

PERFIL GENÉTICO DE LOS EQUINOS NATIVOS DE LOS HUMEDALES DEL ÑEEMBUCU Y SU ÁREA DE INFLUENCIA

Núñez L.^{1,4*}, Castro L.^{1,2}, Ramírez L.¹, Rodríguez I.^{1,3},
Florentín A.⁴, Álvarez R.¹, Martínez O.R.^{1,4}

¹Red CONBIAND Paraguay. *lorenanu89@gmail.com.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción U.N.A.

³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.A.

⁴Dirección General del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, U.N.A.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el perfil genético de los equinos nativos de los humedales del Ñeembucú y su área de influencia, en la Republica del Paraguay. El estudio se realizo a partir de la información molecular derivada de 23 marcadores microsátélites. Se estudio un total de 29 equinos nativos de los cuales 17 pertenecen a la zona de los humedales del Ñeembucú (MBH), 7 a la zona de Paraguari (MAH) y 5 a la zona del Chaco (MCH). Se evaluó diversos parámetros como ser Contenido de Información Polimórfica (PIC) y Número medio de alelos por locus, Heterocigosidad observada (H_o), y esperada (H_e) y equilibrio de Hardy Weinberng de cada población. Se detecto un total de 180 alelos (7,826 alelos por locus). Mayormente los *loci* fueron polimórficos. La variabilidad genética de las poblaciones estudiadas fue estimada mediante la Heterocigosidad Esperada, presentando un valor de 0,788. El número medio de alelos por población fue ligeramente superior en el MBH, sin embargo la población MAH reportó un mayor valor en la Heterocigosis Esperada. Los valores de Heterocigosidad Esperada y Heterocigosidad Observada en las poblaciones MAH, MCH y MBH fueron de 0,811 a 0,801; 0,795 a 0,782 y 0,759 a 0,762 respectivamente. Es posible concluir que los equinos nativos de los humedales del Ñeembucú presentan una elevada variabilidad genética a pesar de ser una muestra pequeña.

Palabras clave: Razas autóctonas; Microsátélites; Biodiversidad; Paraguay.

GENETIC PROFILE OF NATIVE HORSES ÑEEMBUCÚ WETLANDS AND AREA OF INFLUENCE

ABSTRACT

This study aimed to determine the genetic profile of the horses native to wetlands of the Ñeembucú and its area of influence, in the Republic of Paraguay. The study was conducted from the molecular information derived from 23 microsatellite markers. A total of 29 native horses of which 17 belong to the area of wetlands of Ñeembucú (MBH), Paraguari (MAH) zone 7 and 5 to the area of the Chaco (MCH) study. We evaluated various parameters such as contents of polymorphic information (PIC) and number half of alleles per locus, observed heterozygosity (H_o), and expected (H_e) and balance of Hardy Weinberg of each population. A total of 180 alleles (7.826 alleles per locus) were detected. Mostly the loci were polymorphic. The genetic variability of the populations studied was estimated using the expected heterozygosity, presenting a value of 0,788. The mean number of alleles per population was slightly higher in the MBH, however the MAH population reported a higher value in the expected heterozygosity. The values of heterozygosity expected and observed heterozygosity in MAH and MBH, MCH populations were of 0.811 to 0.801; 0,795-0,782 and 0,759-0,762 respectively. It is possible to conclude that native horses of the wetlands in the Ñeembucú present a high genetic variability still being a small sample.

Keywords: Local breeds; Microsatellites; Biodiversity; Paraguay.

INTRODUCCIÓN

Por diversidad genética se entiende la variación de los genes dentro de cada especie. Esto abarca diversidad dentro de la misma población o la variación genética entre poblaciones. Las diferencias genéticas que ocurren naturalmente entre los organismos dentro de las especies se ponen de manifiesto mediante polimorfismos genéticos, los cuales se acumulan hasta que se produce la diversidad entre especies, lo que se denomina diversidad genética. En Paraguay, la agricultura familiar campesina direcciona sus actividades productivas mayormente a satisfacer necesidades propias, mediante los rubros de autoconsumo y renta. En este sentido, la utilización de recursos genéticos proporciona herramientas básicas de sobrevivencia, comercialización y generación de ingresos a los hogares; haciendo uso de animales de granja para la obtención de múltiples beneficios como alimentación, transporte, uso de animales para labrar la tierra y en algunos casos para la fabricación de artesanías. Varias especies de animales forman parte

de estas actividades, especialmente aquellas propias de la zonas o en algunos casos introducidas desde otros lugares y adaptadas a esos ambientes a través de décadas o siglos de crianza. Sin duda estos animales poseen un valor para la subsistencia y para la conservación de la identidad cultural y tradicional de cada región o país. En zonas con limitaciones en la aptitud del uso de la tierra, áreas agroecológicas de menor capacidad se destinan a la cría y uso de equinos, bajo un contexto arraigado a la cultura familiar campesina. Estas áreas, constituidas por los semiáridos y humedales, sumados representan una extensión importante del territorio, donde la adversidad climática y el forraje de calidad media/baja, impulsaron la adaptación de genotipos animales con capacidades a ser criados y producidos hábilmente. Las poblaciones de equinos nativos poseen a menudo rasgos valiosos, como ser: resistencia a enfermedades, gran fertilidad, buenas cualidades maternas, atributos únicos de los productos, longevidad y adaptación a situaciones difíciles y a alimentos de baja calidad, características todas ellas deseables para una agricultura sostenible con bajos insumos. Generalmente los estudios de diversidad genética tienen como objetivo estimar parámetros que permitan analizar la variabilidad genética dentro de una población (Ginja, 2002). Esto se logra a través de: la determinación de las frecuencias alélicas por población y por locus, calcular la Heterocigosidad esperada, también denominada índice de diversidad genética, determinar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos, detectar la estructura de la población. Teniendo en cuenta todo lo expuesto este trabajo tiene por objetivo identificar el perfil genético de los equinos nativos de los humedales del Ñeembucú y su área de influencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El área determinada para el estudio se centro principalmente en los humedales del Ñeembucú y su área de influencia, en la Republica del Paraguay. Los lugares donde se obtuvieron las muestras, fundamentalmente se situaron en el departamento de Ñeembucú (MBH) y en menor grado en el Departamento de Paraguarí (MAH), y Bajo Chaco (MCH). Atendiendo los objetivos del estudio se buscaron animales con características externas del tipo equino nativo. Las características buscadas fueron aquellas orientadas por los pobladores de la zona que conocen al animal como “*Kavaju Pichai*” o “*Kavaju Paraguay*” o “*Kavaju Ñume*” cuyas características fenotípicamente, son coloración variable, miembros largos, crin reducida, cabeza grande y alargada, con orejas cortas, ojos brillantes, la frente larga y ancha, hocico corto y la boca ancha. Cuello fuerte sin ser grueso. El cuerpo debe ser amplio y profundo, la grupa larga y ancha, la cola corta, con una melena muy corta y los genitales, bien formada. Se recogieron 29 muestras de pelos de animales de las tres regiones: Bajo Humedales (N:17), Altos Humedales

(N:7), Chaco (N:5). Una vez que las muestras de pelos de caballos se obtuvieron fueron llevados al Laboratorio de Investigación Aplicada del Servicio de Cría Caballar y Remonta, Córdoba-España, en donde se procedió a la preparación para los análisis genéticos con marcadores microsatélites. Primeramente para la extracción de ADN, fueron seleccionados 3 pelos por muestra del animal para ser colocados en cada microtubo de las plaquetas de análisis. Para ellos se procedió al corte de 3-4 cm desde la raíz (con el bulbo) hacia arriba. Los mismos fueron ubicados en microtubos de una plaqueta. Posteriormente se procedió a la extracción del ADN de la muestra mediante el método de la proteinasa K, para ello se adiciono a cada muestra 100 μ l del Tampón K: 0,372 g de KCl, 0,051g de MgCl₂, 1 ml de Tris-HCl 1 M (pH=8,5), 0,5 ml de Tween 20 y 98 ml de H₂O. Se añadió 100 μ g/ml de proteinasa K justo en el momento en que se utilizó, luego se llevo la placa a un termociclador para continuar el proceso de extracción mediante un programa inicial de 56° durante 45 min y 95° durante 10 min. Los microsatélites se amplificaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron dos reacciones multiplex (Tabla I) para el caso del panel de 13 microsatélites recomendados por la FAO-ISAG para estudios de biodiversidad (FAO, 2011), para reducir el número de reacciones y los costos de experimentos. Cabe destacar que el microsatélite LEX 3 está ligado al cromosoma X y no se utiliza en estudios de diversidad genética por lo que fue excluido de este estudio. Además de ello se utilizo un panel adicional que contiene 11 marcadores microsatélites, (Tabla I) también específicos para trabajos de caracterización para la especie equina. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida del 6 % en un secuenciador automático ABI 377XL y los geles se leyeron usando el software Genescan® v3.2.1. El análisis del tamaño de los fragmentos de ADN se realizo con el programa Genotyper v.2.5; fue utilizado un estándar de tamaño interno para el dimensionamiento de alelos. Los parámetros de diversidad genética, número de alelos por población y marcador, Heterocigosidad Observada (H_o) y Esperada (H_e) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) fueron estimadas usando el programa Microsatellite-Toolkit de Excel (Park, 2001). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) mediante el programa GENEPOP v. 3.1c (Raymond and Rousset, 1995), que aplica el test exacto de Fisher usando el método en cadena de Monte Carlo Markov (Guo and Thompson, 1992).

Tabla I. Microsatelites analizados, secuencias de los primers directo y reverso, rango de los tamaños en pares de bases (bp) y reacciones multiplex (*Markers analysis with the corresponding range of alleles (bp), sequence forward and reverse and multiplex*)

Micro	Rangos	Directo 5'- Secuencia-3'	Reverso 5'-Secuencia-3'	Multiplex
AHT4	138-170	AAC CGC CTG AGC AAG GAA GT	GCT CCC AGA GAG TTT ACC CT	M1
AHT5	128-156	ACG GAC ACA TCC CTG CCT GC	GCA GGC TAA GGA GGC TCA GC	M1
ASB17	89-131	GAG GGC GGT ACC TTT GTA CC	ACC AGT CAG GAT CTC CAC CG	M1
ASB23	179-213	GAG GGC AGC AGG TTG GGA AGG	ACA TCC TGG TCA AAT CAC AGT CC	M1
HMS6	153-171	GAA GCT GCC AGT ATT CAA CCA TTG	CTC CAT CTT GTG AAG TGT AAC TCA	M1
HMS7	167-191	CAG GAA ACT CAT GTT GAT ACC ATC	TGT TGT TGA AAC ATA CCT TGA CTG T	M1
HTG4	127-141	CTA TCT CAG TCT TGA TTG CAG GAC	CTC CCT CCC TCC CTC TGT TCT C	M1
VHL20	89-107	CAAGTCCTCTTACTTGA AGACTGG	AAC TCA GGG AGA ATC TTC CTC AGG	M1
LEX3	194-220	ACA TCT AAC CAG TGC TGA GAC T	AAG AAC TAG AAC CTA CAA CTA GG	M2
HMS3	150-174	CCA ACT CTT TGT CAC ATA ACA AGA	CCA TCC TCA CTT TTT CAC TTT GTT	M2
ASB2	222-256	CAC TAA GTG TCG TTT CAG AAG G	CAC AAC TGA GTT CTC TGA TAG G	M2
HTG10	89-115	CAA TTC CCG CCC CAC CCC CGG CA	TTT TTA TTC TGA TCT GTC ACA TTT	M2
LEX33	193-221	TTT AAT CAA AGG ATT CAG TTG	GGG ACA CTT TCT TTA CTT TC	M2
TKY287	215-245	ATCAGAGAACACCAAG AAGG	TCTCTGCTATAGGTAAGG TC	
TKY294	210-235	GATCTATGTGCTAGCA AACAC	CTAGTGTTTCAGATAGCC TC	
TKY297	215-250	GTCTTTTTGTGCCTCGG TG	TCAGGGGACAGTGGCAG CAG	
TKY301	140-170	AATGGTGGCTAATCAA TGGG	GTGTATGATGCCCTCATC TC	

Tabla I. Cont.

TKY312	90-130	AACCTGGGTTTCTGTTG TTG	GATCCTTCTTTTTATGGC TG
TKY321	175-210	TTGTTGGGTTTAGGTAT GAAGG	GTGTCAATGTGACTTCAA GAAC
TKY325	158-178	ACCTTAACAGCACTTA GAAG	TGGATGAACCATGAATA GTG
TKY333	85-155	CCTTCACTAGCCTTCAA ATG	TTGTGTTTAGACAGTGCT GC
TKY337	170-185	AGCAGGGTTTAATTAC CGAG	TAGATGCTAATGCAGCA CCAG
TKY341	135-160	TATCCAGTCACCCATTT TAC	TTGTGTCAGTACACTCTA TG
TKY343	135-170	TAGTCCCTATTTCTCCT GAG	AAACCCACAGATACTCT AGA
TKY344	75-115	GTGTCCATCAATGGAT GAAG	CTTAAGGCTAAATAATA TCCC
TKY394	230-260	GCATCATCGCCTTGAA GTTG	CCTTTCTGGTTGGTATCC CTG
TKY301	140-170	AATGGTGGCTAATCAA TGGG	GTGTATGATGCCCTCATC TC
TKY312	90-130	AACCTGGGTTTCTGTTG TTG	GATCCTTCTTTTTATGGC TG

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros estadísticos más empleados para cuantificar la variabilidad genética son: porcentaje de *loci* polimórfico, el número medio de alelos por locus, la heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) y el contenido de información polimórfica (PIC) (Aranguren *et al.*, 2002). Se detectaron 180 alelos de los 23 marcadores microsatélites. El número de alelos por locus, varío entre un mínimo de 2 (TKY287) y un máximo de 12 (TKY343) con un promedio de 7,826 alelos por locus. Este valor es ligeramente superior al descrito en caballos chilenos, 7,6 alelos por locus (Paredes *et al.*, 2009), pero inferior a lo encontrado en la raza equina marismeña en la cual se describe con un promedio de 8,24 alelos por locus (Pablo, M., 2012) y en el criollo venezolano con 8,4 alelos por locus (Cothran *et al.*, 2011). El promedio del PIC en este trabajo ha sido 0,7 para un número de alelos (N_a) promedio de 7,8. Se observó una importante variación en cuanto al PIC de los marcadores, en la tabla II se observan dichos valores. Los valores extremos fueron para HTG10 (0,808) y TKY287 (0,305). Algunos marcadores mostraron un

valor elevado aunque su NA fue bajo como HMS7 (0,690) y TKY294 (0,636). En resumen 22 marcadores han resultado altamente informativos con valores superiores de 0.50, y uno solo medianamente informativo con valor entre 0.25 y 0.50.

Tabla II. Numero de alelos, promedios de alelos, contenido de información polimórfica, valores de heterocigosis esperada (He) y heterocigosis observada (Ho) de los 23 marcadores microsatelites utilizados (*Number of alleles, average alleles polymorphic information content, expected heterozygosity values observed of 23 microsatellite markers used*)

Locus	Nº de alelos	Promedio de alelos	PIC	He	Ho
VHL20	10	6,3	0,774	0,860	0,850
HTG4	5	4,3	0,598	0,691	0,801
AHT4	9	6	0,695	0,785	0,690
HMS7	5	4,6	0,690	0,790	0,698
ASB2	10	7,3	0,798	0,882	0,908
ASB17	8	7,3	0,785	0,868	0,979
AHT5	8	5,6	0,725	0,815	0,844
HMS6	6	4	0,549	0,645	0,605
ASB23	6	5	0,682	0,771	0,771
HTG10	10	7,2	0,808	0,891	0,979
HMS3	10	8,3	0,707	0,801	0,842
LEX33	9	5,3	0,626	0,708	0,629
TKY344	6	5	0,619	0,717	0,707
TKY343	12	6,6	0,738	0,821	0,679
TKY321	8	6	0,645	0,727	0,740
TKY287	2	0,6	0,305	0,500	0,500
TKY312	9	6,3	0,698	0,786	0,938
TKY301	6	5,6	0,725	0,816	0,865
TKY297	10	6,6	0,745	0,831	0,816
TKY333	8	6,3	0,765	0,854	0,844
TKY341	8	6,6	0,738	0,829	0,842
TKY325	10	6,3	0,696	0,795	0,650
TKY294	5	4	0,636	0,742	0,602
Promedio	7,8		0,7	0,779	0,773

PIC: Contenido de información polimórfica

Valores similares fueron reportados en los caballos brasileiros pantaneiro en donde el marcador más polimórfico también resulto el HTG10 (0,8324) (Tavares F *et al.*,

2008) sin embargo en los equinos brasileiros Mangalarga Marchador fueron descriptos otros marcadores; el mas informativo fue el ASB3 (0,810) y el menos LEX017 (0,410) (De Assis J *et al.*, 2009). La heterocigosis esperada más alta se observó para el marcador HTG10 con un valor de 0,891 y la más baja para el TKY287 con 0,50 (tabla II). Los valores de heterocigosis observada oscilan entre una máximo de 0,979 para los marcadores ASB17 y HTG10 y un mínimo de 0,500 para el marcador TKY287. Los valores medios de He y Ho son 0,779 y 0,773 respectivamente, valores similares fueron encontrados en razas de caballos del mediterráneo occidental (Marletta *et al.*, 2006) y en el caballo Bardigiano (Stasio *et al.* 2008).

Tabla III. Valores de probabilidad obtenidos en la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (*Probability of value obtained in the proves of hardy weinberg equilibrium*)

Locus	Poblaciones		
	MBH	MAH	MCH
VHL20	0,7934	1,0000	0,7798
HTG4	0,1744	1,0000	1,0000
AHT4	0,8702	0,5334	0,1191
HMS7	0,0283	0,7651	0,2861
ASB2	0,4163	0,3797	1
ASB17	0,0982	0,7123	1,000
AHT5	0,7347	0,8432	0,6986
HMS6	0,1500	0,8208	1,0000
ASB23	0,2934	0,5730	1,0000
HTG10	0,2687	0,7773	1,0000
HMS3	0,9923	1,0000	0,8481
LEX33	0,1981	0,4947	0,1137
TKY344	0,7276	0,0947	1,0000
TKY343	0,4813	0,3170	0,3406
TKY321	1,0000	0,8508	0,6270
TKY287	0	0	0.0000
TKY312	0,6877	1,0000	0,4350
TKY301	0,3986	0,8643	0,8975
TKY297	0,7586	0,1945	1,0000
TKY333	0,5727	0,7988	0,2829
TKY341	0,8181	0,5620	0,4935
TKY325	0,0976	0,0260	0,3031
TKY294	0,1663	1,0000	0,0489

En la tabla III se presentan los valores de probabilidad obtenidos en la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para las combinaciones locus/población. Se resaltan los marcadores que no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). El marcador TKY287 no está en equilibrio en las tres poblaciones y los marcadores HMS7 en la población MBH, TKY325 en el MAH y el TKY294 en el MCH. Llama la atención que las tres poblaciones solo tengan dos marcadores en desequilibrio cuando se tratan de poblaciones muy pequeñas en peligro de extinción. El promedio de alelos en cada población (tabla IV) indica en cierta manera la variabilidad genética de las poblaciones. Oscila entre 4,909 en el MCH y 6,739 en el MAH. En general el valor más alto procede de la población más numerosa y difundida. Otra manera de apreciar la diversidad genética para un determinado panel de marcadores es mediante la proporción de individuos heterocigotos presentes o heterocigosidad. Los valores de Heterocigosidad tanto esperada como observada en las poblaciones paraguayas estuvieron entre 0,759 a 0,811 y 0,762 a 0,801 respectivamente. Estos valores fueron ligeramente superiores a los encontrados en estudios acerca de los caballos españoles celta (Cañón *et al.* 2000), al caballo Bardiagiano (Stasio *et al.*, 2008) y caballos de las retuertas (Vega-Pla *et al.*, 2006). Cabe destacar que la diferencia de heterocigosis de las diferentes razas no fueron muy significativas como las encontradas en caballos llaneros colombianos (Jiménez *et al.*, 2007). Los equinos pertenecientes a la población Mestizos bajo humedal presentaron la mayor diversidad alelica sin embargo su heterocigosis fue el más bajo, lo que es característico de poblaciones aisladas.

Tabla IV. Contenido de información polimórfica, Heterocigosis observada y esperada y número de alelos de las poblaciones nativas (*Polymorphic information content, expected and observed heterozygosity and number of alleles of native populations*)

Población	N	PIC	Ho	He	Na
Mestizo Bajo Humedal	17	0,697	0,762	0,759	6,739
Mestizo Alto Humedal	7	0,718	0,801	0,811	5,773
Mestizo Chaco	5	0,673	0,782	0,795	4,909
Promedio		0,687	0,782	0,788	5,807

N: cantidad de animales, PIC: Contenido de información polimórfica, Ho y He: Heterocigosis observada y esperada, NA: Numero de alelos.

CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación corresponde al primer análisis genético realizado en equinos nativos de los humedales del Ñeembucu y su área de influencia mediante el uso de marcadores de ADN. La mayoría de los marcadores tipificados

resultaron polimórficos, es decir, presentan más de dos alelos posibles en la población de equinos estudiados. Esto significa que la población no se encuentra limitada en su variación genética. La variabilidad global detectada en las tres poblaciones fue elevada y muy similar a la encontrada en diferentes trabajos como el caballo español trotter (Azor P *et al.*, 2007) y los caballos criollos venezolanos (Cothran E *et al.*, 2011). En resumen podríamos concluir que los equinos nativos de los humedales de Ñeembucu presentan una elevada diversidad genética intraracial, similar a otras razas equinas de diferentes partes del mundo y por ello justifica su conservación como recurso genético y cultural de los humedales del Paraguay.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la cooperación de la ITAIPU Binacional, RED CONBIAND Paraguay, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías CONACYT.

BIBLIOGRAFÍA

- AranAranguren-Méndez J A, Gómez M y J Jordana (2002); Potencial de los Microsatélites para la asignación de individuos dentro de raza en poblaciones a ser conservadas. Congreso de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales y III Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. (SERGA & SPREGA). El Arca. 5: 37p.
- Azor, P.J., Valera, M., Gómez, M.D., Goyache, F., Molina, A. 2007a. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genet Mol Biol*, 30: 37-42
- Cañón J, Checa ML, Carleos C, Vega-Pla JL, Vallejo M and Dunner S (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim Genet* 31:39-48.
- Cothran E., Canelon J., Conant E., Juras R. 2011. Genetic analysis of the venezuelan criollo horse. *Genetics and Molecular Research* 10 (4): 2394 – 2403p
- DeAssis J. B., DeLaat D.M., Peixoto M, Bergmann., Fonseca C., Carvalho M. 2009. Genetic diversity and population structure in Brazilian mangalarga marchador horses. *Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1519 – 1524p.
- FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Ginja, C. J. 2002. Identificação de raças bovinas portuguesas a través da utilização de marcadores moleculares. Tesis de Maestría, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
- Jiménez L., Cañón F., Gómez A., Sandoval F., Sanchez C. 2009. Diversidad genética en caballos criollos de vaquería colombianos utilizando marcadores microsatelites. *Memorias Simposio iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogeneticos*. Palmira – Colombia. 637 p.

- Ling, Y.H., Ma, Y.H., Guan, W.J., Cheng, Y.J., Wang, Y.P., Han, J.L., Mang, I., Zhao, Q.J., He, X.H., Pu, Y.B., Fu, B.L., 2010, Evaluation of the genetic diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. *Animal Genetics* 42, 56 –65.
- Marletta, D., Tupac-Yupanqui, I., Bordonaro, S., García, D., Guastella, A. M., Criscione, A., & ... Dunner, S. (2006). Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *Journal Of Animal Breeding & Genetics*, 123(5), 315-325. doi:10.1111/j.1439-0388.2006.00603.x
- Martínez Rubén. 2008. Caracterización genética y morfológica del bovino criollo argentino de origen patagónico. Tesis Doctorado. Dpto Ciencia Animal. Universidad politécnica de Valencia.
- Pablo Montserrat. 2012. Estudio de la diversidad intrarracial de la raza equina marismeña y su contribución a la biodiversidad equina española. Tesis Master. Facultad de Veterinaria. Universidad de Cordoba – España.
- Paredes M., Norambuena M., Molina B. 2009. Diversidad genética de 12 loci microsatélites utilizados en pruebas de paternidad equina en Chile. *Archivos Zootecnia* 58 (221): 111 – 116p
- Park S. D. E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Tesis doctoral, University of Dublin, Dublin.
- Sole M, Gomez M., Valera M., Pelayo R., Azor P. Caracterización genética de las razas equinas autóctonas españolas. Estudio preliminar. Libro de resúmenes. XVI Reunión de mejora genética animal. Ciutatella de Menorca. España. 42p
- Stasio, L. d., Perrotta, G., Blasi, M., & Lisa, C. (2008). Genetic characterization of the Bardigiano horse using microsatellite markers. *Italian Journal Of Animal Science*, 7(2), 243-250.
- Tavares Pires F., Bezerra J., Vega J., Kelly L., Delgado J.V. 2008. Genetic diversity of brazilian pantaneiro horse and relationships among horse breeds. *Pesquisa Agropecuaria brasileira*. V43. N 5. p: 595 – 604
- Vega Pla, J.L., Calderón, J., Rodríguez, Gallardo, P.P., Martínez, A.M., Rico, C., 2006, Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics* 37, 571-578.