

ARTÍCULO ESPECIAL

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, ²Grupo Reproducción-BIOGÉNESIS, Universidad de Antioquia, A 1226, Medellín, Colombia*; ³Galton Laboratory, University College London, United Kingdom; ⁴Programa de recursos genéticos animales, Corpoica, Bogotá, Colombia; ⁵Depto. de Biología, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; ⁶Depto. de Patobiología, University of Texas A&M

(Recibido: 21 mayo, 2001; aceptado: 31 julio, 2001)

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 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, contri-

buyó 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 virtual-

mente 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 γ^{32} 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 amplifica-

Tabla 2. Información general sobre los marcadores utilizados¹

Locus	Cromosoma	Secuencia del cebador (5'-3')	Na ²	Ta ³	Tamaño (pb)
BM 4513 ⁴	14	F:GCGCAAGTTTCCTCATGC R:TCAGCAATTCAGTACATCACCC	10	54	141-161
BMC 1222 ⁴	13	F:CCAATTTTGCAGATAAGAAAACA R:CCTTGAGTGTTCTCCTGAGT	12	56	272-302
BM 1225 ⁴	20	F:TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC R:ACCCCTATCACCATGCTCTG	11	54	227-255
MAF 70	4	F:CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC R:GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	11	52	121-149
COW 9	?	F:GCACACAGATTCTTTACCAAGTG R:TGGATGGAGGAACCTAGCAG	?	52	?

¹ Bishop et al. 1994

² Número de alelos reportados en la literatura

³ Temperatura de alineamiento

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

das 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 ^{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.

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 amplificadas 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):

$$D = -\log_e I$$

Donde:

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

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^oDama (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.

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 ob-

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

	BM 4513	BMC 1222	BM1225	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±0.0021	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

servado 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 bovi-

nas 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 conside-

rar 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

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
Hartón del Valle	10	0.7	0.1086	0.3156±0.0106	5
Casanareño	4	0.5	0.2000	0.4233±0.0032	3
Cebú	16	0.7333	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

del equilibrio H-W pero si un alto valor de H_o (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 ($H_o = 0.5$ y $NPA = 3$) de todas las razas y el F_{is} 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).

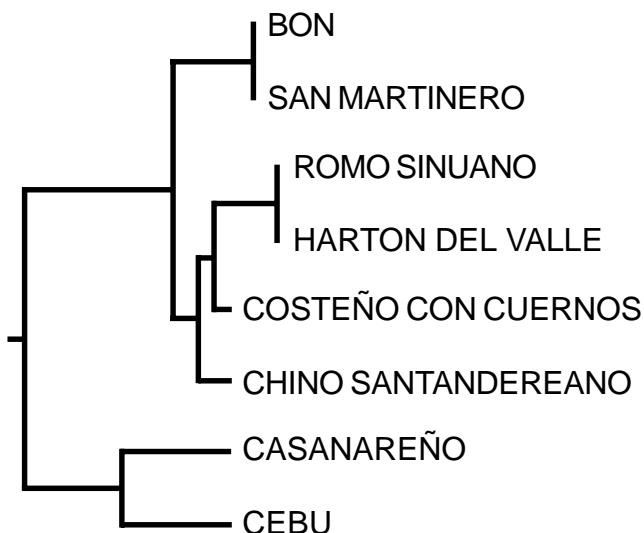


Figura 1. Árbol de relaciones genéticas del ganado criollo Colombiano

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 F_{is} 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.

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.

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.

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

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	-0.0185	-0.1606	-0.1817	0		
Cas	1.6014	1.6061	1.5406	0.0900	0.5177	1.1894	0	
Cebú	1.1730	1.6497	0.6321	0.3619	0.0072	1.2477	0.3209	0

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 posteriores, 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.

Summary

Molecular and population structure of colombian criollo cattle

Colombian criollo cattle includes a group of breeds that have adapted to the environmental conditions of our country for more than 400 years. Therefore, they must have important adaptive characteristics that could be used rationally for animal production programs. Its then necessary to characterize these criollo breeds to determine the degree of genetic variability since it is this parameter which ultimately determines the success or failure of any genetic program directed to preservation and improvement. This paper explores intra and inter genetic variability of each colombian criollo breed and compare it with Brahman. Microsatellite markers were used and three indexes of intrabreed variability were estimate: Endogamy (Fis), Heterocigosity (Ho) and Average number of alleles (NPA). Additionally a tree of genetic distance was created. The indexes of genetic variability found for the 7 breeds were as intermediate, similar to other bovine populations in the world. We will continue increasing the number of loci and individuals per breed, in order to have better estimates of genetic diversity, phylogenetic relationships, and eventual introgression with foreign breeds.

Key words: *adaptability- microsatellites- phylogenetic relationships- genetic variability.*

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. Breneman 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 proposito. 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.