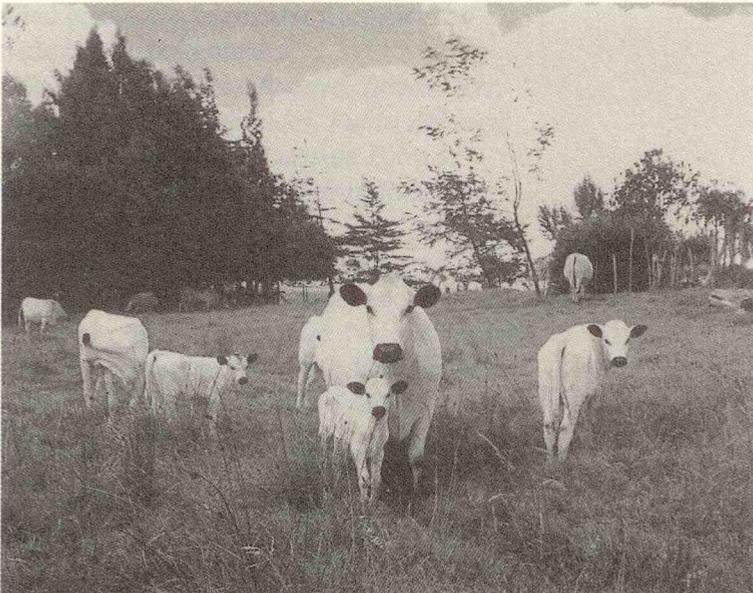
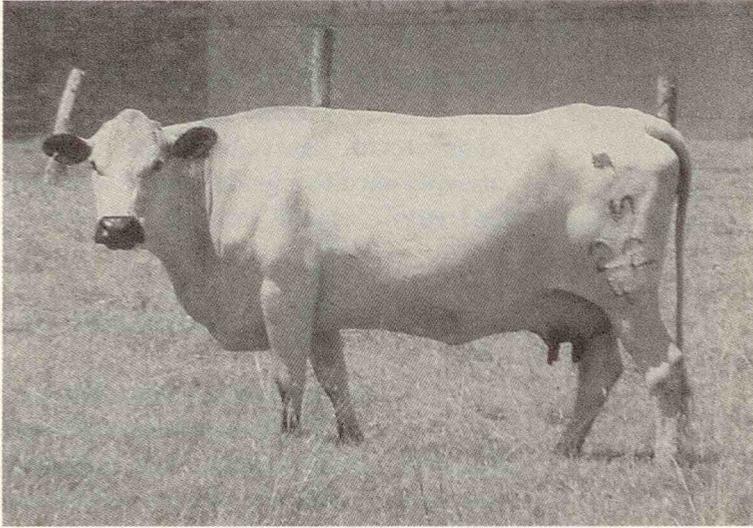


SECCIÓN II

GENÉTICA



Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC)*

Gabriel Bedoya¹, Biol, MSc; Luis G. Carvajal³, Ztc; Nelson R. Bermúdez¹, Ztc; Fernando L. Moreno⁴, Ztc, MSc; María E. Márquez⁵, Biol, MSc; Scott Davies⁶, MV, PhD; James Derr⁶, MV, PhD; Jorge E. Ossa², MV, PhD; y Andrés Ruiz³, MD, PhD.

¹Laboratorio de Genética Molecular, ² Grupo Reproducción-BIOGÉNESIS, Universidad de Antioquia; ³Galton Laboratory, University College London, United Kingdom; ⁴Programa de recursos genéticos animales, Corpoica; ⁵Depto. de Biología, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; ⁶Depto. de Patobiología, University of Texas A&M

Resumen

El ganado criollo colombiano comprende un grupo de razas que se han adaptado por más de 400 años a las condiciones ecoclimáticas de nuestro país, razón por la cual poseen características adaptativas de suma importancia que podrían ser utilizadas de una manera racional en programas de conservación y mejoramiento animal. Lo anterior se podría realizar de manera eficiente si se tuviese un adecuado conocimiento del grado de variabilidad genética de cada una de estas razas, pues este es el parámetro que en última instancia determina el éxito o fracaso de cualquier programa genético. A pesar de la necesidad de este conocimiento, hasta el momento no se ha realizado un estudio coherente y sistemático de este recurso genético. Este trabajo aborda el estudio de la variabilidad genética intrapoblacional e interpoblacional de cada una de las razas criollas colombianas y de la raza Brahman. Para esto, se genotipificaron marcadores microsatélites en estas poblaciones y se estimaron tres

* Artículo publicado originalmente en: Rev Col Cien Pec. Vol. 14: 2, pág. 107-118 / 2001.

índices de variabilidad intrapoblacional; Endogamia (Fis), Heterocigocidad (Ho) y Número promedio de alelos (NPA), y se construyó un árbol de distancias genéticas entre las diferentes razas. Los índices de variabilidad genética encontrados hasta el momento en la población (Fis=0.13, Ho=0.67, NPA=8.8), se pueden calificar entre medios y altos comparado con otras poblaciones en el mundo. Actualmente estamos aumentando el número de loci y de individuos por raza para tener mejores estimados de diversidad genética, relaciones filogenéticas y de posible mestizaje con razas extranjeras.

Palabras clave: *Adaptabilidad, Microsatélites, Relaciones filogenéticas, Variabilidad genética*

Introducción

La necesidad de estudiar la genética de nuestros ganados criollos y la disponibilidad de tecnologías para hacerlo, permitió la realización de este trabajo con el objetivo de aportar un conocimiento fundamental para seleccionar y mapear los genes, o grupos de genes, que gobiernan las características más importantes y, especialmente, para caracterizar estas razas utilizando marcadores moleculares (microsatélites), para determinar algunos parámetros de diversidad genética (nivel de endogamia y de heterocigocidad) y de estructura poblacional, y para la construcción de un árbol de relaciones genéticas.

En el nuevo mundo no existían los bovinos, equinos, búfalos, ovejas, cerdos o gallinas; los únicos animales domésticos del nuevo mundo, antes de la conquista, eran la llama y el cuy (24). Los animales más importantes traídos desde España fueron sin lugar a dudas el equino y el bovino. El primero, fue elemento decisivo de conquista y colonización; el segundo, contribuyó en mayor grado a moldear la civilización y a dar estabilidad al nuevo hombre americano y colombiano en particular (24). Los primeros embarques de vacunos hacia el Nuevo Mundo se remontan al segundo viaje de Colón (1493) con destino hacia la isla de Santo Domingo.

La importación de bovinos y otros animales domésticos a tierra firme, provincia de Santa Marta, fue iniciada por Rodrigo de Bastidas en julio de 1525, con esta se dio origen al primer núcleo ganadero colombiano en la costa Atlántica, el más importante del país desde aquella época (24). Desde allí los ganados viajaron hacia las vertientes del Magdalena y del Cauca y se establecieron núcleos ganaderos en el sur y en el oriente del país.

Todos los ganados criollos colombianos se derivan ancestralmente de las razas primitivas ibéricas traídas por los españoles; especialmente de los linajes de Galicia y Extremadura (24). En los siglos XV y XVI Galicia tenía abundancia de vacunos, la influencia de estos se destaca actualmente en la mayoría de las razas criollas. Actualmente, Colombia cuenta con siete razas bovinas criollas, las cuales están distribuidas por todo el país, de tal manera que al menos una raza está adaptada para cada una de las principales regiones ecológicas. Así, en la costa Atlántica se encuentran el Costeño Con Cuernos y el Romosinuano, en la región Andina el Blanco Orejinegro y el Chino Santandereano, en los valles interandinos (Valle del Cauca) el Hartón del Valle y en los Llanos Orientales y la Amazonía el San Martinero y el Casanareño. La influencia de los ganados blancos y cárdenos de extremadura, o del mediodía español, sólo se refleja en el Blanco Orejinegro (BON).

La importancia del ganado criollo radica en la adaptabilidad lograda durante más de cuatro siglos: en su rusticidad, utilización eficiente de los alimentos bastos y pobres, fertilidad, resistencia y longevidad, entre otras (21, 24).

Para realizar estudios de estructura poblacional, en animales, se pueden utilizar diversos sistemas genéticos con características particulares que permiten inferir algunos parámetros de estructura; tales sistemas son el ADN genómico, el ADN mitocondrial y el cromosoma Y. La utilización de los diferentes sistemas dependerá básicamente del objetivo del estudio; por ejemplo, si se quiere buscar el origen materno de una población lo adecuado es utilizar marcadores del ADN mitocondrial. Es también importante anotar que para estudiar los diferentes sistemas genéticos se pueden utilizar diversos marcadores.

En la actualidad, debido al avance de las técnicas moleculares modernas, se tiene disponibilidad de una gran gama de marcadores genéticos que son utilizados para evaluar directa o indirectamente variaciones en la información genética de individuos y poblaciones, tales como: proteínas, RFLPs (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción), RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar), VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) o minisatélites y los STRs o microsatélites.

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN repetidos en tándem, también conocidos como STRs (Short Tandem Repeats) (15, 11). Su unidad de repetición es una secuencia específica que varía de una a seis bases; los más comunes y utilizados son los di-, tri- y tetranucleótidos, que se repiten en tándem hasta un máximo usual de 60 veces. La variación ocurre en el número de repeticiones dentro del segmento (8). Son marcadores genéticos, con gran capacidad para detectar polimorfismos, que se utilizan para estudios genético-poblacionales. Afortunadamente, a nivel mundial, en el ganado bovino, se tiene una vasta información sobre el aislamiento y utilización de

estos marcadores que han permitido estimar relaciones intra e interespecíficas entre poblaciones muy relacionadas.

La identificación de los diferentes alelos en un locus se realiza por una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) que utiliza cebadores específicos para amplificar secuencias del locus, seguido por una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida o utilizando electroforesis capilar en un analizador automático. Las variantes alélicas tendrán diferente tasa de migración y su tamaño se determinará por comparación con un marcador de peso molecular, de tamaño conocido, que se ha corrido cerca de las muestras problema (25).

Los análisis de genealogías han indicado que los microsatélites son marcadores codominantes altamente polimórficos (50 ó más alelos por locus), que se heredan de manera mendeliana, se distribuyen uniformemente en el genoma, tienen promedios esperados de heterocigocidad por encima del 50%, llegando virtualmente hasta el 100% (11). Debido a esta excepcional variabilidad y a la facilidad en su identificación, los microsatélites son considerados actualmente como los marcadores genéticos más poderosos para estudios poblacionales (11).

El análisis de la estructura poblacional por microsatélites depende principalmente de una estimación correcta de la *tasa y el modelo mutacional* (10, 28, 12). La tasa de mutación es particularmente importante por su papel determinante en el nivel de variabilidad dentro de la población. Esta *tasa* puede ser estimada básicamente por dos métodos: contando directamente las mutaciones en las genealogías o por comparación de los valores teóricos y observados (8). El primer método es el más exacto de todos, pero el más laborioso por el gran número de individuos que se deben tipificar para observar al menos unas pocas mutaciones (8, 16).

Los valores observados en la tasa de mutación varían desde 10^{-5} hasta 10^{-2} mutaciones/gameto/locus/generación (20) esto corresponde a un orden dos o tres veces mayor que la tasa de mutación observada en isoenzimas (15). Generalmente esta alta tasa mutacional se da por adición o sustracción de un pequeño número de repeticiones puras y la mayoría de estas mutaciones, al parecer, son de uno o dos pasos (1, 11). Esta alta tasa mutacional se explica posiblemente porque la ADN polimerasa puede cometer errores durante la replicación (15).

En genética de poblaciones se han utilizado dos modelos clásicos para estudios poblacionales con microsatélites (9): El *modelo de alelos infinitos* (MAI), que también podríamos llamar modelo de alelos continuos, en el cual una mutación puede afectar a uno o varios nucleótidos dando origen a otra variante alélica y el *modelo de mutación paso a paso* (MMPP) o modelo discreto donde una mutación afecta toda la

unidad básica del microsatélite; esto es, aparece o desaparece (con igual probabilidad) un di, tri, o tetranucleótido según el caso.

En general, el *modelo de mutación* paso a paso es el más aceptado para evaluar los microsatélites debido a que, en un alelo creado por una mutación se tendrá cierta certeza de que haya sido generado a partir de un alelo de tamaño próximo, para esto existe una mayor evidencia experimental (2). El *modelo de alelos infinitos* no ha sido muy aceptado debido al tipo de procesos mutacionales que éste asume, los cuales borran la memoria del estado alélico ancestral.

Materiales y métodos

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y en el Departamento de Patobiología Veterinaria de la Universidad de Texas A. & M. (Estados Unidos de América).

Obtención de muestras

Se obtuvieron 40 muestras de sangre en tubos con EDTA, de la vena yugular de individuos no emparentados de la raza BON en un hato de conservación de esta raza. Una vez realizada la toma, se transportaron el mismo día hasta el laboratorio en neveras de icopor con hielo seco, donde se mantuvieron a 4°C hasta el procesamiento de extracción de ADN que se realizó esa misma semana. Además, se tuvieron disponibles 43 muestras más de ADN de las otras 6 razas de ganado criollo suministradas por el centro de investigaciones Tibaitatá de Corpoica en Santa Fe de Bogotá, y 10 de Cebú recogidas en la hacienda Montenegro del Fondo Ganadero de Antioquia en el municipio de La Pintada (Tabla 1). Para el aislamiento del material genético, se siguió la metodología clásica de fenol-cloroformo.

Tabla 1. Número de muestras por raza

Raza	n
BON	40
San Martinero	14
Cebú	10
Chino Santandereano	8
Hartón del Valle	8
Romosinuano	5
Costeño con Cuernos	4
Casanareño	4
Total	93

Amplificación del ADN

Se optimizaron las condiciones iniciales de amplificación, así: 50-100 ng de ADN, 6 ml de buffer TNK 100, 1.2 ml de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) a 5 mM, 1 ml de cada uno de los cebadores (F y R) a 10 mM (ver Tabla 2) para loci de dinucleótidos, una unidad de la polimerasa de ADN del *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasa recombinante), se ajustó con agua bidestilada hasta un volumen de 30 ml. Se cubrió esta mezcla con 20 ml de aceite mineral (este último componente se adicionó cuando el termociclador lo requería, dependiendo de la marca y modelo de la máquina utilizada).

La anterior mezcla de reacción se amplificó en un termociclador bajo las siguientes condiciones térmicas: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30-40 ciclos trifásicos de un minuto de duración en cada una de las temperaturas (94°C, 50-60°C y 72°C), terminando con un ciclo de 5 minutos a 72°C. Las anteriores condiciones térmicas y de reacción estuvieron sujetas a optimización mediante la experimentación en el trabajo de laboratorio.

Una vez terminada esta amplificación, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% a 100 voltios por 30 minutos y se tiñeron con bromuro de etidio, se expuso el gel a luz ultravioleta y se fotografió para evaluar la presencia del amplificado. Para amplificar el ADN se siguieron dos estrategias: la amplificación radioactiva y la amplificación fluorescente.

Amplificación del ADN con radioactividad

Una vez se lograron optimizar las condiciones térmicas y de reacción de la amplificación, se incluyó el marcaje radiactivo con P³² en el extremo 5' uno de los cebadores de la mezcla de reacción. Este marcaje se realizó usando la T₄ polinucleótido quinasa recombinante mediante la siguiente reacción: 2 ml de T₄ quinasa (USB), 1 ml de uno de los cebadores a 10 mM, 1 ml de g³² dATP, 5 ml de buffer 10X y 41 ml de agua bidestilada. La mezcla anterior se colocó a 37°C por 60 minutos y luego a 65°C por 10 minutos. Se utilizaron 5 ml de esta reacción (cebador marcado) para realizar la amplificación radiactiva.

La electroforesis de las muestras se realizó en un gel de poliacrilamida al 6% con úrea a una temperatura de 50°C. Para lograr esto fue necesario realizar un calentamiento del gel antes de servir las muestras y monitorear la temperatura de este durante el corrido. En el gel se colocaron 6 ml de ADN amplificado más 4 ml de buffer carga.

Las muestras se corrieron a 80 watts durante tres a cinco horas dependiendo del tamaño relativo de los fragmentos (reportado en el mapa genético Bishop et al., 1994). Una vez terminado el corrido, el gel se desmontó, se lavó en ácido acético al 10% por 15 minutos para eliminar los excesos de úrea, se fijó en un papel filtro y se cubrió totalmente con plástico muy delgado. Luego el gel se secó con una bomba de vacío y un secador de geles a 80°C por una hora lo cual mejoró la nitidez de las bandas en la autorradiografía.

Una vez secado el gel, se colocó a exposición autorradiográfica en un casete que contenía una película radiográfica y pantalla intensificadora, la cual ayudó a una mejor definición de las bandas radiactivas que corresponde a las regiones genómicas amplificadas o alelos de los individuos del locus estudiado. El tiempo de exposición de la película fue entre 12 y 48 horas y dependió de la vida media del $g^{32}P$ al momento del corrido del gel. Toda la manipulación se realizó en un cuarto oscuro, y la película se sometió a la acción de un revelador y un fijador para observar las bandas que corresponden a los alelos del locus analizado de un individuo dado.

Tabla 2. Información general

Locus	Cromosoma	Secuencia del cebador (5'-3')	Na ²	Ta ³	Tamaño (bp)
BM4513 ⁴	14	F:GCG CAA GTT TCC TCA TGC R:TCA GCA ATT CAG TAC ATC ACC C	10	54	141-161
BMC1222 ⁴	13	F:CCA ATT TTG CAG ATA AGA AAA CA R:CCT TGA GTG TTC CTC CTG AGT	16	56	268-302
BM1225 ⁴	20	F:TTT CTC AAC AGA GGT GTC CAC R:ACC CCT ATC ACC ATG CTC TG	9	54	227-251
MAF70	4	F:CAC GGA GTC ACA AAG AGT CAG ACC R:GCA GGA CTC TAC GGG GCC TTT GC	11	52	121-149
COW9	?	F:GCA CAC AGA TTC TTT ACC AAG TG R:TGG ATG GAG GAA CCT AGC AG	?	52	?

¹Bishop et al. 1994

²Número de alelos reportados en la literatura

³Temperatura de alineamiento

⁴Las amplificaciones se llevaron a cabo en la Universidad de Texas A & M departamento de Patología Veterinaria.

Amplificación fluorescente de ADN

Los cebadores para estudiar los loci BM 4513, BMC 1222 y BM 1225 fueron obtenidos comercialmente y marcados con fluorescencia en extremo 5'. Se evaluaron en condiciones de amplificación similares a las obtenidas durante la optimización de la amplificación radiactiva.

Una vez realizada la amplificación, las muestras se diluyeron en agua destilada (1:15), la anterior dilución se mezcló con formamida y un marcador de peso molecular (que permitió la determinación exacta de su tamaño) en una proporción 1:2:13. Se realizó una electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN con el cual se detectaron los amplificados a través de fluorescencia. La información obtenida se almacenó en el computador y de allí se obtuvieron los genotipos de cada individuo mediante los software Genescan y Genotyper.

Análisis de datos

En los marcadores tipificados por métodos radiactivos (COW 9 y MAF 70) el genotipo de cada individuo se determinó asignando un tamaño relativo dependiendo de la migración relativa de las bandas en el gel de poliacrilamida, así al alelo de menor migración (el de mayor tamaño), se le asignó el valor de 200 pb. Si se visualizaban dos bandas en una misma muestra, el genotipo se consideraba heterocigótico para ese alelo y si sólo se observaba una banda, el genotipo se consideraba homocigótico.

Para los marcadores que se tipificaron por métodos fluorescentes (BM 4513, BMC 1222 y BM 1225) se utilizó un secuenciador automático y a través del programa Genotyper se analizó la información del genotipo de los individuos. Con estos genotipos y con los genotipos obtenidos por métodos radiactivos se procedió a construir una matriz de datos para analizarla en diferentes programas de computador.

Los parámetros para calcular la variabilidad genética intraespecífica fueron la endogamia (Fis) (27), la Heterocigocidad observada (H_o) y el Número Promedio de Alelos (NPA), los cuales se calcularon usando el programa Genepop 3.1. Para calcular la variabilidad genética interespecífica se construyó una matriz de distancias genéticas de Nei utilizando el programa Genetic Data Analysis (GDA), a partir de esta matriz se construyó el árbol de relaciones genéticas por el método de reconstrucción filogenética Neighbor-Joining utilizando el programa Phylip (23).

La ecuación utilizada para el cálculo de la distancia genética corregida de Nei fue la siguiente (23):

$$D = -\text{Log}_e I$$

Donde:

$$I = J_{XY} / (J_X J_Y)^{1/2}; J_X = \sum S X_i^2; J_Y = \sum S Y_i^2; X \text{ y } Y \text{ son frecuencias alélicas}$$

Resultados

Índices generales de variabilidad genética y endogamia en la población analizada: la variabilidad genética intrapoblacional se estimó por dos parámetros diferentes: el número promedio de alelos por locus (NPA) y la heterocigocidad. De otro lado, la endogamia se estimó mediante el Fis, que representa la probabilidad de encontrar dos alelos idénticos por descendencia (con un mismo ancestro) en dos individuos tomados al azar en una población o subpoblación (27).

Número promedio de alelos por locus (NPA): se encontraron en total 44 alelos en los cinco loci estudiados, con un NPA de 8.8, variando entre 6 alelos para el locus menos polimórfico (BM 1225) y 14 alelos para el locus más polimórfico (BMC 1222). Este gran número de alelos, que puede considerarse alto, demuestra la utilidad de estos marcadores para detectar polimorfismo.

En dos de los loci analizados, se encontraron cinco alelos no reportados en el mapa genético bovino (4, 16), estos fueron los alelos 133, 135, 137 y 139 en el locus BM 4153 y el alelo 270 en el locus BMC 1222. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el mapa genético bovino fue construido utilizando individuos representantes de una gran variedad de razas, pero no se incluyeron las razas Españolas y sólo se encuentran algunos representantes de razas cebuinas. Este hallazgo es un aporte adicional para completar el mapa genético bovino existente.

El NPA hallado en este estudio es más alto que el reportado en razas francesas (6.0-7.7) (22), italianas (6.5-8.0) (7) y británicas (3.4-3.8) (18), pero similar al encontrado en razas criollas africanas, cebuinas africanas y cebuinas asiáticas (9.0) (19) y un poco inferior al reportado en las razas criollas españolas (9.95) (3) en donde la intensidad de la selección artificial es menor, comparada con la selección utilizada en razas especializadas europeas. Lo anterior explica la mayor variabilidad genética encontrada en las poblaciones colombianas.

Heterocigocidad: la heterocigocidad observada en el ganado criollo Colombiano fue de 0.67, variando entre 0.5 para el locus BM 1225 y 0.86 para el locus BMC 1222 (Tabla 3). La variación en este parámetro se encontró directamente relacionada con el nivel de polimorfismo detectado en estos loci (número de alelos por locus) siendo mayor en el locus BMC 1222, del cual se esperaban mayores niveles de heterocigocidad.

En este estudio, se muestra la relación directa entre NPA y heterocigocidad en la mayoría de los loci excepto en el locus BM 4513 donde, por el contrario, se detectó un alto número de alelos pero una baja heterocigocidad lo cual se podría explicar por la alta frecuencia de 137 y 139. De esta forma la heterocigocidad no sólo dependió del número de alelos por locus sino también de las frecuencias de éstos.

La heterocigocidad observada en este estudio es más alta que la reportada para razas británicas (0.466, 19), francesas (0.62, 22), cebuinas africanas (0.634, 19), cebuinas asiáticas (0.573 19) y para la raza N'Dama (0.54, 19) y es menor al reportado para razas criollas españolas (0.74, 3). La variabilidad genética medida como heterocigocidad tiende a ser mayor en las razas donde no se ha ejercido una selección artificial intensa.

Endogamia: este parámetro fue medido mediante el Fis (27) el cual fue de 0.132 para toda la población, variando entre 0.0419 para el locus BMC 1222 y 0.1897 para el locus MAF 70 (Tabla 3). A pesar de que el locus más polimórfico fue el que presentó el menor nivel de endogamia, no se observa una relación clara entre polimorfismo y endogamia como la observada con los índices de variabilidad genética.

Tabla 3. Índices de variabilidad genética y endogamia obtenidos en los loci analizados para todas las razas

	BM 4513	BMC 1222	BM 1225	MAF 70	COW 9	Total
Nº alelos/loci	10	14	6	7	7	8.8
Rango alélico	133-161	270-300	241-253	188-200	188-200	
P (H-W)	0.0009±0.0003	0.4803±0.14	0.0171±0.0019	0.599±0.0019	0.599±0.0021	0.0116±0.0009
Fis	0.1699	0.0419	0.1428	0.1333	0.1897	0.132
Nº genotipos	87		22	17	30	199
Ho	0.575	0.86	0.5	0.647	0.63	0.67

No obstante, la prueba exacta de Fisher, para deficiencia de heterocigotos, resultó significativa para los loci con mayor Fis; en el locus MAF 70 no se pudo demostrar una deficiencia estadísticamente significativa de heterocigotos, tal vez debido al bajo número de genotipos disponibles o por otros fenómenos diferentes a la endogamia que puedan estar actuando sobre este locus.

De otro lado, en los tres loci de mayor Fis (BM 4513, BM 1225 y COW 9) se pudo demostrar una desviación del equilibrio H-W debido al déficit de heterocigotos, quizás ocasionado por el efecto de la endogamia más que por otros fenómenos como el aislamiento geográfico, pues los individuos de cada raza analizada provienen independientemente de un mismo hato, es decir, las muestras en cada raza pueden presentar niveles de parentesco entre medios y altos.

Sabiendo que el Fis varía entre cero y uno, siendo cero el mínimo nivel de endogamia y uno el máximo, se puede considerar que un nivel de Fis como el encontrado en este estudio no es un nivel muy alto teniendo en cuenta que la selección hecha por el hombre sobre la especie bovina, en gran parte de los casos, tiende a aumentar este parámetro.

Raza Blanco Orejinegro

En términos generales, la heterocigocidad observada en esta raza no difiere del promedio general observado en toda las razas. El porcentaje de genotipos heterocigóticos encontrados fue del 67%, con el locus BMC 1222 el porcentaje de heterocigocidad fue bastante alto (95%), y con el BM 1225 se detectó el nivel más bajo de heterocigocidad (53%) del total de cinco loci evaluados.

El número total de alelos encontrados - 34 - en los cinco loci evaluados en esta raza, revela un NPA de 6.6, el mayor valor encontrado en este estudio. Este valor pudo haber sido influenciado por el mayor número de genotipos detectados y por el mayor número de loci evaluados. Una correlación positiva similar, entre cantidad de genotipos y NPA, fue demostrada en un estudio con microsatélites en ganado europeo, asiático y africano (19).

El NPA de 6.6 encontrado en la raza BON es el mayor de las razas analizadas en esta investigación y comparado con lo encontrado por Mac Hugh (19), los cuales variaron entre 3.4 para la raza Jersey y 6.2 para la raza Maure; pero es inferior a los valores reportados para la raza Sayaguesa (7.6) y 13.2 para la raza Morucha (3).

El Fis obtenido en la raza BON es un poco inferior (0.115) al encontrado en toda la población analizada (Tabla 4). El locus con el valor más alto en esta raza fue el BM4513, (0.2078), mientras que el locus BMC 1222 mostró el valor más bajo (-0.1108) de todo el estudio.

Para explicar la desviación del equilibrio H-W en este estudio se puede considerar el valor Fis, sin embargo es necesario plantear dos escenarios que pueden contextualizar el papel importante de la endogamia en la desviación de este equilibrio. El primero se refiere a la gran variación del Fis en todas las subpoblaciones teniendo en cuenta el número de loci evaluados; por esto, es necesario aumentar el número de loci en nuevos estudios con miras a disminuir esta variación además de obtener una idea más global del genoma evaluado, lo cual se podría lograr teniendo al menos un marcador por cromosoma.

El segundo tiene que ver con la influencia que pueden tener otros fenómenos evolutivos como la deriva genética y la selección que podrían estar actuando sobre esta raza.

Raza Romosinuano

En esta raza, se encontró el porcentaje más bajo (53%) de genotipos heterocigotos de todas las subpoblaciones analizadas. Los loci BM 4513 y BM 1225 mostraron porcentajes de heterocigocidad muy bajos (40%); en el locus COW 9 se detectaron niveles de heterocigocidad del 75% y el locus BMC 1222 de 60%. Estos últimos valores concuerdan con los niveles de heterocigocidad encontrados en toda la población.

A pesar del bajo número -5- de individuos analizados en esta raza, el valor de heterocigocidad fue obtenido con 4 loci, lo que en cierta forma permite considerar que este valor se aproxima al valor real del genoma de esta subpoblación, ya que se acepta que la variación en la heterocigocidad depende en mayor grado del número de loci que del número de muestras. Por esto, sería conveniente considerar el aumento del número de loci (más que el número de individuos) para futuros estudios de este parámetro.

El NPA, en esta población, fue también bajo (3.75), pero superior al de la raza Casanareño (3.0) de la cual sólo hubo disponibles cuatro genotipos para un solo locus, y al reportado para las razas Jersey (NPA = 3.4), Kerry (NPA = 3.4) y Aberdeen Angus (NPA = 3.7) (19). Sin embargo, es inferior al reportado para las razas de Europea continental, de Asia y de Africa (19, 22, 3). Estos resultados sugieren que la raza Romosinuano es la de menor diversidad alélica respecto a la población de bovinos Colombianos analizados.

Raza San Martinero

El porcentaje de heterocigotos en los loci evaluados en esta raza fue el más alto (73%) y superior al promedio general de heterocigocidad encontrado en toda la población; sin embargo, en los dos loci evaluados no se observaron desviaciones importantes de este promedio. Al igual que lo observado en el resto de la población, el locus BMC 1222 reveló el mayor porcentaje de heterocigotos (75%). El número de genotipos a partir de los cuales se calculó la heterocigocidad para esta raza ($n = 18$) fue muy similar al obtenido en la raza Romosinuano ($n = 19$). Sin embargo, la confiabilidad para la raza San Martinero no es significativa, lo que indica que será necesario obtener un mayor número de muestras en estas razas.

El número total de alelos -10- y el NPA -5- del San Martinero ubica este nivel de diversidad alélica dentro de los niveles medios encontrados en la población. Este promedio es superado sólo por los reportados para tres de 20 razas estudiadas en poblaciones bovinas africanas, asiáticas y europeas (N'Dama = 5.5, Gobra = 5.9, Maure = 6.2) (19) y es inferior a cualquiera de los obtenidos en cinco razas criollas españolas (3), en diez razas francesas (22) y en cuatro razas italianas (7).

El valor de Fis obtenido en esta raza fue el menor de todas las subpoblaciones, lo que coincide con el alto nivel de heterocigocidad observado y también con la no significancia de la prueba para el déficit de heterocigotos; lo cual sugiere que la endogamia no juega un papel importante en esta raza.

Raza Costeño Con Cuernos

En esta raza se detectó un porcentaje de genotipos heterocigotos del 62%. El locus BM 4513 mostró el mayor porcentaje de heterocigotos (0.75) igual que para todas las razas criollas Colombianas. Por el contrario, el locus BMC 1222 mostró el menor porcentaje de heterocigotos (0.5).

Aunque los índices de variabilidad genética son relativamente altos, en particular el NPA (10 alelos diferentes en solo 8 genotipos), el Fis presentó uno de los mayores niveles en la población de ganado criollo, lo cual es contradictorio, ya que se esperaría una correlación negativa entre la variabilidad genética y la endogamia. Para aclarar esta contradicción, sería recomendable aumentar el número de loci.

Raza Chino Santandereano

En esta raza el porcentaje de genotipos heterocigotos fue del 56.3% el cual se puede considerar bajo, lo mismo que el NPA, si es comparado con el resto de las subpoblaciones (Tabla 4). Estos valores de diversidad genética, contrario a la raza Costeño Con Cuernos, presentan la correlación esperada con un alto nivel de endogamia encontrado, siendo este el mayor en las diferentes razas.

La desviación del equilibrio H-W se puede explicar por la influencia del alto nivel de endogamia de la raza, más que por otros fenómenos evolutivos como la deriva genética y la selección, ya que esta raza esta geográficamente muy aislada; sin embargo, no se debe descartar la posible influencia de éstos fenómenos.

Raza Hartón del Valle

En esta raza, el porcentaje de genotipos heterocigotos fue del 70%; superior al promedio general de todas las razas criollas. El locus BMC 1222 mostró el máximo nivel de individuos heterocigotos (1.0), mientras que el locus BM 4513 mostró un nivel medio en este valor (0.625) lo cual está de acuerdo con el promedio observado en toda la población.

En los dos loci evaluados (BM 4513 y BMC 1222) se encontraron 10 alelos diferentes (NPA = 5), esta diversidad alélica podría considerarse alta teniendo en cuenta el bajo número de genotipos. Como ocurre en el Costeño Con Cuernos, esto nos permite suponer que los futuros estudios de esta raza utilizando un mayor número de genotipos podrían revelar altos niveles de diversidad alélica.

El valor de Fis (0.1086) en esta raza fue uno de los más bajos, no se observó desviación significativa del equilibrio H-W pero si un alto valor de Ho (0.7), a pesar de que solamente se pudieron evaluar dos loci.

Raza Casanareño

Los índices de diversidad genética en esta raza fueron los más bajos (Ho = 0.5 y NPA = 3) de todas las razas y el Fis fue de 0.2. Estos valores no son muy concluyentes porque se estimaron a partir del número más bajo de genotipos en todo el estudio. Sin embargo, el NPA se puede considerar aceptable, justamente por el pequeño tamaño de la muestra (n=4).

Raza Cebú

En esta raza el porcentaje de genotipos heterocigotos fue uno de los más altos en todo el estudio (0.733), con heterocigocidades del 100% en dos loci (BM 4513 y BM 1222). Este alto nivel de heterocigocidad está de acuerdo con el encontrado en razas cebuínas africanas (0.634) y cebuínas asiáticas (0.573) (19, 4).

En la raza cebú se encontró un total de 20 alelos y un NPA de 5, siendo este un nivel medio dentro del estudio y superior al encontrado en la mayoría de las razas cebuínas africanas y asiáticas (19). Sin embargo es inferior a los reportados en razas francesas, italianas y criollas españolas (22, 7, 3).

Para esta raza el valor de Fis fue 0.0919, uno de los más bajos de todos los encontrados para las razas del presente estudio, el cual coincide con los altos niveles de diversidad genética.

Tabla 4. Índices de variabilidad genética y de endogamia obtenidos en las diferentes poblaciones

Raza	n ¹	H _o	Fis	P (H-W) ²	NPA ³
Blanco Orejinegro	107	0.6729	0.1148	0.0006±0.0003**	6.6
Romosinuano	19	0.5263	0.1547	0.0496±0.0002*	3.75
San Martinero	18	0.7368	0.0720	0.3977±0.0084	5
Costeño con Cuernos	8	0.6250	0.3181	0.0629±0.0032	5
Chino Santandereano	16	0.563	0.3465	0.0078±0.0009*	4.25
Hatón del Valle	10	0.7	0.1086	0.3156±0.0106	5
Casanereño	4	0.5	0.2000	0.4233±0.0032	3
Cebú	16	0.733	0.0919	0.4015±0.0082	5
TOTAL	199	0.67	0.1326	0.0	8.8

¹: Número de genotipos

²: Desviación del equilibrio H-W (*:desviación significativa,**:desviación altamente significativa)

³: Número promedio de Alelos

Discusión

Esta es la primera aproximación al estudio de las razas bovinas criollas colombianas, no solo a nivel molecular sino también poblacional. En futuras aproximaciones es importante aumentar y homogeneizar la cantidad de información genotípica de las razas.

Tabla 5. Matriz de distancias genéticas del ganado criollo colombiano

	BON	RS	SM	CCC	ChS	HV	Cas	Cebú
BON	0							
RS	0.1787	0						
SM	-0.2119	0.1242	0					
CCC	0.2647	0.2836	0.0600	0				
ChS	0.5420	0.2915	0.2706	-0.0873	0			
HV	-0.0314	-0.1601	-0.1601	-0.1606	-0.18717	0		
Cas	1.6014	1.6061	1.6061	0.0900	0.5177	1.1894	0	
Cebú	1.1730	1.6497	1.6497	0.3619	0.0072	1.2477	0.3209	0

En la Tabla 5 se muestran las distancias genéticas obtenidas en el ganado criollo Colombiano. La Figura 1 muestra la representación gráfica de estas distancias bajo el método de Neighbor-Joining.

Figura 1. Arbol de relaciones genéticas del ganado criollo colombiano



El árbol está conformado por dos grandes grupos. Uno, lo forman la mayoría de las razas criollas, y en el otro se ubican el Cebú y sólo una raza criolla. La separación entre Cebú (*Bos indicus*) y las razas criollas (*Bos taurus*) se debe a que pertenecen a dos subespecies diferentes (Loftus et al. en 1994 propusieron clasificar al ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) como dos subespecies en vez de dos especies diferentes, teniendo en cuenta que el cruce de éstas dos subespecies produce descendencia fértil (17), las cuales divergieron hace aproximadamente 610.000 a 850.000 años (19).

Pinzón E. (1984), reporta dos posibles teorías para la raza Romosinuano. Una, es la *teoría del cruzamiento*, la cual dice que la característica topa de este ganado se originó por cruzamientos entre el Costeño Con Cuernos y el Aberdeen Angus, del cual se introdujeron algunos animales provenientes de hatos de la Sabana de Bogotá (importados originalmente desde Inglaterra) al Valle del Sinú en la década de los veinte. La otra es la *teoría de la mutación* del gen que controla el desarrollo de los cuernos del ganado Costeño Con Cuernos. Los animales mutados para dicha característica fueron seleccionados porque gustaban más en el mercado de Medellín, principal plaza de comercialización, y de esta manera se habría conformado la raza Romosinuano.

La teoría del cruzamiento considera que la cantidad y calidad de la carne del Romosinuano se debe al aporte del Aberdeen Angus; sin embargo, otra explicación que contradice esta teoría es que estas mejoras en la carne pueden atribuirse a la expresión fenotípica bajo condiciones ambientales favorables como las del Valle del río Sinú, consideradas como las tierras más fértiles de Colombia.

La teoría de la mutación a partir del Costeño Con Cuernos es la más aceptada debido a las similitudes morfológicas y de adaptación que presentan ambas razas, similitudes que no se han observado en cruzamientos realizados entre Costeño Con Cuernos y Aberdeen Angus; estos cruzamientos han presentado muy poca adaptación a las condiciones de alta humedad y temperatura del Valle del Sinú (24).

Basados en los últimos trabajos realizados en el locus de desarrollo de los cuernos (26, 6, 13), en donde se ha encontrado que la mutación que confiere la característica topa en diferentes razas de *Bos taurus* está controlada por un mismo locus ubicado en el cromosoma uno, pensamos que otra “teoría” posible es la de la mutación fundacional; esto es, que esta haya llegado con los animales provenientes de España.

Dos elementos mayores apoyan esta propuesta: uno, la presencia de animales topos en otras razas de ganado criollo, siendo muy poco probable que dicha mutación se haya generado a la vez en varias razas. En segundo lugar, la alta conservación que presenta ésta mutación en *Bos taurus*.

Aunque existe alta evidencia de que la raza Costeño Con Cuernos participó de una u otra manera en la formación de la raza Romosinuano, entre estas dos razas existe una considerable distancia en el árbol (Figura 1). Lo cual se puede deber principalmente a la intervención humana, por la realización de cruzamientos con otras razas (mestizaje) o por la selección de los animales, sin cuernos y de buen desarrollo, que exigía el mercado.

A pesar de la alta evidencia de parentesco entre las dos razas costeñas, éstas se ubicaron en posiciones distintas en el árbol. La raza Romosinuano y la Hartón del Valle formaron un grupo, que posteriormente se une a la raza Costeño Con Cuernos; la raza Hartón del Valle presenta una alta similitud morfológica con ambas razas y en esta, al igual que en las dos razas costeñas, la raza Gallega (proveniente de España) tuvo una alta influencia. Por todo lo anterior se podría pensar que la diferenciación entre estas tres razas se ha dado más por intervención humana, en América, que por diferencias en la composición racial de sus ancestros.

Teniendo en cuenta los elementos anteriormente mencionados, con respecto al origen de las razas Romosinuano y Costeño Con Cuernos, sería importante, en trabajos pos-

teriores, estudiar animales de la raza Aberdeen Angus y trabajar con marcadores del cromosoma uno. Estos estudios permitirían observar si efectivamente la raza Aberdeen Angus participó en la formación de la raza Romosinuano y también se tendría una idea más clara sobre el origen real de la mutación que le confiere la característica de topo.

El BON es la raza que difiere morfológicamente en mayor grado del resto de las demás razas criollas debido, tal vez, a que en su formación participaron principalmente los ganados blancos extremeños y del mediodía Español (razas Berrenda y Retinta), mientras que en las demás razas criollas participaron en mayor grado razas de Galicia y Extremadura (24).

De acuerdo a la agrupación de las razas criollas en el árbol, las distancias detectadas no fueron demasiado grandes; este último resultado podría explicarse por el bajo número o tipo de loci evaluados. En un trabajo reciente sobre la estructuración de árboles de relaciones genéticas entre ganado bovino, se encontró que con un número superior a 12 microsátélites podían observarse diferencias más claras y confiables entre las razas (22).

En la formación de la raza San Martinero participaron principalmente los ganados Extremeños y Gallegos (razas Tundaca y Pirenaica), mientras que la raza Gallega fue la que más participó en la formación de las demás razas criollas rojas; razón por la cual la raza San Martinero se ubica más cerca al BON que al resto de las razas criollas rojas.

Otra consideración a tener en cuenta es la participación de los Jesuitas en el desarrollo del San Martinero en los Llanos de San Martín. En los siglos XVII y XVIII esta comunidad religiosa tuvo grandes hatos de ganado San Martinero, los seleccionó y cruzó con nuevos animales importados de España, dentro de los que se reportó la presencia de animales de la raza Retinta, la misma que participó en la formación del BON (24). Esta última evidencia también puede explicar en cierta medida la similitud genética encontrada entre las razas BON y San Martinero en el presente estudio.

La raza criolla que se agrupa con el Cebú es la Casanareño, lo cual podría explicarse por mestizaje con la raza Cebú. Dos consideraciones apoyan esta hipótesis en la raza Casanareño: una, es la falta de un plan de conservación gubernamental lo que no permite tener información precisa sobre la genealogía de los actuales núcleos que son considerados como puros y la otra, porque esta raza se encuentra en una de las regiones del país en donde la producción de carne se ha basado principalmente en razas cebuínas o en cruces con éstas.

La alta tasa de cruzamientos de Cebú con razas criollas se ha reportado desde la entrada del *B. indicus* a los Llanos Orientales en los años cincuenta (24). No se tiene información genealógica de los actuales individuos Casanareños que se consideran morfológicamente puros, por lo tanto, no se tiene una idea clara sobre su grado de pureza. En este sentido, en 1994 Bradley et al, utilizando marcadores del cromosoma Y detectaron la presencia de alelos cebuínos en razas criollas africanas que habían sido catalogadas como puras con un criterio meramente morfológico.

Debido a que en la formación de la raza Chino Santandereano participaron el Costeño Con Cuernos y el Casanareño (24), ésta raza se ubica en una posición intermedia entre sus fundadoras. La posibilidad de que la raza Casanareño sea responsable del mestizaje de la raza Chino Santandereano con Cebú es prácticamente nula, ya que la formación de la raza Chino Santandereano data de la época de la colonia y la entrada del ganado Cebú al país es un mucho más reciente (año de 1940).

Para corroborar o descartar la teoría del mestizaje de Cebú con Casanareño y Chino Santandereano, es necesario realizar estudios con un mayor número de marcadores incluyendo marcadores del cromosoma Y y del ADN mitocondrial y de esta forma detectar la presencia o ausencia de alelos propios de Cebú en estas razas criollas.

En resumen, es necesario corroborar estos resultados aumentando el número de muestras por raza y determinar si los altos índices de variabilidad no son el resultado de la erosión genética con razas foráneas. Si los resultados del presente estudio se sostienen, podríamos concluir, que a aunque se puedan presentar altos índices de endogamia, la variabilidad de los ganados criollos nos permite predecir que existen posibilidades para emprender programas de selección, mejoramiento y cruzamientos selectivos hacia la construcción de una ganadería auténticamente nacional.

Referencias

1. Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW, Rubinsztein DC. Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. En: *Nature Genetics*. Vol. 13. 1996; 390-391.
2. Angers B, Bernatchez L. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. En: *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 14, No. 3, 1997; 230-238.
3. Arranz JJ, Bayon Y, San Primitivo F. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. En: *Animal Genetics*. Vol. 27, 1997; p. 415-419.
4. Bishop, MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL *et al*. A genetic linkage map for cattle. En: *Genetics*. Vol. 136, 1994; 619-639.

5. Bradley DG, MacHugh DE, Loftus RT, Sow RS, Hoste CH *et al.* Zebu-taurine variation in chromosomal DNA: a sensitive assay for introgression in west African trypanotolerant cattle populations. En: *Animal Genetics*. Vol. 25, No. 1, 1994; 7-12.
6. Brenneman RA, Davis SK, Sanders JO, Burns BM, Weeler TC *et al.* The polled locus maps to BTA 1 in a *Bos indicus* x *Bos taurus* cross. En: *Journal of Heredity*. Vol. 87, 1996; 156-161.
7. Ciampolini R, Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, Dillmann C, Mazzati E *et al.* Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle. En: *Journal of Animal Science*. Vol. 73, 1995; 3259-3568.
8. Crawford M, Cuthbertson RP. Mutations in sheep microsatellites. En: *Genome Research*. Vol. 6, 1996; 876-879.
9. Estoup A, Tailliez C, Cornuet JM, Solignac M. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). En: *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 12, 1995; 1074-1084.
10. Garza JC, Slatkin M, Freimer NB. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. En: *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 12, 1995; 594-603.
11. Goldstein DB, Pollock DD. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. En: *Journal of Heredity*. Vol. 88, 1997; 335-342.
12. Goldstein D, Ruiz-Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. En: *Genetics*. Vol. 139, 1995; 463-471.
13. Harlizius B, Tammen I, Eichler K, Eggen A, Hetzel DJ. New markers on bovine chromosome 1 are closely linked to the polled gene in simmental and pinzgauer cattle. En: *Mammalian Genome*. Vol. 8, 1997; 255-257.
14. Hernández G. Utilidad de las razas criollas en explotaciones de carne y doble propósito. En: *Actualidades Técnicas*. Vol. 8, 1992; 1-4.
15. Jarne, Lagoda PJ. Microsatellites, from molecules to population and back. En: *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 11, 1996; 424-429.
16. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS *et al.* A second-generation linkage map of the bovine genome. En: *Genome Research*. Vol. 7, 1997; 235-249.
17. Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Evidence for two independent domestications of cattle. En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 91, No. 3, 1994; 2757-2761.
18. MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). En: *Genetics*. Vol. 146, 1997; 1071-1086.
19. MacHugh DE, Loftus RT, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. En: *Proc. R. Soc. Lond.* Vol. 256, 1994; 25-31.
20. Macaubas C, Jin L, Hallmayer J, Kimura A, Mignot E. The complex mutation pattern of a microsatellite. En: *Genome Research*. Vol. 7, 1997; 635-641.

21. Martínez G. El BON: Ganado criollo blanco orejinegro. En: Actualidades Técnicas. Vol. 6, 1990; 1-3.
22. Moazami-Goudarzi K, Laloe D, Furet JP, Grosclaude F. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. En: Animal Genetics. Vol. 28, 1997; 338-345.
23. Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. 1987. 208-253.
24. Pinzón E. Historia de la ganadería bovina en Colombia .Suplemento ganadero. 1984; 270.
25. Queller DC *et al.* Microsatellites and kinship. En: Trends in Ecology and Evolution. Vol. 8, 1993; 285-288.
26. Schmutz SM, Marquess FL, Berryere TG, Moker JS. DNA marker assisted selection of the polled condition in charolais cattle. En: mammalian Genome. Vol. 6, 1995; 710-713.
27. Weir B S y Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. En: Evolution. Vol. 38, 1984; 1358-1370.
28. Zhivotovski LA y Feldman MW. Microsatellite variability and genetics distances. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 92, 1995; 11549-11552.

Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano *

*Fernando Moreno¹, Gabriel Bedoya⁵, James N. Derr³,
Luis G. Carvajal⁵, Nelson Bermúdez⁵, Fabio N. Zuluaga²,
Jorge E. Ossa², Jesús Berdugo², Luzardo Estrada⁴, José Barrera¹,
Davis Scott³, Andrés Ruiz L.⁵.*

¹Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, las Palmas, Bogotá;

²Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia;

³Veterinary Pathobiology, Texas A & M University, College Station, Texas, USA.

⁴Instituto de Genética, Universidad Nacional, Bogotá;

⁵Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Resumen

La caracterización genética del ganado criollo colombiano (gcc) ha demostrado el valor de estas razas en los sistemas productivos tropicales, lo que ha despertado el interés para desarrollar programas de conservación y multiplicación. Se adelantó un estudio de análisis genético con las siete razas de ganado criollo colombiano, (rgcc): Blanco Orejinegro (BON), Romosinuano (R), Costeño Con Cuernos (CCC), Sanmartinero (SM), Chino Santandereano (Ch), Hartón del Valle (H) y Casanareño (Ca), utilizando el Cebú (C) como control, con el objeto de evaluar su diversidad genética y relaciones filogenéticas. Se usaron 7 microsatélites (STR) para establecer las distancias genéticas amplificadas mediante PCR. El tamaño de los loci se definió

* Artículo publicado originalmente en: Rev CORPOICA Vol. 3: 2, pág.17-25 / 2001.

mediante marcaje con $g^{32}P$ seguido de un pase en geles de poliacrilamida (PAGE) o marcados con fluorescencia y electroforesis capilar. Los datos se analizaron usando los programas Genepop, GDA y Phylip. El número promedio de alelos por locus fue de 8.9 y la heterocigosidad promedio observada fue de 0.52. El árbol filogenético construido con el programa Phylip, empleando la distancia de Nei y el algoritmo de Neighbour-joining, agrupó en dos las gcc. En el grupo uno las razas: BON, SM, R, CCC y H; y en el grupo dos las razas: Ch, Ca y C. Los resultados de evaluación filogenética de las gcc indicaron que existe diversidad genética adecuada en estas razas para programas de mejoramiento genético; sin embargo, se recomienda continuar el estudio con un mayor número de marcadores genéticos.

Palabras claves: Diversidad genética, relaciones filogenéticas, ganado criollo colombiano, genética de poblaciones, marcadores genéticos, microsatélites.

Abstract

Diversity and Phylogenetic Relations of Colombian Creole Cattle

Studies of genetic characterisation of Colombian criollo cattle (gcc) has shown the value of these breeds in tropical production systems; consequently, attention is noticeably growing to develop conservation and multiplication programs. A genetic analysis study was conducted including the seven criollo cattle breeds: Blanco Orejinegro (BON), Romosinuano (R), Costeño Con Cuernos (CCC), Sanmartinero (SM), Chino Santandereano (Ch), Hartón del Valle (H) and Casanareño (C), using Cebu as external control breed, with the purpose to evaluate genetic diversity and phylogenetic relations. Seven microsatellite (STR) were used to detect length variations amplified by the PCR and sized by means of $g^{32}P$, runned in PAGE or tagged with a fluorescent dye and electrophoresis. Data were analysed using Genepop, GDA and Phylip programs. Mean number of alleles by loci were 8.9 and mean heterozygosity was 0.52. The phylogenetic tree developed using Phylip program, the Nei's distance and the neighbour-joining algorithm grouped in two the gcc. Group one included: Bon, SM, R, CCC and H, and the second group included Ch, Ca, C. Results of the phylogenetic relations of gcc showed that these breeds have adequate genetic diversity for breeding programs; however we suggest to carry out studies including higher number of genetic markers.

Key words: Genetic diversity, phylogenetic relationship, Colombian creole cattle, microsatellites, population genetics, genetic markers.

Introducción

Se han estudiado algunas de las características fenotípicas (productivas, reproductivas y de adaptación) en el ganado criollo colombiano (gcc). Estos estudios resaltan su valor en programas sostenibles de carne, leche y/o doble propósito; principalmente a través de cruzamientos con razas especializadas y se ha visto la urgente necesidad de intensificar los programas de conservación y multiplicación de las razas criollas, puesto que el gcc se ha designado como un componente esencial en programas tropicales sostenibles de producción bovina (Arboleda, 1980; Pinzón, 1984; Philipson, 1992; Moreno, 1994; Franco y Mejía, 1996; Pinzón, 1996 a, b; Hernández, 1997 y Arboleda y Cáceres, 1998). Son siete las razas de gcc (rgcc): Romosinuano (R), Costeño Con Cuernos (CCC), Blanco Orejinegro (BON), Sanmartinero (SM), Hartón del Valle (H), Chino Santandereano (Ch) y Casanareño (Ca). Esta cantidad y calidad de razas criollas colocan a Colombia en primer lugar en diversidad bovina en América Latina.

En 1525, durante la conquista, hubo tres entradas de ganado a Colombia: un lote de 200 vacas provenientes de la Española (hoy República Dominicana y Haití), traído por Rodrigo de Bastidas a Santa Marta; en 1542 llegó también a este lugar un pequeño lote traído por Alonso Luis de Lugo de Las Canarias, que parece ser fue el grupo que migró más rápidamente al Nuevo Reino de Granada por el río Magdalena, y en tercer lugar, el ganado proveniente de Venezuela (Pinzón, 1984; CEGA, 1987 y Pinzón, 1996 a, b) se distribuyó por las diversas regiones formando las diferentes razas denominadas en este estudio 'poblaciones'.

La literatura revisada no permite tener una idea clara de cómo se formaron las diferentes rgcc. Sin embargo, de acuerdo con Pinzón (1984), las razas R, SM, Ch y H se derivan directamente del CCC. Con respecto al origen del R existen dos hipótesis: una propone una mutación en el CCC, y otra, una mezcla entre CCC y Angus rojo, pero en cualquiera de los casos, la multiplicación del núcleo fue estimulado por la preferencia por los ganados topes en la Feria de Medellín, hasta cuando entró el Cebú y ocurrió la absorción o introgresión genética que amenazó, inclusive con la extinción de las rgcc. El origen del SM pudo deberse a la mezcla entre CCC y ganados del occidente del país, Casanare y Venezolanos. La raza Ch pudo resultar del cruzamiento de CCC con ganados del oriente (Venezuela) y del sur occidente (Huila y Tolima); la historia del núcleo puro en este caso es más reciente (1965), si se compara con la de las otras razas mencionadas (1935). En cuanto a H, esta raza aparece por una mezcla de CCC con ganados del sur (Perú y Ecuador) (Pinzón, 1984; CEGA, 1987 y Pinzón, 1996b).

El BON es la única de las rgcc de color blanco, las demás varían entre rubias y hoscas (oscuras) con predominio de las diferentes tonalidades de rojo; está localizado en

suelos de ladera como la Ch. Existe literatura extensa acerca del origen del BON, pero su gran mayoría se basa en documentos históricos de la Colonia impregnados con especulaciones. Ramírez (1991) es quien más teorías aporta, pero así como otros autores, concluye que esta raza procede del ganado Berrendo Español. Los primeros núcleos del BON se formaron en los Departamentos de Cauca, Huila y Tolima, lo que contradice la creencia popular que da a Antioquia el privilegio de este evento (Arboleda, 1980; Pinzón, 1984; Franco y Mejía, 1996; Pinzón, 1996a y Arboleda y Cáceres, 1998). La Ca parece ser la más pura de estas razas por su aislamiento natural; sin embargo, el origen tan reciente del hatu puro (1980 es la primera fecha reportada por Banco Ganadero, 1986) la predispone a una mayor introgresión del C, cuyo registro de ingreso a la región fue alrededor de 1950 (Delgado, 1996). Es necesario iniciar un proceso de reconocimiento de las razas criollas colombianas por medio de la genética molecular y de poblaciones, con el fin de dilucidar tanto el origen como la pureza de los núcleos existentes, propósito del presente trabajo.

Materiales y Métodos

Se analizaron 94 muestras de DNA de siete razas criollas y 11 de Cebú: Blanco Orejinegro (BON), Romosinuano (R), Costeño Con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (Ch), Sanmartinero (SM), Casanareño (Ca) y Hartón del Valle (H). Se incluyeron los individuos con el menor grado de parentesco posible de cada raza. La Tabla 1 ilustra la distribución de las muestras por raza; predomina el BON, donde hubo una importante contribución de la Universidad de Antioquia en el muestreo.

Tabla 1. Distribución de muestras de DNA analizadas por raza

RAZA-Nombre resumido-Abreviatura	Número de Muestras
Blanco Orejinegro- BON-B	43
Romosinuano-Romo-R	5
Sanmartinero-SM	26
Costeño con Cuernos-Costeño-CCC	4
Chino Santandereano-Chino-Ch	8
Hartón del Valle-Hartón-H	4
Casanareño-Casanare-Ca	4
Cebú-C	11
Total: 8 razas (1 externa)	105

Para la extracción del DNA se siguió la técnica de fenol descrita por Sambrook, *et al.*, (1989). Los análisis se hicieron por reacción en cadena de las polimerasa, PCR seguida de electroforesis en geles de poliacrilamide desnaturalizante, PAGE, o por fluorescencia. La Tabla 2 presenta los datos de los siete loci seleccionados. Se incluyen: nombre, número del cromosoma en el cual se mapeó, secuencias de los primers, todos en dirección 5'-3', número de alelos, tamaño reportado en pares de bases y referencia de la cual se tomó la información. Se deben resaltar los 16 alelos del locus BMC 1222. En cuanto a condiciones de PCR, se usó un volumen de solución total de 30 μ l que contenían aproximadamente 50 ng de DNA genómico, pero este volumen se modificó a 20 μ l con los primers fluorescentes (BM 1225, BM 4513 y BMC 1222); la concentración final fue similar y en algunos casos fue necesario ajustarla a $MgCl_2$, cuando varió entre 1.5 y 2.5 mM con el fin de mejorar la reacción.

Tabla 2. Loci microsatélites utilizados para la descripción de las razas de ganado bovino criollo colombiano

Locus	Cr. ^a	PCR primers (5'-3')	na ^b	Tamaño(bp)	Ref
BM1225	20	F: TTT CTC AAC AGA GGT GTC CAC R: ACC CCT ATC ACC ATG CTC TG	9	227-251	2
BM4311	6	F: TCC ACT TCT TCC CTC ATC TCC R: GAA GTA TAT GTG TGC CTG GCC	8	100	1
BM4513	14	F: GCG CAA GTT TCC TCA TGC R: TCA GCA ATT CAG TAC ATC ACC C	10	141-161	3
BM6501	7	F: ACT AAT AAG AAA TTC TGC ATG TGT G R: CCA CCA TGA CTC AGA AGT AGT TC	10	100	3
BMC1222	13	F: CCA ATT TTG CAG ATA AGA AAA CA R: CCT TGA GTG TTC CTC CTG AGT	16	268-302	2
COW9	?	F: GCA CAC AGA TTC TTT ACC AAG TG R: TGG ATG GAG GAA CCT AGC AG	?	?	3
MAF70	4	F: CAC GGA GTC ACA AAG AGT CAG ACC R: GCA GGA CTC TAC GGG GCC TTT GC	11	121-149	3

^a Cromosoma, ^b Número de alelos. 1: Estrada *et al.*, 1994, 2: Ma *et al.*, 1996, 3: Bishop *et al.*, 1994. F: Forward, R: Reward.

El proceso se inició con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos así: 94°C durante 30 s; la mejor temperatura de “annealing” por 30 a 45s y 74°C por 15 a 30s se terminó con un ciclo de extensión de 5 min a 72°C. (Estrada *et al.*, 1994). Para determinar si era efectiva la reacción de amplificación, se examinaron los productos amplificados en electroforesis de agarosa al 2%, tiñendo con bromuro de etidio. Se marcó uno de los primers en el extremo 5' con $g^{32}P$ (mediante una reacción estándar con polinucleótido kinasa de T_4), el producto de amplificación

(radioactivo), se resolvió por medio de un gel desnaturalizante de poliacrilamida (PAGE) y su tamaño se calculó corriendo en forma paralela como marcador una escalera de secuencia conocida. La visualización se realizó por medio de autorradiografía, la cual requiere práctica para su interpretación y asignación de genotipos (tipificación).

Se tipificaron tres loci con primers fluorescentes BM 1225, BM 4513 y BMC 1222 en la Universidad de Texas. Las condiciones de amplificación fueron similares a las anteriores pero se utilizó un volumen final de 20 μ l; luego se diluyó la muestra en agua destilada (1:15), se mezcló con 'buffer' (solución tampón) de corrido en relación 1:1 y se sometió a electroforesis capilar en un analizador genético ABI 310, de Perkin Elmer. Este equipo tiene un rayo láser que excita los fluorocromos, con los cuales se ha marcado un 'primer' (oligonucleótido), para cada uno de los loci; a medida que pasan por una ventana en el capilar, y dependiendo de su tamaño el fluorocromo emite una luz visible con un λ específico. El resultado es un pico que genera el computador con un color de acuerdo con el fluorocromo utilizado para marcar el fragmento, esta información es recibida, almacenada y procesada con el programa Genotyper para determinar tamaño del alelo y genotipo para cada uno de los loci. Pueden correrse varios productos (loci) de PCR simultáneamente (multiplex), lo que hace que el trabajo con este equipo sea altamente eficiente.

Resultados y Discusión

La Tabla 3 muestra los datos obtenidos de frecuencias alélicas para el locus BM 4513, debido a que con él se consiguieron resultados para diferente número de muestras en cada una de las poblaciones. Se observa una gran variabilidad dentro y entre razas: Para el BON, por ejemplo, las frecuencias varían de 0.000 a 0.474. El 0 significa ausencia del alelo en la muestra analizada.

Tabla 3. Distribución alélica para el locus microsatélite BM 4513 en las ocho razas criollas colombianas

ALELOS	bp	BON	R	SM	CCC	Ch	H	Ca	Ce
1	133	0.116	0	0	0	0	0	0	0
2	135	0.128	0.100	0.036	0	0.083	0	0	0.250
3	137	0.474	0.500	0.286	0.333	0.333	0.500	0.125	0.250
4	139	0.192	0.100	0.393	0.333	0	0	0	0
5	141	0.026	0.200	0.178	0	0.167	0.333	0	0
6	143	0	0	0.04	0.333	0.167	0.167	0.750	0.250
7	145	0.064	0	0	0	0.250	0	0	0.250
8	147	0	0	0.036	0	0	0	0.125	0
9	159	0	0.100	0.036	0	0	0	0	0

0 Alelo ausente en la muestra utilizada.

Histograma de frecuencias génicas

La Figura 1 presenta el histograma de frecuencias de los diferentes alelos (desde 133 hasta 159 pb) del locus BM 4513 en las ocho razas del estudio y corresponde a los datos de la Tabla 3; este locus se escogió para hacer comparación entre razas debido a que con él se obtuvo información para cada una de ellas; en cambio, con otros loci se presentaron problemas metodológicos como amplificación deficiente, lo cual podría deberse a dificultades en el diseño de los primers. De lo observado se puede concluir, *Primero*: Dentro de la población de *B. taurus* el número de alelos encontrado, en orden decreciente, fue el siguiente: SM (7), BON (6), Ch y R (5), CCC, H y Ca (3); en los tres últimos se analizó un menor número de muestras, por lo tanto, es necesario validar estos resultados aumentando su número. *Segundo*: Las mayores frecuencias obtenidas para un alelo determinado en cada una de las razas fue: BON 137 con 0.47, R 137 con 0.50, SM 139 con 0.40, Ch 137 con 0.36, H 137 con 0.50, Ca 143 con 0.71, CCC presentó tres alelos (137, 139 y 143) con frecuencia similar de 0.33 y C cuatro alelos (137, 139, 143 y 145) con frecuencias similares de 0.25 cada uno. El alelo 145 sólo se detectó con frecuencias de 0.25 en C y en Ch y en BON con 0.06; entonces, si el alelo es un marcador para Cebuínos, su detección en Ch puede implicar mestizaje por su alta frecuencia (0.25) y no puede explicarse por mutación; en cambio en BON, la frecuencia tan baja puede significar la aparición de un alelo nuevo por mutación; el alelo 137 detectado con alta frecuencia en cinco poblaciones incluyendo el C podría ser un marcador del género *Bos*. *Tercero*: Con el análisis únicamente de un locus no se puede definir un solo marcador completamente específico para taurinos; por lo tanto, es necesario hacer análisis de haplotipos multiloci para determinar sus frecuencias preponderantes con el fin de diferenciar las razas cebuínas de las taurinas y en este sentido, es imperativo trabajar con un número de muestras significativas igual para cada una de las poblaciones y en lo posible, aumentar el número de marcadores.

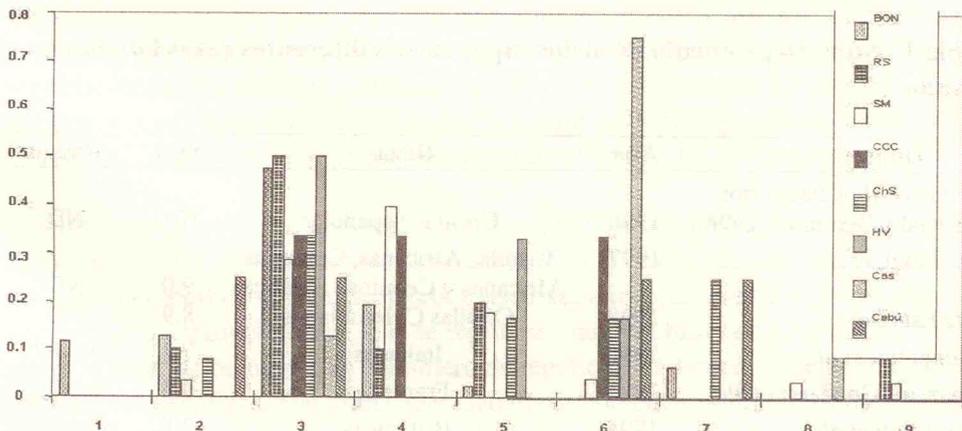


Figura 1. Frecuencias alélicas para el locus BM4513 en las ocho razas del estudio. Mayor número de alelos en SM (7) y BON (6), Ch y R (5). El Alelo 6 (145pb) es un posible indicador de mestizaje en Ch. El Alelo 137 podría ser marcador del género *Bos*.

Número promedio de alelos (npa) por locus

El número de alelos observados en cada locus en el grupo de razas criollas (*Bos taurus taurus*) y Cebú (*Bos taurus indicus*) varió de 5 para el BM 1225 a 13 para el BMC 1222 con un número promedio de alelos por locus (npa) de 8.9, lo cual es indicativo de una buena variabilidad genética, siempre y cuando haya equilibrio entre la deriva y la mutación y se tenga un número aproximadamente igual de muestras por población (Nei, 1987).

Un hallazgo que refuerza el mapa genético bovino (Bishop *et al.*, 1994, Ma *et al.*, 1996 y Kappes *et al.*, 1997) está relacionado con los loci BM 4513 y BMC 1222. En el primero se encontraron cuatro alelos nuevos, no reportados en los mapas mencionados, con 133 a 139 pares de bases y en el segundo se encontró el alelo 270. En la construcción del mapa genético bovino se han utilizado razas comerciales mucho menos polimórficas que las razas criollas, debido a la presión de selección y endogamia de las primeras, resultado de los programas de mejoramiento genético aplicado a dichas razas (Bannikova y Zubareva, 1995). Las razas usadas para la construcción del mapa fueron taurinas europeas y algunas cebuínas; las criollas españolas que servirían de comparación a las criollas colombianas no se incluyeron.

El npa detectado en este trabajo fue más alto que los reportados por Ciampolini *et al.*, (1995) en razas italianas (7.2); Mozami-Goudarzi *et al.*, (1997) en francesas (6.8) y Mac Hugh *et al.*, (1994) en británicas (3.6); prácticamente igual al npa de 9.0 encontrado en razas criollas africanas, cebuínas africana y cebuínas asiáticas (Mac Hugh *et al.*, 1997) y ligeramente más bajo que el 10.0, reportado para razas criollas españolas por Arranz *et al.*, 1996 citados por Carvajal y Bermúdez (1998), (Tabla 4).

Tabla 4. Número promedio de alelos (npa) en seis diferentes razas bovinas en el mundo

Autores	Año	Razas	NPA	Rango
Arranz <i>et al.</i> , Citados por Carvajal y Bermúdez 1998	1996	Criollas Españolas	10.0	ND
Mac Hugh <i>et al.</i> ,	1997	Criollas Africanas, Cebuínas Africanas y Cebuínas Asiáticas	9.0	ND
Este Estudio	1998	Criollas Colombianas	8.9	ND
Ciampolini <i>et al.</i> ,	1995	Italianas	7.2	6.5-8.0
Mozami-Goudarzi <i>et al.</i> ,	1997	Francesas	6.8	6.0-7.7
Mac Hugh <i>et al.</i> ,	1994	Británicas	3.6	3.4-3.8

ND: No disponible.

En SM y BON, las dos razas que presentaron mayor variabilidad, cinco de los siete loci analizados fueron polimórficos, es decir, se detectaron más de dos alelos en cada locus. Dos de los siete no se analizaron en SM. Estos resultados son un buen indicativo del posible repertorio genético que las dos razas tienen como fuente de genoma bovino, el cual puede servir para mejorar razas comerciales con el fin de disminuir la erosión que resulta de la endogamia, producto de los métodos clásicos de selección utilizados en hatos de cría comercial, puesto que las razas bovinas especializadas son mucho menos polimórficas que las razas criollas, debido a que las primeras demuestran endogamia forzosa y a las segundas, por el contrario, se les procura una alta variabilidad con los programas de conservación y con apareamientos dirigidos.

Las razas especializadas se someten a una fuerte presión de selección que solo permite reproducción de los mejores, usualmente parientes cercanos; entonces hay consanguinidad o déficit de heterocigosis lo cual es, en última instancia, lo que se procura con las características de importancia económica normalmente poligénicas (Bannikova & Zubareva, 1995; Warwick & Legates, 1992; Falconer, 1981 y Lasley, 1970). Por su parte, Hernández (1997), en su programación de apareamientos circulares cíclicos para los hatos criollos, propone sólo la monta programada concienzudamente, animal por animal, en varias líneas tan abiertas como sea posible, dependientes de los abuelos paternos no emparentados y utilizando el mayor número posible de reproductores. En conclusión, en cuanto al npa puede decirse que fue lo suficientemente alto (8.9) cuando se tomó toda la población, pero el rango que va de 5 a 13 puede estar indicando que existen razas criollas con mayor variabilidad como por ejemplo SM y BON y razas que la están perdiendo como es el caso de Ca. Lo anterior requiere validación en cuanto a tamaño de la muestra, pero si estos resultados son confirmados, el npa podría ser indicativo de introgresión de la raza C en las criollas puesto que ésta fue una de las poblaciones con menor npa, específicamente 4 alelos para el locus BM 4513.

Heterocigosidad (H_o)

La heterocigosidad media para todos los loci fue 0.52 con rango bastante amplio (de 0.25 a 0.96) y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5. La heterocigosidad observada (H_o) en este estudio es superior a 0.47, y fue hallada por Mac Hugh *et al.*, (1994) para razas británicas, y a 0.50 en búfalos, informada por Barker *et al.*, (1993), (se menciona por ser una especie nativa no mejorada) y es inferior a 0.74, encontrada en algunas razas criollas españolas (Arranz *et al.*, 1996 citados por Carvajal y Bermúdez, 1998), a 0.62 reportada para razas francesas por Moazami-Goudarzi *et al.*, (1997) y a la hallada para razas cebuínas africanas, cebuínas asiáticas y la taurina

africana N'dama con 0.63, 0.57 y 0.54, respectivamente, informadas por Mac Hugh *et al.*, (1997). Como se observa en la Tabla 5, el rango varía ampliamente desde 0.25 para la población Ca hasta 0.96 para SM y está directamente relacionada con el n_{pa} para los loci BM 1225 y BMC 1222; además, coincidió también con lo esperado en el sentido de que se sospechaban más alelos para el locus BMC 1222 (el que mayor número reporta la literatura, 16 alelos, Tabla 2). El valor de H_o de 0.52 posiblemente se deba al poco número de muestras analizado en las poblaciones y presentaron un valor de H_o < 0.50 aquellas razas en las cuales se analizó un menor número de muestras (Ca, H, Ch y R) y la mayor H_o se obtuvo en BON, de la cual se analizó el mayor número de muestras.

Tabla 5. Heterocigosidad encontrada en razas criollas colombianas y en Cebú

POBLACIÓN	He	Ho	F
Blanco Orejinegro	0.77	0.69	0.11
Romosinuano	0.32	0.42	-0.38
Sanmartinero	0.86	0.96	-0.26
Costeño con cuernos	0.84	0.52	0.42
Chino Santandereano	0.79	0.40	0.55
Hartón del Valle	0.73	0.33	0.60
Casanareño	0.46	0.25	0.50
Cebú	0.55	0.54	0.04
PROMEDIO	0.67	0.52	0.28

Los principales factores que disminuyen la heterocigosidad esperada en una población son: endogamia, deriva genética y selección; ésta última no se tuvo en cuenta en este trabajo puesto que se utilizaron marcadores neutros.

Endogamia y Fis

La endogamia se debe a cruces consanguíneos y se puede medir como la frecuencia de individuos homocigóticos, lo cual se conoce tradicionalmente como factor de endogamia (F), dicho factor se puede calcular cuando se analizan pedigríes; en otros casos, la endogamia está definida por el coeficiente de endogamia (Fis) de acuerdo

con Hardy Weinberg y descrito por Hartl (1988) y mide el déficit o exceso de heterocigosis de un individuo teniendo en cuenta el tipo de apareamiento dentro de su población, ya sea éste consanguíneo o panmíctico. El Fis se expresa mediante una fórmula sencilla, así: $Fis = (Hs - Hi) / Hi$; donde Hs es la heterocigosis esperada de un individuo en una subpoblación equivalente a apareamiento al azar y a Hi que es la heterocigosis de un individuo dentro de una subpoblación y puede interpretarse como la heterocigosis promedio de todos los genes de un individuo o como la probabilidad de heterocigosis de cualquier gene.

El Fis hallado en este estudio fue de 0.14 (promedio aritmético simple) y varió de 0.04 para el locus BMC 1222 a 0.19 para el MAF 70. Como se esperaba, el locus más polimórfico y que expresó mayor variabilidad genética fue también el que presentó el menor coeficiente de endogamia. La variación general del Fis fue supremamente alta; por ejemplo, para el BON fue desde -0.15 en el locus BMC 1222 hasta +0.45 en el locus BM 4311. Se observó una tendencia general (no mostrada) a aumentar el Fis cuando n (número de alelos totales observados en el locus) era pequeño; en el caso mencionado, para un Fis de -0.15 correspondió un n de 78 y para + 0.45 n =32.

Cuando el Fis tiende a cero, significa que la población está cerca del equilibrio de Hardy-Weinberg puesto que la Ho es semejante a la heterocigosis esperada (Hi) por individuo; la Hi se calcula por el término del binomio $2pqr$, siendo **p**, **q** y **r** frecuencias alélicas y el cálculo se realiza para todos los loci. Las desviaciones de cero pueden ser positivas o negativas como es el caso de BON para los loci BM 4311 (+0.45) y BMC 1222 (-0.15); un valor negativo significa un aumento en la heterocigosis, lo cual quiere decir que el último locus tiene mayor nivel de heterocigosis en BON que el primero. En conclusión, el análisis con Fis es un buen indicativo de la variabilidad que presentan algunas razas, específicamente BON como se mostró con la medida de los otros parámetros (npa y Ho).

Análisis filogenético

En la Tabla 6 se presentan las distancias genéticas entre las razas taurinas analizadas y la raza externa Cebuina utilizada en el trabajo, que varían de 0.07 para Ch a 1.65 para R; lo anterior significa que Ch está más cerca genéticamente a C y que R sería la raza criolla más alejada del C. No se observa una relación entre el valor de distancia genética con respecto al C, ya que en Ca y CCC se analizaron solamente cuatro individuos, con distancias genéticas de 0.32 y 0.36, respectivamente. Esto puede significar que el número de muestras no está alterando los resultados.

Tabla 6. Matriz de distancias genéticas encontradas en la caracterización de las razas bovinas criollas y colombianas

	BON	R	SM	CCC	Ch	H	Ca	Ce
BON	0							
R	0.1787	0						
SM	-0.2119	0.1242	0					
CCC	0.2647	0.2836	0.0600	0				
Ch	0.5420	0.2915	0.2706	-0.0873	0			
H	-0.0314	-0.1601	-0.0185	-0.1606	-0.1817	0		
Ca	1.6014	1.6061	1.5406	0.0900	0.5177	1.1894	0	
C	1.1730	1.6497	0.6321	0.3619	0.0072	1.2477	0.3209	0

Al comparar las razas taurinas entre sí, la distancia genética varió desde -0.21 entre BON y SM hasta 1.61 entre Ca y R. No hay una explicación lógica cuando se hace referencia a distancias genéticas negativas y sería necesario tomarlas como cero, que significa identidad genética. Para SM todas las distancias fueron negativas; en este caso puede estar influyendo tanto el bajo número de muestras como la diferencia en el número de loci analizados por raza. La Figura 2 representa un árbol filogenético construido a partir de las distancias genéticas representadas en la Tabla 6, utilizando el algoritmo de ‘neighbour-joining’ (Nei, 1987) y las frecuencias alélicas de sólo cinco microsatélites (BM 1225, BM 4513, BMC 1222, COW 9 y MAF 70); no se incluyeron los loci BM 4311 y BM 6501 debido a que éstos sólo se tipificaron para BON y no afectarían para nada el árbol final. Las distancias negativas las toma el Programa como cero, por defecto. El árbol muestra el agrupamiento de cinco razas taurinas en una rama y en la otra, agrupadas con la raza externa Cebuína se encuentra a Ca y Ch, lo cual puede ser indicativo de un mestizaje de estas dos razas con C. En relación a las razas criollas que se agruparon, no parece haber correlación con agrupamiento geográfico: Se esperaría agrupamiento entre CCC y R, lo mismo que entre SM y Ca y lo más notorio es la distancia genética de cero entre BON y SM que se esperaba amplia. Lo anterior, puede significar que el agrupamiento de estas razas sea por origen histórico y no por distribución geográfica, lo cual es necesario corroborar aumentando tanto el número de marcadores como el de muestras por raza. El mestizaje de Ca y Ch con C puede ser debido al manejo de estos dos hatos, ya que los hatos manejados por ICA y Corpoica han sido conservados en cuatro núcleos (BON, R, CCC y SM) en su estado de pureza aparente, por lo menos en lo relacionado con el mestizaje con C e igualmente la Secretaría de Agricultura del Valle ha conservado el H.

Figura 2. Árbol flogenético del ganado criollo colombiano. Agrupación de cinco razas criollas en una rama; posible mestizaje de Ca y Ch con Cebú en la otra rama. Distancias genéticas similares en BON y SM.



Conclusiones y Recomendaciones

- Bajo los parámetros utilizados (siete marcadores y un número variable de muestras por raza) se concluye que hay una adecuada diversidad genética en el gcc.
- Se encontraron cuatro alelos nuevos para el locus BM4513, no reportados en los mapas consultados, con 133 a 139 pares de bases y para el locus BMC1222 el alelo 270.
- Se recomienda continuar este trabajo utilizando más marcadores (se propone uno por cromosoma) y un mayor número de muestras de individuos lo menos emparentados posible por marcador; se podría dilucidar el por qué de la distancia similar para BON y SM con la tipificación de una raza intermedia como la Berrenda Española; la razón del carácter topo del R con estudios de ligamiento al cromosoma 1 en las razas R, CCC y Aberdeen Angus y finalmente, definir el mestizaje de las razas Ca y Ch por medio de estudios del cromosoma Y y/o DNA mitocondrial en ellas y en el C.

Agradecimientos

El autor principal desea dejar constancia de su agradecimiento al doctor Carlos Jaime Tobón Yepes, Coordinador del Grupo Pecuario, Regional Cuatro de Corpoica por el apoyo logístico y científico para la elaboración de este artículo; igualmente al doctor Marco Antonio Suárez Tronco por su importante aporte en la revisión del documento.

Bibliografía

Arboleda, O. 1980. El ganado Blanco Orejinegro. Suplemento Ganadero. Carta Ganadera. Italgraf, Bogotá, Colombia. 1 (1): 42 pp.

Arboleda, U., S. & Cáceres F., A. 1998. Evaluación del comportamiento productivo de la raza Blanco Orejinegro hasta los 18 meses de edad en el Centro de Investigaciones El Nus (1939-1991). Medellín. Tesis (Zootecnistas). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 140 pp.

Banco Ganadero. 1986. Valor genético y productivo de los bovinos criollos. Bogotá, Colombia. 14 pp.

Bannikova, L. V. & Zubareva, L. A. 1995. Genetic Structure of Some Native and Commercial Breeds of Cattle (*Bos taurus*) from Eurasia. Moscow Rus. J. Gen. 31 (5): 597-607.

Barker, J. S. F., Bradley, D. G., Fries, R., Hill, W. G., Nei, M. & Wayne, R. K. 1993. An integrated global programme to establish the genetic relationship among the breeds of each domestic animal species. An. Pr. & Pub. H. Pp 1-32. FAO. Rome.

Bishop, M. D.; Kappes, S. M.; Keele, J. W.; Stone, R. T.; Sunden, S. L. F.; Hawkins, G. A.; Toldo, S. S.; Fries, R.; Grosz, M. D.; Yoo, J. & Beattie, C. W. 1994. A genetic linkage map for cattle. Genetics 136: 619-639.

Carvajal C., L. G. & Bermúdez G., N. 1998. Estimación de la diversidad genética intra e interespecífica de las razas bovinas criollas colombianas. Medellín. Tesis (Zootecnistas). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 75 pp.

CEGA, 1987. Historia de la ganadería en Colombia. Coyuntura Agropecuaria. Bogotá, Colombia. N° 14.

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. J. Anim. Sci. 73: 3259-3268.

Delgado, B., F. A. 1996. Ganado Criollo Casanareño. Plegable de Divulgación. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Económico del Casanare.

- Estrada, J. L.; Ariza, F.; Ossa, J. E.; Ruiz-Linares, A.; Derr, J. N. & Davis, S. K. 1994. Molecular and Population Genetics of Colombian Criollo Cattle; a proposal for research. 29 pp.
- Falconer, D. S. 1981. Introducción a la Genética Cuantitativa. 11ª Imp., Continental, México, México. 430 pp.
- Franco C., C. E. y Mejía, M., A. 1996. Evaluación de algunos caracteres productivos y reproductivos en el ganado Blanco Orejinegro (BON), Cebú y sus cruces en el Centro de Investigaciones El Nus. Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales. 237 pp. Mekan.
- Hartl, D. L. 1988. A Primer of Population Genetics. Sinauer Association, Sunderland, Mass., USA. 304 pp.
- Hernández B., G. 1997. Estrategia de apareamiento para evitar la consanguinidad (inbreeding) en animales. Plegable. Corpoica.
- Lasley, J. F. 1970. Genética del Mejoramiento del Ganado Tradicional. Gustavo Reta, México, México. 378 pp.
- Kappes, S. M.; Keele, J. W.; Stone, R. T.; McGraw, R. A.; Sostengard, T. S.; Smith, T. P. L.; López-Corrales, N. L. & Beattie, C. W. 1997. A Second - Generation Linkage Map of the Bovine Genome. Genome Research, Cold Spring Harbor Lab. Press., 7: 235-249.
- Ma, R. Z.; Beever, J. E.; Da, Y.; Green, C. A.; Russ, I.; Park, C.; Heyen, D. W.; Everts, R. E.; Fisher, S. R.; Overton, K. M.; Teale, A. J.; Kemp, S. J.; Hines, H. C.; Guerin, G. & Lewin, H. A. 1996. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. J. of Heredity. 87: 261-271.
- Machugh, D. E.; Loftus, R. T.; Bradley, D. G.; Sharp, P. M. & Cunningham, P. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. Great Britain. Proc. R. Soc. Lond. 256: 25-31.
- 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.
- Moazami-Goudarzi, K.; Laloe, D.; Furet, J. P. & Grosclaude, F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. Animal Genetics 28: 338-345.
- Moreno O., F. L. 1994. Ganado de doble propósito en El Nus. Corpoica.Regional 4.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. USA.
- Philipson, J. 1992. Genetic resources of cattle. In: The management of global animal resources. FAO, Rome, pp 129-156.
- Pinzón M., E. 1984. Origen de las razas bovinas criollas colombianas. En: Historia de la ganadería bovina en Colombia. Suplemento Ganadero, Carta Ganadera, Italgraf, Bogotá, Colombia. pp 55-103.
- Pinzón M., E. 1996a. Historia de la ganadería en Colombia; Ganado Blanco Orejinegro. Rev. Costa Ganadera 8 (30): 6-10.

Pinzón M., E. 1996b. Historia de la ganadería en Colombia; Ganado Sanmartinero. Rev. Costa Ganadera 8 (28): 6-8, 43.

Ramírez A., B. 1991. Origen del Ganado Blanco Orejinegro. Mekan. Presentado a Asobon. Pereira, Colombia. 28 p.

Sambrook, J.; Fritsche, E. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed Cold Spring Harbor, New York; Cold Harbor Laboratory Press. USA.

Warwick, E. J. & Legates, J. E. 1992. Cría y Mejora del Ganado. 8ed. MC Graw Hill, México, México. 344 p.

Una aproximación al origen genético y grado de mezcla reciente en BON y otras razas de ganado criollo colombiano

Gabriel Bedoya, Erick Hernández, Nelson Bermúdez, Henry Cardona, Constanza Duque, William Arias, Ana V. Valencia, Jorge E. Ossa, Marta Olivera, Luis G. Carvajal, Andrés Ruiz

Grupo de Reproducción, Grupo de Genética Molecular,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Resumen

Se secuenció la región control del DNA mitocondrial en 110 muestras de siete razas de Ganado Criollo Colombiano (GCC) y, de manera sorpresiva, se encontró que el 26% de ellas hacían parte de linajes mitocondriales clasificados como africanos. Esto indica que estas razas tienen introgresión ancestral de ganado africano que debió darse en la península Ibérica antes del descubrimiento de América. Este hallazgo introduce en nuestras razas criollas un valor agregado, pues su genoma debe ser portador de las variantes genéticas que han permitido a las razas africanas su adaptación al trópico; muy especialmente, exponiendo repertorios de resistencia a agentes infecciosos. Lo anterior se hace más notable si se tiene en cuenta que la variabilidad encontrada en el DNA mitocondrial, en GCC, fue mayor que la informada para razas africanas actuales, ya puesto que dicha característica es una medida de adaptación al medio.

También se midió el grado de introgresión cebuina en GCC; para el efecto se utilizaron dos sistemas genéticos: tres marcadores en la región no recombinante del cromosoma Y (INRA124, INRA126 y BM861) y once marcadores STRs autosómicos. Con el primero se encontró que tres de las 6 razas analizadas (Chino Santandereño, Hartón del Valle y Romo Sinuano) tienen machos con cromosoma Y que podrían ser

* Artículo original.

de origen cebuino. El porcentaje de machos con este tipo cromosomas fue de 27% en Chino y Hartón, y 12.5% en Romo Sinuano. Con un análisis exhaustivo donde se cotejaron los datos de Y con los de mezcla, obtenidos con los marcadores autosómicos, se corroboró esta situación para Chino Santanderiano (27%) y para Hartón del Valle y Romosinuano el porcentaje de Y cebuino se determinó en 9 y 0% respectivamente. Esto se hizo teniendo en cuenta el alelo 130 del locus INRA124 como indicador inequívoco de cromosoma Y de origen cebuino. Se sugiere, como criterio para escoger los machos en las razas GCC, el haplotipo del cromosoma Y para los tres marcadores conformado por los alelos 132-184-158, que es específico de taurinos; y el modal en todas las razas. Por último es pertinente resaltar que en la raza BON se encontró el menor grado de mezcla con cebú, independientemente del sistema de análisis utilizado; mientras que, en Costeño con Cuernos se detectó una alta introgresión cebuina restringida al sistema autosómico, lo cual significa que en esta raza los cruces con cebú se han hecho por la vía materna.

Introducción

Uno de los recursos genéticos fundamentales para el desarrollo de un país, son sus razas propias de animales domésticos, las cuales han tenido un proceso de adaptación a las condiciones ecológicas de su territorio. En este sentido, las razas de ganado criollo colombiano (GCC) que fueron introducidas por los españoles durante la época de la conquista, han sufrido un proceso de selección natural que ha permitido la acumulación de caracteres genéticos únicos y de gran valor para su adaptación a las duras condiciones ecoclimáticas de las diferentes regiones del país. Los cambios adaptativos implican principalmente los sistemas reproductivo e inmunológico que conduzcan a una mayor eficacia biológica por un lado y mejor respuesta a los agentes infecciosos del trópico por el otro (Hartl & Clark 1997).

Colombia posee actualmente 7 razas criollas, siendo el país de América con mayor número de razas consideradas autóctonas; las siete se encuentran distribuidas en las cuatro principales regiones ecológicas; es así como en la Costa Atlántica se encuentran, Romosinuano (RS) y Costeño con cuernos (CCC), en los Llanos Orientales San Martinero (SM) y Casanareño (CS), en el Valle de Cauca el Hartón del Valle (HV) y en las zonas de montaña se encuentran el Chino Santandereano (ChS) en los Santanderes y el Blanco Orejinegro (BON) en Antioquia y el Viejo Caldas, esta última raza es la que más se diferencia de las otras en cuanto a sus características fenotípicas.

Hasta mediados del siglo pasado la ganadería del país estaba conformada por GCC, pero la introducción de razas foráneas, taurinas y cebuínas, para mejorar la producción de leche y carne hizo que por los cruces absorbentes se llegara casi a la extinción

y en la actualidad las siete razas solo representan el 1% de la ganadería nacional (Pinzón Martínez 1984). A partir de 1935 se crearon los primeros programas de conservación de las razas de GCC, por parte de instituciones gubernamentales como el ICA y algunas secretarías departamentales de agricultura. La selección de los animales para la constitución de los hatos de conservación se realizó teniendo en cuenta principalmente características fenotípicas y se hizo en un momento en que los cruzamientos absorbentes, principalmente con cebuínos, estaba en toda su intensidad; por lo tanto en los núcleos actuales de GCC es posible que exista genética foránea sobre todo de *Bos indicus*, esto estaría disminuyendo los repertorios adaptativos propios de dicho germoplasma.

Una evidencia del posible mestizaje en GCC se encontró en un primer estudio con marcadores autosómicos tipo microsatélites, en las siete razas de GCC (Carvajal et al 1998, Bedoya y otros 2001, Moreno y otros 2001); se halló un alto grado de variabilidad genética (medida por la heterocigosidad observada que presentó un promedio de 0.6321 siendo la más alta SM con 0.7368). Esto puede ser indicativo de introgresión genética en estas razas como se ha observado en algunas de ganado taurino africano, que tienen alto grado de diversidad genética acompañado de linajes paternos cebuino (cromosoma Y) (MacHugh, Shriver, et al. 1997). En estas razas los procesos de cruzamiento absorbente, por parte de ganado cebuino han seguido un patrón similar al de las razas GCC, donde la introgresión ha sido llevada a cabo, principalmente, por la introducción de machos foráneos en núcleos autóctonos que luego pueden haber aportado animales para crear los hatos de conservación. Una situación similar se observó también en algunos núcleos de ganado africano N'Dama, que fenotípicamente fueron consideradas como puras, pero a diferencia de otras poblaciones de N'Dama, presentaban mayor susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma brucei*, esto fue explicado por la presencia de cromosomas Y cebuínos en dichos núcleos (Bradley, MacHugh, et al. 1994). Por esta razón es importante evaluar la presencia de linajes paternos foráneos en GCC, sobre todo cebuínos, con el fin de identificar los machos que se han de utilizar como reproductores en la conservación de los hatos y en la obtención de mezclas para producción.

Otra explicación de la heterocigosidad detectada en GCC, además del mestizaje temprano, puede ser el mestizaje ancestral si se tiene en cuenta que las razas de GCC fueron traídas por los españoles durante la conquista y existen evidencias de la presencia de haplotipos de DNA Mitocondrial (mtDNA) propios de ganado africano, en ganado europeo; especialmente, en Portugal, se ha encontrado el haplotipo ND4 que es específico de ganado africano, (Cymbron, Loftus, et al. 1999; Loftus, MacHugh, et al. 1994). Además en el ganado ibérico se ha detectado el alelo B del gen que codifica para la albúmina sérica, el cual está ausente en las razas europeas no ibéricas y casi fijado en las africanas (Barker y Manwell, 1980; Kidd et al 1980. Gonzales et al

1987). Por tanto es de esperarse que los linajes africanos encontrados en Portugal y España se puedan encontrar en las razas de GCC.

Para determinar el grado de mestizaje se han propuesto diversas metodologías, que buscan detectar la proporción de genes de dos o más poblaciones ancestrales en una población considerada como producto de mezcla originada a partir de ellas (Chakraborty, 1986; Bertorelle y Excoffier, 1998). La evaluación de mestizaje se puede realizar en tres sistemas de transmisión genética presente en los mamíferos; si se desea evaluar el grado de introgresión genética en una población producida a través de la línea materna, se usan marcadores del mtDNA, y la obtenida línea paterna se evalúa con marcadores en el cromosoma Y. Por otro lado, se puede evaluar el porcentaje total de mezcla aportado por cada población ancestral bajo un modelo específico de mezcla utilizando marcadores autosómicos nucleares, por ejemplo microsatélites STRs (Short Tandem Repeats) que consisten en repeticiones cortas de dos a 6 nucleótidos dispersos en los genomas de los mamíferos. Estos son altamente polimórficos (se presentan muchas variantes alélicas por locus) y se transmiten con la misma frecuencia a machos y hembras. Este tipo de marcadores se han detectado para bovinos en el cromosoma Y y algunos de ellos son además alelo específicos de población (SPAs), estos últimos que permiten diferenciar cromosomas Y de *B. taurus* y *B. indicus*.

Con respecto al mtDNA, se pueden utilizar los denominados haplotipos que son combinaciones de cambios nucleotídicos, generalmente en la secuencia de la región más variable del mtDNA (Región Control, D-Loop, HVR I y II). Con estos haplotipos se forman grupos (haplogrupos) teniendo en cuenta su origen filogenético y con los haplogrupos se puede determinar el origen de una población, con base en la frecuencia de los mismos.

Con este trabajo nos propusimos evaluar el grado de mezcla ancestral que, con razas africanas pudo haberse dado desde antes de su ingreso en América por línea materna en las razas de GCC y, además determinar la mezcla reciente, por línea paterna, que con ganado cebuino pudo darse durante la época de cruces absorbentes que se produjo con la introducción del ganado cebú a Colombia. Todo esto con el fin, en primer lugar de dilucidar la alta diversidad encontrada en GCC y en segundo lugar, implementar una técnica molecular que permita identificar machos puros de GCC para los programas de conservación y mejoramiento.

Para el análisis de matrilineajes (mezcla ancestral) se tomaron las 7 razas identificadas en Colombia como criollas, pero para los patrilineajes (cromosoma Y) y los autosomas STRs (mezcla reciente) se excluyó Casanareño, pues en el trabajo inicial esta fue la población que se agrupó con la población cebú (Bedoya 2001, Carvajal 1998, Moreno.

2001). Para los análisis de mezcla con los marcadores STRs autosómicos se tomaron como ancestrales la taurina Simmental y una cebuina, la Brahman. Con estos datos, además, se pudieron comparar los resultados obtenidos en el primer trabajo con STRs autosómicos, con respecto a los parámetros de estructuración genética de las razas y su grado de heterocigosidad, ya que en el primer caso solo se utilizaron 7 marcadores y una muestra mas pequeña por raza.

Metodología

1 Origen de matrilineajes en GCC

Se partió de 119 muestras de sangre de 19 animales BON, 8 ChS, 19 SM, 4 CS, 21 HV, 19 CCC y 20 RS las cuales se obtuvieron principalmente de los hatos de CORPOICA y de algunas hatos particulares. Se extrajo DNA por medio de un Kit comercial (QIA amp DNA). Se secuenció la región hipervariable I (H RVI) del mtDNA entre las posiciones 15969 y 16324 por el método de terminación de cadena de Sanger 1977, acoplado a PCR y las reacciones de secuencia se resolvieron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3700. Las secuencias se editaron con el programa CHROMAS (Technelyium pty Ltda, Queensland Australia) y se alinearon con GENEDOC (Nicholas and Nicholas 1997). Para el análisis se estimaron los parámetros: diversidad génica (H), número promedio de diferencias por pares (MNDP) y la distancia genética (Fst) por medio del programa ARLEQUIN 2000 (Schneider, Roessli and Excoffier 2000). Se compararon además las secuencias con datos publicados de razas taurinas provenientes de Europa, Africa y Cercano Oriente con el programa NETWORK.

2 Introgresión de patrilinajes

Se extrajo DNA a partir de sangre o semen, facilitados por CORPOICA y otros hatos particulares, por el método de fenol cloroformo. A partir de estas muestras de DNA se amplificaron tres loci STRs en el cromosoma Y, que tienen alelos específicos de *B. indicus* y *B. taurus*, en 12 muestras de BON, 10 de CCC 16 de RS, 11 de ChS 11 de HV, 9 de SM y 20 de la raza cebuina Brahman.

Los tres marcadores fueron INRA124 (DYS6), INRA126 (DYS7) y BM861. En INRA124 se han identificado dos alelos de 130 y 132 pb, el alelo 130 es específico de *Bos indicus* y el 132 lo es de *Bos taurus*. El INRA126 por su parte ha mostrado tres alelos de 182, 184 y 186 pb, de los cuales, el alelo 182 se ha encontrado fijo en

cebuínos y el 184 es el alelo modal en algunas razas taurinas. En el locus BM861 se han logrado amplificar seis alelos, pero en las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* solo se han detectado dos de ellos, uno de 156 pb que es específico de cebuínos y el 158 pb que es específico de taurinos. De esta manera existen haplotipos ancestrales de *Bos taurus* como es el 132-184-158 y para cebuínos 130-182-156. La metodología para la genotipificación consistió en amplificación por PCR utilizando los primers, protocolos de reacción y perfiles térmicos de acuerdo a Edwards et al, 2000. Los tamaños alélicos se determinaron por medio de electroforesis capilar utilizando un ABI 310. Debido a que la variabilidad haplotípica fue muy baja, el análisis de los resultados obtenidos se hizo de manera manual y aplicando la probabilidad de la conversión de un haplotipo en otro teniendo en cuenta la tasas de mutación cuya probabilidad de aumento en tamaño del alelo es mayor que la de disminución.

3 Mezcla autosómica

A partir de 35 muestras sangre de CCC, 23 de HV, 20 de BON, 16 de SM, 23 de RS, 20 de ChS y 53 muestras de la raza cebuína Brahman se extrajo DNA y se tipificaron 11 marcadores STRs (TGLA57, TGLA73, MGTG4B, AGLA293, TGLA48, TGLA263, TGLA53, MGTG7, TGLA227, TGLA126 y TGLA122) situados en diferentes cromosomas del genoma bovino y que han mostrado alto polimorfismo en las poblaciones bovinas donde se han estudiado. La genotipificación se llevo a cabo amplificando por PCR de manera individual y en múltiplex cuando la diferencia en el rango de tamaño lo permitió, los parámetros de reacción y los perfiles térmicos fueron estandarizados en el laboratorio GENMOL teniendo en cuenta los Tm de los iniciadores, los tamaños alélicos se determinaron por electroforesis capilar en ABI 310. El análisis de resultados se realizó utilizando los programas: GENPOP versión 3.1, para calcular frecuencias alélicas y genotípicas, pruebas de equilibrio y, para estimar distancias genéticas; así como para calcular los estadísticos de Wright, PHYLIP 3.5 para generar árboles filogenéticos y ADMIX 2.0, para determinar el grado de mezcla con cebú.

Análisis de Resultados

1 El origen de los matrilineajes en GCC

Con el análisis de los datos obtenidos por el secuenciamiento en mtDNA, debido a que se escribió un artículo que fue sometido a la revista *Genetics*, aquí solamente podemos describir los hallazgos mas relevantes. Las 110 secuencias se agruparon en

29 haplotipos teniendo en cuenta 33 sitios polimórficos, los cuales se nombraron como Col1 a Col29; además se pudieron asignar a 3 (T1, T2 y T3) de los 4 haplogrupos mayores que representan los linajes maternos taurinos de África y Europa, de los cuales el T1 es específico de taurinos del Oriente Cercano, T2 de Europa y T3 es Africano. 29 de las 110 secuencias de GCC pertenecen al T1, 10 al T2 y 71 al T3, lo cual demuestra que un gran porcentaje de los matrilineajes de GCC son de origen africano.

Con las secuencias de GCC, además se estimó y comparó el grado de variabilidad utilizando H y MNPD. Los resultados mostraron que H tiene un rango en GCC de 0.57 en RS a 0.93 en BON con un promedio de 0.88 para GCC, en cuanto al estimador MNPD su rango fue de 1.99 en RS a 4.46 en BON con un promedio de 3.49 la comparación de estos datos mostró que la variabilidad de las razas criollas colombianas a nivel de matrilineajes fue mayor que la que se ha informado para razas europeas y africanas en las cuales se han encontrado valores de MNPD de 1.98 y 1.94, respectivamente, lo cual es casi igual a las razas del Cercano Oriente cuyo valor para el anterior estimador es de 3.77 (Bradley et al. 2000; Troy et al. 2000). Además, la comparación de la variabilidad entre las razas demostró que la diversidad de mtDNA, que fue la mayor en BON, presenta un decrecimiento en el orden BON, ChS, SM, HV, CS, CCC, a RS, que como se dijo este último tiene la menor variabilidad.

La evaluación de la estructuración genética entre las razas de GCC se realizó calculando el estadístico de Wright F_{st} (distancia genética), que tuvo un valor promedio de 0.2, lo cual significa que presentan estructuración alta ya que Wright propone que si dicho valor sobrepasa 0.15 la separación genética es alta (Hartl 1996). Al comparar las distancias genéticas entre las razas de GCC se encontró que las más cercanas entre sí fueron CCC y RS y la que más se diferencia de las otras es BON. Un análisis multidimensional con los valores de F_{st} , relacionando 35 razas del viejo mundo con las de GCC, mostró que las GCC ocupan lugares intermedios entre las de Cercano Oriente, África y Europa; esto se debe a las diferencias en la frecuencia de los haplogrupos T1, T2 y T3 teniendo SM la frecuencia de T3 más alta (0.89) y HV la menor (0.33); además, cuando se construyó una red de relaciones filogenéticas con los haplotipos Col y los modales para razas europeas y africanas, los haplotipos Col se agruparon en tres categorías correspondientes a los haplogrupos T1, T2 y T3 y en el centro del T3 se localizó la secuencia Col1, que es la más frecuente en GCC y la secuencia modal de ganado europeo; es decir, tanto en las razas colombianas como en las europeas existen haplotipos mitocondriales que pertenecen al haplogrupo más común en razas africanas. Por otra parte, las secuencias GCC pertenecientes a T1 se localizan de manera dispersa en la red, lo cual demuestra la mayor variabilidad del mtDNA en GCC con respecto a África y Europa. Con estos resultados podemos concluir que las razas de GCC son una mezcla de ganado europeo y africano, que

debió ocurrir en España antes de la conquista de América; que su diversidad en matrilineajes es mayor que la de ganado africano y europeo y que presentan estructuración genética entre sí, lo cual hace de estos germoplasmas una fuente muy poderosa de rasgos adaptativos, tales como resistencia a agentes infecciosos.

2 Patrilineajes de *Bos indicus* en GCC

En la tabla 1 se presentan los datos obtenidos de la genotipificación de los 3 marcadores en la región no recombinante del cromosoma Y.

Tabla 1: Marcadores del cromosoma Y.

RAZA	Nº de animales	INRA124	INRA126	BM861	FRECUENCIA
BON	12	132	184	158	1.0000
CCC	10	132	184	158	1.0000
ROMO	13	132	184	158	0.8125
	1	132	182	156	0.0625
	1	132	184	156	0.0625
	1	132	182	158	0.0625
ChS	8	132	184	158	0.7270
	1	130	184	158	0.0910
	2	130	184	156	0.1820
HV	8	132	184	158	0.7270
	2	132	184	156	0.1820
	1	130	184	158	0.0910
SM	9	132	184	158	1.0000
CEBU	2	132	182	156	0.1000
	1	130	184	158	0.0500
	1	130	184	156	0.0500
	16	130	182	156	0.8000

Se encontraron 6 haplotipos diferentes: 132 184 158 (Coly1); 132 182 156 (Coly2); 132 184 156 (Coly3); 130 184 156 (Coly4); 130 184 158 (Coly5) y 132 182 158 (Coly6). En total se detectaron 4 alelos, de los 5 reportados para los 3 loci (no se encontró el 186 en el locus INRA126), la frecuencia más alta (0.89) en las 6 razas GCC, fue para el Haplotipo Coly1, el cual ha sido reportado como modal en razas taurinas europeas con 0.67 (Edwards et al. 2000).

Con respecto al haplotipo Coly2, encontrado en la población RS no se puede concluir, categóricamente, que sea cebuino a pesar de haberlo encontrado también en la población de Brahman ya que en la creación de esta última se utilizó la raza taurina Hereford; además el alelo 132 del locus INRA124 es específico de taurinos, así como el 130 lo es para *Bos indicus* (Hanotte et al. 2000) y los alelos 182 y 184 del locus INRA 126 se han encontrado en una frecuencia de 0.17 cada uno, en razas europeas. Sin embargo, si se tiene en cuenta la tasa de mutación en los microsátelites que aumentan con mayor probabilidad de menor a mayor tamaño (Rubinsztein et al, 1995), para pasar del haplotipo cebuino 130 182 156 al haplotipo Coly2 se requiere un solo paso de mutación, lo cual aumenta la probabilidad de que este haplotipo tenga origen cebuino.

En cuanto al haplotipo Coly3 encontrado en las razas RS y HV, y que no se presenta en la raza Brahman, si se hace el mismo análisis anterior tiene mayor probabilidad de ser taurino ya que si fuera de origen cebuino se requerirían dos pasos de mutación, así: que el alelo 130 en INRA124 pase a 132 y además que el alelo 182 de INRA126 pase a 184; en cambio, si su origen es taurino requeriría solo un paso de mutación consistente en que el alelo 158 de BM861 pase a 156, lo cual es más probable aunque se de disminución del tamaño.

El haplotipo Coly4 encontrado en ChS y en la raza Brahman tiene la máxima probabilidad de ser de origen cebuino puesto que sólo se requiere un paso de mutación (que el alelo 182 de INRA126 pase a 184). Con respecto a Coly5 detectado en las razas HV, ChS y Brahman tiene mayor probabilidad de ser taurino puesto que requiere solo un paso de mutación si tiene dicho origen consistente en que el alelo 132 de INRA124 pase a 130.

Finalmente, el haplotipo Coly6 es un haplotipo encontrado en razas taurinas con una frecuencia de 14%. Con este tipo de análisis tendríamos que de los cuatro haplotipos detectados en GCC diferentes a Coly1, que es el modal en taurinos, solamente Coly2 y Coly4 tendrían origen cebuino, confirmado además por encontrarse en la raza Brahman y de esta manera solamente las razas RS y ChS tendrían patrilinajes cebuinos con una frecuencia de 6% y 18% respectivamente, en cambio la raza Brahman tendría un porcentaje de 5% de mezcla taurina, que es el porcentaje del haplotipo Coly5 encontrado en dicha raza y en el GCC el porcentaje total de introgresión cebuina sería de un 4.3%. Por otro lado, si se hace el análisis sin tener en cuenta el locus INRA126, que como se dijo antes, en taurinos se puede encontrar tanto el alelo 182 como el 184, los resultados del análisis de introgresión por línea paterna pueden cambiar puesto que el número de haplotipos no taurinos encontrados en GCC disminuye a tres (132-156) C1, (130-158) C2, (130-156) C3 con mayor probabilidad de ser cebuinos. El primero con un solo cambio en el locus INRA124, el segundo con un cambio igual en el BM861 y el tercero sería netamente cebuino ancestral. De esta manera las proporciones de introgresión cebuina en GCC serían de 12% en RS y 27% en ChS y HV; sin embargo, con este análisis la raza Brahman no tendría mezcla con taurinos a

nivel de patrilinajes lo cual puede estar en contradicción con respecto a su creación, ya que como se dijo anteriormente, para la formación de esta raza se utilizó la taurina Hereford. Además, el grado de introgresión total en GCC se incrementaría casi tres veces, puesto que con este tipo de análisis sería del 12%. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió determinar el grado de mezcla autosómica utilizando 11 marcadores microsatélites y determinar con cuál de los dos métodos anteriores, dicho tipo de mezcla, presentaba mejor correlación

El cálculo de variabilidad genética de los patrilinajes en GCC, nos muestra que para las razas SM, BON y CCC es de 0, puesto que en ellas el Haplotipo Coly 1 se encontró en un 100%, la raza RS presenta 4 haplotipos Coly1 (0.8125), Coly2 (0.0625), Coly3 (0.0625) y Coly6 (0.0625) lo cual da una variabilidad de 0.33 (heterocigocidad virtual H, calculada con la fórmula $H=1-p$ donde p es la probabilidad de obtener dos haplotipos iguales tomados al azar), en la ChS se identificaron 3 haplotipos Coly1 (0.73), Coly4 (0.182) y Coly5 (0.088) para una variabilidad de 0.36, que puede ser debida enteramente a la mezcla con Cebú; en HV se detectaron 3 haplotipos Coly1 (0.73), Coly 4 (0.182) y Coly 5 (0.088) lo cual da una variabilidad igual a la de ChS de 0.36, pero a diferencia de esta, es debida tanto a *Bos taurus* como a Cebú. Como puede apreciarse la diversidad genética de los patrilinajes es muy baja comparada con la encontrada con mtDNA, lo cual es de esperarse en ganado por la manera en que se hacen los cruces, ya que un macho reproductor se cruza con muchas hembras y esto produce un efecto de deriva en los cromosomas Y, mayor que la observada para las mitocondrias; por tanto la estructuración genética calculada con estos marcadores es mínima, pues para las razas RS, BON y CCC el F_{st} es de 0, lo cual no concuerda con lo encontrado con mtDNA.

En la población de Brahman la cual se tomó de 4 fincas separadas geográficamente (Suroeste antioqueño, Magdalena Medio, Urabá, y Caucasia) se encontraron 4 haplotipos, 130 182 156 (0.8) el cual es específico de cebuínos, Coly2 (0.1), Coly4 (0.05) y coly5 (0.05). Como hemos considerado con el primer análisis que Coly 2 es cebuino, la introgresión de *Bos taurus* en Brahman es de sólo 5% que es el porcentaje de haplotipo Coly5 en ella considerado taurino, en cambio con el segundo tipo de análisis en dicha raza no existirían patrilinajes taurinos y la variabilidad del cromosoma Y en ella sería de 0.345 muy semejante a la encontrada en RS, ChS y HV, las tres razas de GCC que mostraron algún grado de mezcla cebuina a nivel de linajes paternos.

3 Análisis de introgresión cebuina autosómica en GCC

En la tabla 2 se presenta el comportamiento de cada locus con respecto a al número de alelos detectado en cada muestra de GCC incluyendo a Brahman; de estos resultados se puede deducir que la población de Brahman presenta el mayor grado de polimorfismo para los 11 marcadores y entre el GCC el mayor valor lo presenta CCC, puesto el

número de alelos totales detectados en estas poblaciones fue 114 y 81 con un número promedio de alelos (NPA) de 10.36 y 7.36 respectivamente (Tabla 3). Al hacer un análisis por locus se puede observar que el número de alelos de los loci TGLA293, MGTAG7 y TGLA122 pueden estar indicando el grado de introgresión cebuína en GCC, si se compara el número que se detectó en las razas ChS para el primero (10), RS para el segundo (10) y HV para el tercero (11), con los encontrados en Brahman que fueron 13, 14 y 14 respectivamente. Si se tiene en cuenta además que el número de alelos en estos tres loci fue más bajo para las otras razas de GCC, toma fuerza los resultados hallados con los marcadores en el cromosoma Y, pues como se vio en 3.1 fué en estas razas de GCC donde se hallaron haplotipos diferentes a Coly1. Otro indicativo de introgresión autosómica cebuína en GCC tomando el parámetro del número de alelos (aunque más débil), podrían ser los resultados en CCC, raza en la cual el número de alelos para los loci MTGT7 y TGLA122 es de 9, en cada uno, mayor que en BON y SM.

Tabla 2: Alelos por locus en cada raza de Ganado Criollo Colombiano

LOCUS	Número de alelos por raza de GCC						
	CCC	HV	BON	SM	RS	ChS	Brahman
TGLA57	8	6	7	7	9	8	11
TGLA73	4	6	5	5	5	6	5
MGTG4B	6	6	7	4	8	8	16
AGLA293	8	4	8	6	5	10	13
TGLA48	6	4	4	3	4	3	5
TGLA263	5	5	7	5	5	4	6
TGLA53	9	9	6	7	6	8	15
MGTG7	9	6	6	8	10	6	14
TGLA227	11	8	7	5	9	8	7
TGLA126	6	5	5	7	3	5	8
TGLA122	9	11	8	5	4	7	14

Con el fin relacionar el grado de variabilidad genética con el de mezcla cebuína se calcularon las frecuencias de heterocigóticos esperadas y observadas para todos los loci en cada población (tabla 3). En primer lugar, los datos nos muestran que en todas las razas puede haber déficit de heterocigóticos ya que las frecuencias observadas son menores que las esperadas en todas ellas, incluyendo la Brahman; pero es necesario probar si dichas diferencias son significativas. En las razas GCC el mayor valor de heterocigocidad observada lo encontramos en ChS (0.75) lo que está de acuerdo con los resultados de haplogrupos del cromosoma Y, siempre y cuando se aplique el primer tipo de análisis, pues como se dice en 3.2, esta raza tendría el mayor porcentaje de cromosoma Y cebuino con este análisis; en cuanto a los valores para HV y SM de

0.70 y 0.61, respectivamente, correlaciona para la primera, si aplicamos el segundo análisis, pero con respecto a la segunda se presenta una gran contradicción, pues su valor es el más bajo de los encontrados para las razas GCC. Con estos marcadores en CCC se encontró una heterocigocidad de 0.72 que es la más alta después de ChS, a pesar de que en ella no se halló ningún haplotipo Y cebuino, lo cual está en concordancia con los resultados del número de alelos por locus (tabla2) y está confirmando que dicha raza puede tener introgresión cebuina autosómica mayor que BON y RS, en las que tampoco se encontraron cromosoma Y cebuino.

Tabla 3: Número Promedio de Alelos y Heterocigocidad

Raza	Heterocigocidad Observada (Ho)	Heterocigocidad Esperada (He)	# alelos	NPA
Costeño con cuernos	0.72	0.77	81	7.36
Hartón del Valle	0.70	0.74	70	6.36
BON	0.66	0.74	70	6.36
San Martinero	0.61	0.70	62	5.64
Romosinuano	0.64	0.73	68	6.18
Chino Santandereano	0.75	0.77	73	6.64
Brahman	0.56	0.69	114	10.36

Tabla 4: Resultados por población (test multi - locus)

Población	Probabilidad	Error estándar
Costeño con cuernos	0,0012	0,0012
Hartón del Valle	0,1240	0,0221
Blanco Orejinegro	0,0001	0,0000
Brahman	0,0000	0,0000
San Martinero	0,0000	0,0000
Romosinuano	0,0000	0,0000
Chino Santandereano	0,0993	0,0150

Con el fin de comprobar si el déficit de heterocigóticos tenía significancia se realizó una prueba de equilibrio de Hardy–Weinberg (H y W) utilizando las frecuencias genotípicas multilocus en cada una de las poblaciones (tabla 4). Solamente las razas ChS y HV, no presentan déficit de heterocigóticos de manera significativa, Ps de 0.0993 y 0.1240 respectivamente, lo cual está de acuerdo con los resultados encontrados para los haplotipos de del Cromosoma Y con el primer tipo de análisis, sobre todo para ChS; en cuanto a HV, si este resultado es debido a la mezcla con cebú no concuerda

con el primer análisis, para el cual no se detectaron haplotipos cebuínos en esta raza, por otro lado si se aplica el segundo, la raza RS tendría que haber mostrado una tendencia semejante a las de ChS y HV; de esta manera la prueba de H y W lo que está mostrando es una relación entre el grado de heterocigosidad y la frecuencia del alelo 130 para el locus INRA124 como indicador de el cromosoma Y cebuino ya que no se encontró en RS pero si en HV.

Cuando se buscó cuáles locus estaban dando el déficit de heterocigóticos en la población general de GCC (tabla 5), se halló que la prueba de H y W no fue significativa en los loci TGLA57 y TGLA48 con Ps de 0.2054 y 0.1984 respectivamente, los cuales son diferentes a los identificados para dar peso a la introgresión autosómica cebuína en GCC (tabla 4). Estos datos podrían estar reforzando la hipótesis de que el aumento de homocigóticos puede deberse tanto a la endogamia dada por manejo, como al bajo grado de mezcla con Cebú. Para someter a prueba esta hipótesis, se calculó el estadístico de Wright, Fis, para cada población GCC, el cual mide el grado de endogamia (tabla 6) y se encontró que el menor valor lo presentó la raza ChS, (-0.3) lo que significa, por ser negativo, que en ella hay exceso de heterocigóticos de manera significativa y por tanto corrobora el resultado obtenido con los haplotipos del cromosoma Y, puesto que fué en esta raza donde se encontró la mayor proporción de haplotipos diferentes al modal taurino (tabla 1), sobre todo con el alelo 130 de INRA 124. Esto se refuerza por el valor de Fis en HV (0.05) que no es significativamente diferente de 0 y además, como en RS, se obtuvo un valor Fis muy alto (0.13), concuerda con el hecho de que la frecuencia de haplotipos Y cebuinos en esta raza es de 0, si se toma como criterio de nuevo el alelo 130 de INRA124.(tabla 1)

El Fis de CCC (0.07), que no difiere de 0, insinúa de nuevo que en esta raza, se pudo dar introgresión cebuina autosómica vía materna.

Tabla 5: Resultados por locus (test multi - poblacional)

Locus	Probabilidad	Error estándar
TGLA 57	0,2054	0,0257
TGLA73	0,0000	0,0000
MGTG 4B	0,0002	0,0002
AGLA 293	0,0171	0,0091
TGLA 48	0,1984	0,0212
TGLA 263	0,0041	0,0000
TGLA 53	0,0000	0,0000
MGTG 7	0,0000	0,0000
TGLA 227	0,0000	0,0000
TGLA 126	0,0000	0,0000
TGLA 122	0,0000	0,0000

Tabla 6: Estadístico Fis de Wright para cada población de GCC y Brahman

Población	Fis
BON	0,1334
Chino Santandereano	0,0234
Costeño con cuernos	0,0704
Hartón del Valle	0,0506
Romosinuano	0,1300
San Martinero	0,1308
Brahman	0,1953

Con el fin de medir las relaciones genéticas entre las razas de GCC, y de estas con Brahman, lo cual sería un buen indicativo de introgresión, puesto que se espera que las distancias genéticas de las que presentaron haplotipos Y diferentes al modal taurino (HV, ChS y RS) con las otras GCC (BON, CCC y SM), sean mayores que las de estas últimas entre sí y menores con respecto a la raza cebuína Brahman; además que en un árbol filogenético las primeras se sitúen más cerca de Brahman que las últimas, Dichas relaciones se calcularon por medio de la distancia genética de Nei 1978 y con los estadísticos de Wright Fis, Fst y Fit, utilizados para estructura genética, que además indican el grado de endogamia en la población total de GCC y el efecto de cada locus.

Los valores de Fis para cada locus (tabla 7), con excepción del locus TGLA57, fueron positivos (déficit de heterocigóticos), y sólo en tres de ellos este valor no fue diferente de 0 (TGLA57 -0.06, TGLA293 0.06 y TGLA48 0.07). Con estos resultados la única correlación con el número de alelos (tabla 2), como indicativo de introgresión cebuína, se encuentra para el TGLA293, en ChS. El mayor déficit de heterocigóticos lo mostró el locus MGTG7 (0.20); este locus, en la raza RS, presentó un número de alelos mayor que en las otras razas GCC (tabla 2), lo cual no concuerda con lo esperado si se toman los haplotipos del Y, detectados en ella, como cebuínos. Esto quiere decir que los resultados con autosomas siguen reforzando la correlación con más introgresión y la frecuencia del alelo 130 en INRA124. En general, la mayoría de los loci muestran un déficit de heterocigóticos en la población de GCC, que puede deberse más al manejo que a la pureza de las razas. Esto se evidencia mejor con los valores de Fit (tabla7), los cuales son positivos significativamente diferentes de 0, con excepción del valor para el locus TGLA57 (0.06) que es un indicativo de la endogamia o deriva.

Con respecto al estadístico Fst (tabla7), que mide estructuración entre las poblaciones, solamente con dos marcadores (MGTG7 0,0377 y TGLA126 0.0403) no se obtiene separación genética de las poblaciones GCC puesto que sus Fst son inferiores a 5% (Hartle 1966). Los otros valores están demostrando que las poblaciones de GCC se

pueden tomar como razas diferentes, y en cuanto a la asociación de los Fst con el grado de mezcla cebuína solamente se puede inferir que el locus que está dando la mayor diferenciación poblacional (TGLA263 0.1736), presenta un número de alelos en las razas GCC, muy semejante y el menor lo tiene ChS (4); lo cual si se relaciona con el grado de mezcla que viene mostrando esta raza a través de todos los análisis, significa que ella puede tener en este locus algún alelo con frecuencias semejantes a Brahman, lo cual se comprueba al comparar las frecuencias del alelo 104 (datos no mostrados) en dicho locus, que presentó mayores frecuencias en CCC (0.309), en HV (0.409) y en ChS (0.344). Este alelo tiene una frecuencia en Brahman de 0.808. Lo anterior significa, además, que en la raza RS debe ser baja la introgresión ya que para él, la frecuencia fue de 0.152 y confirma la nueva hipótesis sobre la frecuencia de haplotipos con alelo INRA130, como indicadores de cromosomas de origen cebuino; por otro lado, afianza la idea de que la raza CCC debe tener mezcla autosómica con cebú.

Tabla 7: Valores de los estadísticos de Wright estimados para cada locus y para el total de loci en la población total de GCC

Locus	Fis	Fst	Fit
TGLA 57	-0,0604	0,1135	0,0599
TGLA73	0,1667	0,0868	0,2390
MGTG 4B	0,1103	0,1169	0,2143
AGLA 293	0,0647	0,1106	0,1681
TGLA 48	0,0701	0,1220	0,1835
TGLA 263	0,1169	0,1736	0,2702
TGLA 53	0,1793	0,1435	0,2971
MGTG 7	0,2064	0,0377	0,2363
TGLA 227	0,1772	0,1445	0,2961
TGLA 126	0,1128	0,0403	0,1485
TGLA 122	0,1248	0,0619	0,1790
Total	0,1158	0,1050	0,2086

La comparación de las distancias genéticas, que en términos generales son cruciales, en la medida de flujo genético entre las razas de GCC y Brahman, nos muestra en primer término, que la raza ChS es la más cercana a la cebuína ya que la distancia es la menor (0.1112) y, por otro lado, que la raza BON, es la que menor grado de introgresión de cebú tiene entre las razas de GCC, pues presenta la mayor distancia con Brahman (0.1696). Estos datos están de acuerdo con los de los haplotipos Y en el sentido de que en ChS se encontró la mayor frecuencia de haplotipos Y cebuinos cuando se analiza por el primer método; y, en BON, el haplotipo modal taurino se

encontró en 100%. De esta forma, para que haya concordancia con el primer método, se espera además que la distancia entre Brahman con HV sea menor que la de dicha raza con RS. Por el contrario, como puede observarse en la tabla 8, la distancia entre HV y Brahman es de 0.1306 y entre RS y Brahman de 0.1658, lo que quiere decir que hay más introgresión de cebú en HV que en RS. Por otra parte, si se toma el segundo método, las razas ChS y HV deberían tener una distancia genética semejante ya que se calculó por este método que ambas razas tendrían 27% de haplotipos Y de origen cebuino. Lo anterior quiere decir que ninguno de los dos métodos concuerda exactamente con los datos de distancia genética, quedando la tendencia, que se ha venido consolidando durante el análisis, de tomar la frecuencia del alelo 130 de INRA124 como indicador principal de haplotipo Y cebuino. Esta tendencia se reafirma si se confrontan sus frecuencias con los datos de distancia genética (0% en RS, 9% en HV y 27% en ChS tabla 1) que son inversamente proporcionales a las distancias genéticas de cada una de estas razas con Brahman (0.1658, 0.1306 y 0.1112 respectivamente, tabla 8). Es más, la distancia de RS con Brahman es muy semejante a la de BON (0.1696) con Brahman, a pesar de que en BON la frecuencia de haplotipo Y modal taurino fue de 100%

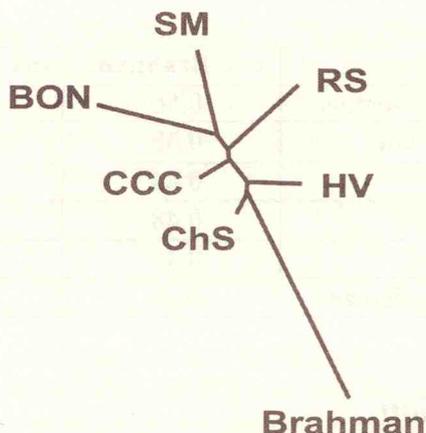
Tabla 8: Distancias genéticas (Fst) estimadas a partir de 11 marcadores STR's

Población	CCC	H del V	BON	Cebú	San Mart.	Romo
H V	0,0384	-	-	-	-	-
BON	0,0825	0,0963	-	-	-	-
Brahman	0,1296	0,1306	0,1696	-	-	-
SM	0,0628	0,0996	0,0860	0,1503	-	-
RS	0,0540	0,0689	0,0810	0,1658	0,0892	-
ChS.	0,0369	0,0299	0,0962	0,1112	0,0749	0,0617

La distancia de la raza CCC con Brahman (0.1296), que es la menor después de la de ChS, confirma la tendencia que se ha venido infiriendo con los anteriores análisis con respecto a que en CCC se ha hecho introgresión con cebú utilizando hembras y por lo tanto no se detectaron haplotipos Y cebuinos en ella. Las anteriores relaciones se pueden visualizar en la figura 1, por medio de un árbol construido por el método de Neighbor Joining, a partir de las distancias genéticas. En él puede observarse que las razas ChS, HV y CCC que han mostrado en su orden el mayor grado de introgresión cebuina autosómica, se localizan más cerca de Brahman que las razas RS, SM y BON, esta última es la raza que se sitúa más distante de la cebuina. Es interesante la relación que se presenta entre BON y SM al conformar un grupo con el mismo origen filogenético, ya que en trabajos anteriores (Bedoya y otros 2001; Moreno y otros 2001) se presentó esta misma relación a pesar que el número de marcadores utilizados fue de sólo 7. Esta relación le da fuerza a la hipótesis de que los Jesuitas pudieron

realizar cruces entre BON y SM, teniendo en cuenta que al mismo tiempo (1728) tuvieron fincas en Antioquia y el piedemonte llanero (Borda 1872). De otra forma queda muy difícil explicar el hecho de que dos poblaciones tan distantes geográficamente, tengan más relación genética entre sí que la que deberían tener BON con CCC y RS que se encuentran geográficamente más cercanas.

Figura 1: Arbol filogenético Neighbor Joining, relacionando las razas GCC con Brahman



Un último análisis, con los datos de los marcadores autosómicos, consistió en medir el grado de mezcla cebuína, evaluando para ello el estimador mY que mide el porcentaje de genes que se han introducido por mezcla reciente en una población a partir de dos poblaciones parentales, teniendo como base el tiempo de coalescencia entre ellas, es decir, el porcentaje de genes que comparten por su origen común. Este cálculo se realizó tomando como parentales la raza taurina Simmental y la cebuína Brahman; los resultados aparecen en la tabla 9. Es de anotar que, como la raza Brahman tiene introgresión de *B. taurus*, los datos se deben tomar de manera relativa, pues de otra forma las razas GCC serían una F1 entre *B. indicus* y *B. taurus*. Sin embargo, este parámetro sirve para hacer comparaciones en las razas de GCC, con respecto a su grado de introgresión cebuína y confrontarlo con los resultados de los análisis anteriores. Estas comparaciones corroboran los anteriores resultados que muestra a ChS como la raza de GCC, con mayor grado de mezcla cebuína ya que presenta el mayor valor mY de Brahman (0.59) y BON como la que ha sufrido menor introgresión (mY de Brahman 0.44). En cuanto a las razas RS y HV, donde se encontraron haplotipos Y diferentes al modal taurino, los valores mY de Brahman no difieren de manera significativa (0.49 y 0.48 respectivamente) lo cual no apoya ninguno de los análisis iniciales hechos para haplotipos en el Y. Sin embargo no contradice si se toma la frecuencia del alelo INRA124 130 como indicativo de cromosoma Y cebuino, ya que

SM tiene también un valor de mY de Brahman (0.48) muy parecido al de RS si se tiene en cuenta que bajo esta hipótesis ninguna de las dos razas tienen haplotipos Y cebuínos. Estos datos, además, muestran definitivamente la introgresión cebuína autosómica en CCC, ya que su valor mY de Brahman (0.56) es muy semejante al de ChS; esto concuerda con los análisis anteriores en el sentido de que la raza CCC, ha sufrido introgresión cebuína en mayor grado que las otras razas lo cual no se detectó con los haplotipos del cromosoma Y.

Tabla 9: Datos obtenidos del estimador mY para el grado de mezcla ancestral de *Bos indicus* en GCC

Raza	mY Brahman	mY Simmental
Costeño con cuernos	0.56	0.44
Hartón del Valle	0.48	0.52
BON	0.44	0.56
San Martinero	0.48	0.52
Romosinuano	0.49	0.51
Chino Santandereano	0.59	0.41

A modo de discusión

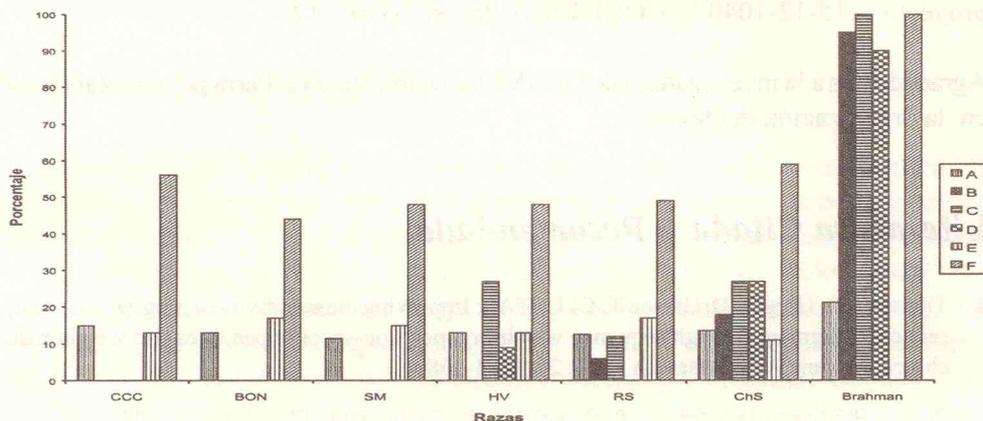
Aproximadamente el 26% de los linajes mitocondriales en las razas de Ganado Criollo Colombiano son de origen taurino africano, esto significa que la introgresión de razas africanas a europeas, debe haberse dado antes de la conquista ya que no se tiene ningún registro sobre el ingreso de estos a Colombia después de ella. El hecho de que GCC tenga genes africanos explica el grado de adaptación al trópico que presentan estas razas y además, las convierte en un recurso genético para características de resistencia a parásitos y otros agentes infecciosos ya que la principal raza africana N. Dama ha mostrado resistencia, que se utiliza en Africa para ser transferida a cebuínos que tienen mayor susceptibilidad pero mayor capacidad productiva. A lo anterior hay que agregar que GCC, presenta mayor variabilidad en su DNA mitocondrial que las razas africanas lo cual está asegurando que el número de repertorios a nivel de esta organela, esencial en el recambio energético sirva como fuente para programas de mejoramiento por vía materna.

Con respecto a los patrilinajes en GCC, se puede concluir en primer término que hay poca variabilidad (medida con los tres marcadores), lo cual puede significar que se están utilizando pocos reproductores en el mantenimiento de los hatos de GCC. Y en cuanto al grado de mezcla con cebú vía paterna, únicamente la raza Chino Santandereano, resistió el exhaustivo análisis en mantener la consistencia de su mayor

grado de mezcla cebuina por esta vía, de tal manera que se puede afirmar que en ChS, se encuentra un porcentaje de cromosomas y cebuinos entre 18 y 27%, tomando cualquiera de los tres criterios que se expusieron en análisis de resultados. Las razas HV y RS, que presentaron haplotipos diferentes a 132 184 158 (modal taurino) pueden tener un grado de introgresión cebuina por esta vía en diferentes grados de acuerdo al análisis que se haga de tal manera que HV puede tener entre 0 y 27% y RS entre 0 y 12% pero como se dice en 3.3, si se toma en cuenta que el alelo 130 de INRA124, puede ser tomado como indicador de su origen cebuino los porcentajes de introgresión en estas razas sería de ChS 27%, HV 9% y RS 0% y para GCC la frecuencia de cromosomas Y cebuinos sería de 5 a 8%, estos datos se corroboran perfectamente con los obtenidos cuando se utilizaron los marcadores autosómicos ya que en la población de CCC, que no presentó haplotipos Y cebuinos se encontró un alto grado de mezcla cebuina muy superior a la de RS donde se hallaron haplotipos Y diferentes al modal taurino, lo cual está corroborando que dichos haplotipos no son de origen cebuino, en la figura 2 se comparan los parámetros que se utilizaron en el análisis como NPA, frecuencia haplotipos Y en los tres loci, Frecuencia de Haplotipos y con dos loci SPA de cebú, distancia genética y el estimador my para mezcla y se puede observar, la consistencia en ChS, para los 6 valores con todos los análisis y la mayor correlación cuando se calcula, la frecuencia de haplotipos Y, teniendo en cuenta la presencia del alelo 130 de locus INRA124, esto además se puede corroborar por la literatura ya que se han encontrado en este locus solo dos alelos de 132 y 130 Pb, el primero con una frecuencia de 100% en *B. taurus* y el segundo con 100% en *B. indicus*.

Es de agregar que la raza que demostró mas pureza con los dos sistemas (cromosoma y autosomas) fue la BON (figura 2), la cual además mostró una mayor diferencia con las otras a nivel de matrilineajes, lo cual no quiere decir que dicha raza no tenga introgresión cebuina, pues su valor my fue bastante alto a pesar de ser el menor en las GCC.

Figura 2: Comparación de parámetros para medir introgresión cebuina en GCC



- A. Porcentaje de promedio de alelos
- B. Porcentaje de introgresión cebuína con tres loci (INRA124, INRA126 y BM861) del cromosoma Y (primer análisis).
- C. Porcentaje de introgresión cebuína con dos loci (INRA124 y BM861) del cromosoma Y (segundo análisis).
- D. Porcentaje de introgresión cebuína con la frecuencia del alelo 130 en INRA124 del cromosoma Y..
- E. Distancia genética medida con 11 marcadores autosómicos.
- F. Estimador mY de mezcla genética autosómica.

Como recomendaciones podemos decir que si se quiere utilizar un reproductor considerado puro, su semen debe tener el haplotipo Y 132 184 158 ó 132 182 158 considerados de origen netamente taurino, esto significa que para el mantenimiento de los hatos, se puedan identificar reproductores no consanguíneos, lo cual disminuiría el efecto de la endogamia detectada con marcadores autosómicos y expresada por el déficit de heterocigóticos hallado en casi todas las razas; que es un reflejo del manejo ya que en la raza Brahman se encontró una diferencia de 0.13 entre las frecuencias de heterocigóticos observada y esperada, y los valores más altos para esta diferencia en GCC son de apenas 0.09 para SM y RS. Estas diferencias están contando, a través de los marcadores genéticos, la historia del manejo intensivo que se le ha dado a Brahman, en comparación con las razas GCC, utilizando una sola línea paterna en la mayoría de cruces.

Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado con el auspicio de COLCIENCIAS, por medio del proyecto 1115-12-10407 y CODI UdeA Proyecto CIP 112.

Agradecemos a la investigadora de GENMOL, María Victoria Parra por su colaboración en la organización del texto.

Literatura Citada y Recomendada

- 1 Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 1994; 22:4673-4680.
- 2 Phylip (Phyligeny Interference Package). Seattle: University of Washington, 1993.

- 3 Barker CM, Manwell C. Breeds groups. Chemical classification of cattle. 1998: 127-150.
- 4 Chakraborty R. Yearbook of Physical Anthropology. 1986.
- 5 Carvajal-Carmona LG, Bermudez NR, Moreno FL, Marquez M, Estrada L, Davies S et al. Genetic variability of colombian criollo cattle. *Animal Genetics* 1998; 29:11-12.
- 6 Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J et al. Short protocols in molecular biology. In: John Wiley and Sons, editor. Ottawa: 1995: 1200.
- 7 Kidd KK, Stone WH, Crimella C, Carezni C, Casati M, Rognoni G. Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1980; 11(1):21-38.
- 8 Hanotte O, Okomo M, Verjee Y, Rege E, Teale A. A polymorphic Y chromosome microsatellite locus in cattle. *Anim Genet* 1997; 28(4):318-319.
- 9 Gonzalez P, Tunon MJ, Vallejo M. Genetic relationships between seven Spanish native breeds of cattle. *Anim Genet* 1987; 18(3):249-256.
- 10 Del Rio Moreno JL, Lopez y Sebastian LE. Hombres y Ganados en la tierra del oro: Comienzos de la ganadería en Indias. *Revista Complutense de Historia de America* 1998; 24:11-45.
- 11 Wendorf F, Schild R. Nabta playa and its role in eastern African archaeology. *Journal of Anthropology and Archaeology* 1998; 17:97-123.
- 12 Wendorf F, Schild R. Are the early holocene cattle in the eastern Sahara domestic or wild? *Evolutionary Anthropology* 1994; 3:118-128.
- 13 Smith AB. Cattle domestication in North Africa. *The African Archeological Review* 1986; 4:197-203.
- 14 Primo A. El ganado bovino Iberico en las Americas: 500 años despues. *Archivos de Zootecnia* 1992; 41:421-432.
- 15 Pinzón Martinez E. Historia de la Ganaderia Bovina en Colombia. Bogotá: Banco Ganadero, 1984.
- 16 Exeter Software NTSYS Numerical taxonomy and multivariate analysis system ver 2.1. 2001. Ref Type: Electronic Citation. http://www.exetersoftware.com/cat/update_NTSYSpc.html.
- 17 Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. 3 ed. 1997.
- 18 Nei M. Molecular evolutionary genetics. 1 ed. New York: 1987.
- 19 Nei M. Molecular population genetics. 1 ed. New York: 1987.
- 20 Schneider S, Kueffer J, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2000. <http://lgb.unige.ch/arlequin/software/>. 2000. Genetics and Biometry Lab; Dept.of Anthropology; University of Geneva. 8-4-2003. Ref Type: Electronic Citation
- 21 Nei M, Takahata N. Effective Population size, genetic diversity, and coalescence time in subdivided populations. *J Mol Evol* 1993; 37:240-244.

- 22 Nei M, Jin L. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations. *Mol Biol Evol* 1989; 6(3):290-300.
- 23 Miretti MM, Ferro JA, Lara MA, Contel EP. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA- DRB3 gene in South American cattle. *Biochem Genet* 2001; 39(9-10):311-324.
- 24 Giovambattista G, Ripoli MV, Peral-Garcia P, Bouzat JL. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Anim Genet* 2001; 32(5):240-247.
- 25 Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 2002; 418(6898):700-707.
- 26 Cymbron T, Loftus RT, Malheiro MI, Bradley DG. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 266(1419):597-603.
- 27 Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortiz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J et al. Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet* 2000; 67(5):1287-1295.
- 28 Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 1995; 141(2):743-753.
- 29 Beja-Pereira A, Erhardt G, Matos C, Gama L, Ferrand N. Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Anim Genet* 2002; 33(4):295-300.
- 30 Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P et al. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 2001; 410(6832):1088-1091.
- 31 Giovambattista G, Ripoli MV, De Luca JC, Mirol PM, Liron JP, Dulout FN. Male-mediated introgression of *Bos indicus* genes into Argentine and Bolivian Creole cattle breeds. *Anim Genet* 2000; 31(5):302-305.
- 32 Bertorelle G, Excoffier L. Inferring admixture proportions from molecular data. *Mol Biol Evol* 1998; 15(10):1298-1311.
- 33 Edwards CJ, Gaillard C, Bradley DG, MacHugh DE. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Anim Genet* 2000; 31(2):127-130.
- 34 Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 2002; 11(1):1-16.
- 35 Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH et al. Microsatellite evolution—evidence for directionality and variation in rate between species. *Nat Genet* 1995; 10(3):337-343.
- 36 Long JC. The genetic structure of admixed populations. *Genetics* 1991; 127(2):417-428.
- 37 Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(10):5131-5135.

- 38 Yu Y, Nie L, He ZQ, Wen JK, Jian CS, Zhang YP. Mitochondrial DNA variation in cattle of south China: origin and introgression. *Anim Genet* 1999; 30(4):245-250.
- 39 MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim Genet* 1998; 29(5):333-340.
- 40 Loftus RT, Ertugrul O, Harba AH, El Barody MA, MacHugh DE, Park SD et al. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Mol Ecol* 1999; 8(12):2015-2022.
- 41 Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(7):2757-2761.
- 42 Kim KS, Yeo JS, Choi CB. Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Anim Genet* 2002; 33(3):201-204.
- 43 Bradley DG, MacHugh DE, Loftus RT, Sow RS, Hoste CH, Cunningham EP. Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in west African trypanotolerant cattle populations. *Anim Genet* 1994; 25(1):7-12.
- 44 MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 1997; 146(3):1071-1086.
- 45 Hanotte O, Tawah CL, Bradley DG, Okomo M, Verjee Y, Ochieng J et al. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. *Mol Ecol* 2000; 9(4):387-396.
- 46 Ward TJ, Skow LC, Gallagher DS, Schnabel RD, Nall CA, Kolenda CE et al. Differential introgression of uniparentally inherited markers in bison populations with hybrid ancestries. *Anim Genet* 2001; 32(2):89-91.
- 47 Bedoya G, Carvajal L, Bermúdez N, Moreno F., Marquez ME, Davies S, Derr J Ossa J, Ruiz A. *Rev Col Cienc Pec* 2001. 14(2): 107-118.
- 48 Moreno F, Bedoya G, Derr J, Carvajal L, Bermúdez N, Zuluaga F, Ossa J, Berdugo J, Estrada L, Barrera J, Davies S, Ruiz A. *Revista Corpoic* 2001. 3(2):17-23.
- 49 Borda J. J. *Historia de la compañía de Jesús en la Nueva Granada*. 1872

