 15: 99-102.

- SCHUG M.D., WETTERSTRAND K.A., GAUDETTE M.S., LIM R.H., HUTTER C.M., AQUADRO C.F. 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 7: 57-69.
- SCOTLAND R.W. 1992. Cladistic theory. En: *Cladistics: a practical course in systematics*. Forey P.L., Humphries C.J., Kitching I.J., Scotland R.W., Sievert D.J., Williams D.M., Eds., Clarendon Press, Oxford, pp 3-13.
- SHRIVER M.D., JIN L., CHAKRABORTY R., BOERWINKLE L.E. 1993. VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model. *Genetics* 134: 983-993.
- SHRIVER M.D., JIN L., BOERWINKLE E., DEKA R., FERRELL R.E., CHAKRABORTY R. 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution* 12: 914-920.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E., ACKERMANN M.R., GILBERT R.O. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 9225-9229.
- SIBLEY C.G., AHLQUIST J.E. 1990. *Phylogeny and Classification of Birds*. New Haven, CT: Yale University Press.
- SIGUARDOTTIR S., LUNDEN A., ANDERSON L. 1990. Restriction fragment length polymorphism of bovine lysozyme genes. *Animal Genetics* 21: 259-266.
- SIGUARDOTTIR S. 1991. Studies of Class II genes of the Major Histocompatibility Complex in cattle. Swedish University of Agriculture Science, Department of Animal Breeding, Uppsala.
- SLATE J., MARSHALL T., PEMBERTON J. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801-808.
- SLATKIN M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 134: 983-993.
- SMITH G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528-535.
- SMITHIES O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-641.
- SMOUSE P.E., MEAGHER T.R., CRAWFORD A.M. 1991. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF35 locus. *Animal Genetics* 22: 369-379.
- SMOUSE P.E., MEAGHER T.R. 1994. Genetics analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics* 136: 313-322.
- SNEATH P.H.A., SOKAL R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco.
- SOULÉ M.E. 1985. What is Conservation Biology? *BioScience* 35: 727-734.
- SOULÉ M.E., WILCOX B.A. 1980. *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

- STEFFEN P., EGGEN A., DIETZ A.B., WOMACK J.E., STRANZINGER G., FRIES R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsattellites in cattle. *Animal Genetics* 24: 1221-1224.
- SUNNUCKS P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends of Ecology and Evolution* 15: 199-203.
- SUZUKI R., KEMP S.J., TEALE A.J. 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu cattle. *Animal Genetics* 24: 339-343.
- SWARBRICK P.A., DIETZ A.B., WOMACK J.E., ASTON W.P. 1990. Ovine and bovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF46 locus. *Animal Genetics* 23: 182.
- SWITONSKY M. 2002. Molecular genetics in beef cattle breeding: a review. *Animal Science Papers and Reports* 20 (Suppl.1): 7-18.
- TABEL H., GROAT H.J., KRAAY G.J., ASTON W.P. 1990. Genetic polymorphism of complement factor H in cattle. *Animal Genetics* 21: 123-128.
- TAKESAKI N., NEI M. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- TAMBASCO A.J., TROVO J.B., BARBOSA P.P. 1985. Estudo cromossômico de raças naturalizadas de bovinos. XXII Reunion de la Sociedade Brasileira de Zootecnia. Camboriú. Abstract.
- TAUTZ D., RENZ M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- TAUTZ D., TRICK M., DOVER G.A. 1986. Cryptic simplicity in the DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- TAUTZ D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6463-6471.
- TAYLOR A.C., SHERWIN W.B., WAYNE R.K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology* 3: 277- 290.
- TEALE A.J., WAMBUGU J., GWAKISA P.S., STRANZINGER G., BRADLEY D., KEMP S.J.. 1995. A polymorphism in randomly amplified DNA that differentiates the Y chromosomes of *Bos indicus* and *Bos taurus*. *Animal Genetics* 26: 243-248.
- THEILMANN J.L., SKOW L.C., BAKER J.F., WOMACK J.E. 1989. Restriction fragment length polymorphisms for growth hormone, prolactin, osteonectin, cristallin, fibronectin and 21-steroid hydroxylase in cattle. *Animal Genetics* 20: 257 - 266.
- THIBODEAU S.N., BREN G., SCHAID D. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819.

- THOMPSON E.A. 1975. The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics* 39: 173-188.
- TROMMELEN G.J., DEN DAAS J.H.G., VIJG J., UITTERLINDEN A.G. 1993. DNA profiling of cattle using micro- and minisatellites core probes. 24: 235-241.
- TROY C., MACHUGH D.E., BAILEY J.F., MAGEE D.A., LOFTUS R.T, CUNNINGHAM P., CHAMBERLAIN A.T., SYKES B.C., BRADLEY D.G. 2001. Genetic evidence of Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410: 1088-1091.
- USHA A.P., SIMPSON S.P., WILLIAMS J.L. 1995. Probability of random sireexclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics* 26: 155-161.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMI-GOUDARZY K. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* 5: 288-297.
- VALDES A.M., SLATKIN M., FREIMER N.B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the Stepwise Model revisited. *Genetics* 133: 737-749.
- VAN EIJK M.J.T., STEWART-HAYNES J.A., LEWIN H.A. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 23:483-496.
- VIGILANT L., STONEKING M., HARPENDING H., HAWKES K., WILSON A.C. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503-1507.
- WAGNER V., SCHILD T., GELDERMANN H. 1994. DNA variants within the 5-flanking regions of milk protein genes. II. The β -lactoglobulin-encoding gene. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 121.
- 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. *Biotechniques* 10: 506-513.
- WEBER J.L., MAY P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.
- WEBER J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 7: 524-530
- WEBER J.L., WONG C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2:1123-1128.
- WEIR B.S., COCKERHAM C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- WEIR B.S. 1990. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, MA, Sinauer.
- WEIR B.S. 1996. *Genetic data analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- WEISSEMBACH J., GYAPAY G., DIB C., VIGNAL A., MORISSETTE J., MILLASSEAU P., VAYSSEIX G., LATHROP M. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359 : 794-801.
- WENDORF F., SCHILD R. 1994. Are the early holocen cattle in the eastern Sahara domestic or wild? *Evolution Anthopology* 3: 118-128.
- WESTEMEIER R.L., BRAWN J.D., SIMPSON S.A., ESKER T.L., JANSEN R.W., WALK J.W., KERSHNER E.L., BOUZAT J.L., PAIGE K.N. 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* 282:1695-1698.
- WIESTLER O.D., CORNELISSE C.J., DEVILEE P., STRATTON M.R. 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics* 6: 152-156.
- WILKINS J.V., MARTINEZ L., ROJAS F. 1982. El Ganado Vacuno Criollo. CIAT. Santa Cruz (Bolivia). Documento 31.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WIMMERS K., PONSUKSILI S., HARDGE T., VALLE-ZARATE A., MARTHUR P.K. HORST P. 2000. Genetic distinctness of Africa, Asian and South America local chickens. *Animal Genetics* 31: 159-165.
- WOOSTER R., CLETON-JANSEN A.M., COLLINS N., MANGION J., CORNELIS R.S., COOPER C.S., GUSTERSON B.A., PONDER B.A., VON DEIMLING A., WIESTLER O.D., *et al.* 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics* 6:152-156.
- WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- WRIGHT S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- WRIGHT S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- YU Y., NIE L., HE Z.Q., WEN J.K., JIAN C.S., ZHANG Y.P. 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of south China: origin and introgression. *Animal Genetics* 30: 245-250.