

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GANADO BOVINO LECHERO DEL TRÓPICO ALTO DE NARIÑO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES HETERÓLOGOS DE TIPO MICROSATÉLITE

L. G. Mejía ^{*1}, R. A. Hernández¹, C. Y. Rosero¹, C. E. Solarte¹

Artículo recibido: 22 de abril de 2015. Aprobado: 17 de julio de 2015

RESUMEN

Cinco razas de ganado bovino (*Bos taurus*) del trópico alto de Nariño fueron caracterizadas usando once loci microsatélites. Se incluyeron las razas Holstein, Jersey, Normando, Pardo suizo y el ganado Criollo. Las frecuencias alélicas fueron calculadas y usadas para la caracterización de las razas y el estudio de sus relaciones genéticas. La diversidad genética reflejada en el número de alelos por locus (NPA = 10) y la heterocigosidad observada (Ho = 0,7) fue alta, siendo mayor para la raza Criolla. El AMOVA, evidenció una baja diferenciación genética (FST = 0,0663) para la población total, con una pequeña diferenciación entre Criollo y Holstein (0,006), resultado que fue correspondiente con el análisis de agrupamiento bayesiano, que permitió determinar un grado de absorción del núcleo Criollo del 56% por la raza Holstein. La alta diversidad, supone procesos de adaptación a diferentes ambientes y mezcla de razas, facilitando un continuo flujo genético. Esto puede explicarse por la realización de cruces dirigidos al incremento del volumen de producción teniendo como base la raza Holstein, donde la selección intensiva puede conllevar al detrimento de la pureza del ganado criollo e incidir en su capacidad adaptativa.

Palabras clave: raza, microsatélites, variabilidad, introgresión.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF DAIRY CATTLE IN THE HIGH TROPIC OF NARIÑO BY MOLECULAR HETEROLOGOUS MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Five populations of cattle (*Bos taurus*) from tropical high of Nariño were characterized with 11 loci microsatellites. The breeds included were Holstein, Jersey, Normande, Brown Swiss and Creole. The molecular characterization of breeds and study genetic relationships were made with Alleles frequencies. Genetic diversity as the number of alleles per locus (NPA = 10) and observed heterozygosity (Ho = 0.7) were high, being higher for the Creole breed. Analysis of molecular variance (AMOVA), showed low genetic differentiation (FST = 0.0663) for the total population, with a small difference

¹ Grupo de Investigación “Producción y Sanidad Animal”, Línea de Mejoramiento Genético, Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño. Cll. 18 Cr. 50, Ciudadela Universitaria Torobajo, Pasto (Colombia).

* Autor para correspondencia: lizethmejia3@gmail.com

between Creole and Holstein (0.006). This result was similar to the Bayesian clustering analysis, which identified a percentage of absorption of 56% to Creole by the Holstein breed. The high diversity assumes processes of adaptation to different environments and miscegenation, showing a continuous gene flow. The above can be explain by cross-breeding to increase the production volume on the basis of the Holstein breed. Detrimental impacts, due to the intensive selection, might this have on the creole cattle and has influence in their adaptive capacity.

Key Words: cattle breed, microsatellite, variability, introgression.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética se considera clave en la conservación de los recursos genéticos y constituye la base de procesos de selección y mejoramiento genético (Bejarano *et al.* 2012). En bovinos, la pérdida de ésta diversidad no sólo pone en riesgo la desaparición de ciertas razas, sino que además limita los progresos del mejoramiento genético futuros (Pizarro *et al.* 2009) reduciendo la posibilidad para hacer frente a nuevas condiciones ambientales. De manera que existe un consenso en la conservación de ciertas razas domésticas explicado por el acervo genético contenido en aquellas introducidas décadas atrás y que cumplen un proceso de adaptación en su ecosistema (Barker 2001).

En Colombia la diversidad genética se representa en una amplia variedad de razas de origen Europeo (*Bos taurus taurus*) introducidas por los españoles desde el siglo XV. De éstas, el ganado criollo adquirió características adaptativas de gran importancia como la resistencia al estrés en climas tropicales, además de ser más eficiente en el uso de sus recursos (Barrera *et al.* 2006).

En los últimos treinta años, el acervo genético del ganado bovino criollo ha disminuido por efecto de la selección artificial de cruzamientos dirigidos con fines productivos, hecho que conlleva a la pérdida de rasgos adaptativos propios

de esta raza (Bejarano *et al.* 2012). De ahí que el conocimiento del estado actual de esa diversidad es relevante para el mejoramiento genético sustentable y para fomentar estrategias de conservación genética, con el objeto de mantener la máxima heterocigosidad con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación (Alves 2007).

En este contexto, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) propone un programa integrado para el manejo global de los recursos genéticos de ganado utilizando marcadores moleculares de ADN altamente polimórficos: los microsatélites o *short-sequence repeat tandem* (SSRT) (González 2003). En respuesta a éste propósito diversas investigaciones se ha realizado en poblaciones de bovinos priorizando los esquemas de conservación (Piñero 2008).

En América, el análisis genético de estas poblaciones ha sido llevado a cabo por diversos autores, quienes han utilizado loci microsatélites para la caracterización genética. Entre los estudios relevantes se puede mencionar el de Quiroz (2007), para establecer relaciones de parentesco entre bovinos criollos mexicanos y otras razas. Los resultados con 27 loci SSRT evidencian una estructura genética común con diferencias en regiones geográficas, producto de la introgresión de otras razas sin pérdida de identidad genética.

Zamorano *et al.* (1998), usando ocho SSRT caracterizaron poblaciones de bovino criollo argentino encontrando alta diversidad genética. De otro lado, el estudio realizado por Aquino *et al.* (2008) en Perú, reporta con cinco SSRT baja diferenciación genética entre poblaciones como resultado del origen común del bovino criollo peruano y el proceso tradicional de la selección para cruzamientos.

En Brasil, el uso de 10 SSRT en poblaciones de la raza criolla Pe-Duro, evidenció alta diversidad genética, desviaciones en los valores de equilibrio Hardy-Weinberg y valores de F_{IS} significativos, sugiriendo la práctica de cruces endogámicos que resulta en altos niveles de genotipos homocigotos (Ferreira 2008).

En Colombia, Moreno *et al.* (2001) usaron cinco SSRT con el fin de establecer relaciones filogenéticas en razas criollas y Cebú. Los autores encontraron un posible mestizaje entre las razas Cebú y Casanareño por la ausencia de núcleos de animales considerados como puros.

Más recientemente, Bejarano *et al.* (2012) determinaron la diversidad genética de la raza Romosinuano con doce marcadores microsatélites encontrando: índices de fijación en genotipos homocigotos y déficit de heterocigotos, alta diversidad genética total y valores moderados de homocigosidad dentro de las poblaciones de estudio. Los autores concluyen la necesidad del manejo del flujo genético con el propósito de reducir los valores de consanguinidad (Bejarano *et al.* 2012).

En este contexto, el presente estudio enfatiza la necesidad de caracterizar la diversidad genética de las razas de la especie *Bos taurus* del trópico alto de Nariño con el fin de incorporarlas a los programas de conservación, selección y mejora genética. Se podrán realizar asociaciones con caracte-

res de producción, entre ellos calidad de la leche, longevidad y fertilidad (Egito *et al.* 2007).

En esta investigación, se propone estimar la diversidad genética intra e inter núcleos raciales Holstein, Normando, Pardo Suizo, Jersey y Criollo del trópico alto de Nariño, estableciendo el grado de absorción de la raza Criolla en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra y localización

Para la caracterización molecular de los cinco núcleos de las razas Holstein, Normando, Pardo Suizo, Jersey y Criollo se tomaron aleatoriamente 30 ejemplares de cada raza, distribuidos en los distritos lecheros de Pasto, Pupiales y Guachucal del departamento de Nariño (Colombia), para un total de 150 individuos.

El tamaño de la muestra se estimó de acuerdo con lo indicado por Chakraborty (1992), sobre la base de la frecuencia mínima alélica.

Toma de muestras

Se tomaron 5 ml de sangre de cada individuo mediante punción en la vena coccígea, que fueron almacenados en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante. Las muestras se transportaron en nevera con hielo seco hasta el laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño, donde se almacenaron a una temperatura promedio de 4°C hasta realizar la extracción de ADN. Adicionalmente, se tomaron muestras de una parte de tejido sanguíneo en tarjetas FTA®, para ello, se impregnó rápida y cuidadosamente el fluido en uno de los pozos de la tarjeta a partir de la aguja estéril. Las

muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar aséptico, para evitar contaminación, luego se envolvieron en papel aluminio y se conservaron en el laboratorio.

Extracción de ADN

La obtención de ADN se realizó mediante el método *Salting Out* descrito por Sambrook y Rusell (2001) con modificaciones implementadas en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal. La cuantificación de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro (Jenway, Génova), por medio de la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm y además por comparación visual con una muestra control de concentraciones conocidas y equivalentes

a 100 ng/μl y 10 ng/ μl (Biorad). La extracción de ADN a partir de muestras de sangre conservadas en tarjetas FTA, se realizó usando el kit FTA® de Whatman Bioscience. El ADN contenido en cuatro discos de 1.2mL fue obtenido por calentamiento a 95°C durante 30 minutos, en 30 μl de agua ultrapura libre de nucleasas.

PCR loci microsatélites

De acuerdo a lo recomendado por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG), fueron seleccionados 11 microsatélites para ser analizados usando el Kit *Stockmarks for Cattle Bovine Genotyping* (Applied Biosystems, División Perkin-Elmer, Foster City, CA), descritos en la Tabla 1.

TABLA 1. Microsatélites para ADN de ganado vacuno, con la secuencia de cebadores empleada en la amplificación, tamaño del amplificado y el fluorocromo de marcaje (Dye).

Locí	Cebadores directo y reverso	Tamaño amplificado (pb)	Dye	Referencias
TGLA227	CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA	64 - 115	FAM	Barendse <i>et al.</i> 1994
TGLA53	GCT TTC AGA AAT AGT TTG CAT TCA ATC TTC ACA TGA TAT TAC AGC AGC	147-197	FAM	Barendse <i>et al.</i> 1994
BM2113	CGT GCC TTC TAC CAA ATA CCC CTT CCT GAC AGA AGC AAC ACC	116-146	FAM	Bishop <i>et al.</i> 1994
ETH10	GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	198-234	FAM	Toldo <i>et al.</i> 1993
TGLA126	CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C	104-133	JOE	Barendse <i>et al.</i> 1994
TGLA122	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C	130-193	JOE	Barendse <i>et al.</i> 1994
ETH3	GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G	90-135	NED	Toldo <i>et al.</i> 1993

Locí	Cebadores directo y reverso	Tamaño amplificado (pb)	Dye	Referencias
INRA23	GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	193-235	JOE	Vaiman <i>et al.</i> 1992
ETH225	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	133-165	NED	Steffen <i>et al.</i> 1993
BM1824	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	170-218	NED	Bishop <i>et al.</i> 1994
SPS115	AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC AG AAC GAG TGT CCT AGT TGG CTG TG	235-265	FAM	Barendse <i>et al.</i> 1994

Fuente Moreno et al. 2001.

En la Tabla 2, se presentan las condiciones utilizadas para la reacción multiplex de amplificación de los 11 loci microsatélites. Cada reacción de 15 μ L, incluyó 1 μ L de ADN molde en concentración de 50 ng.

TABLA 2. Componentes de PCR para los once microsatélites en una reacción múltiplex.

Componente de PCR	Volumen 1 muestra
Buffer de PCR StockMarks	3,0 μ L
Mezcla de dNTP's	4,0 μ L
Mezcla de cebadores	5,5 μ L
DNA polimerasa AmpliTaq Gold	0,5 μ L
H ₂ O	1 μ L
Volumen Final	14 μ L

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador Mycler de BioradTM, usando una fase de denaturalización inicial de 15 min a 95°C, seguido por 31 ciclos de 45" a 94°C, 45" a 61°C y 1 min a 72°C para la hibridización. Una extensión final fue programada a 72°C por 1 h y luego a 25°C por 2 h.

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al

2% y posteriormente identificados por detección de fluorescencia, mediante electroforesis capilar en secuenciador automático ABITM 3500 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, usando el Dye Set DS-32 (Filter Set F): fluorocromos 5-FAM, JOE, NED y el GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems). Los datos de genotipificación fueron colectados y

analizados en el programa Gene Mapper versión 4.1.5.

Análisis estadístico

A partir de los datos de genotipificación se realizó la revisión de posibles patrones de corrida electroforética (stuttering), amplificación predominante de alelos pequeños (dropout) y detección de alelos nulos, mediante el programa Microchecker v.2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004). Posteriormente, se estimaron las frecuencias alélicas y los parámetros de diversidad de locus tales como el número promedio de alelos por locus (N_a), el número efectivo de alelos por locus (N_e) y la diversidad genética de Nei (H) para todos los marcadores microsatélites en todas las razas, usando el software GenAlEx versión 6.1 (Peakall *et al.* 2006) y el índice de información polimórfica (PIC) con el programa Cervus v.3.0. (Marshall *et al.* 1998). El cálculo de los estimadores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), así como los estadísticos F de Wright F_{IS} (coeficiente de endogamia) y F_{ST} (Diferenciación genética) se realizó con el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2002), incluyendo el cálculo de R_{ST} (Slatkin 1991).

La desviación de los sistemas microsatélites con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para cada locus y para cada población se calculó mediante el programa Arlequín versión 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) usando el método de Cadenas de Markov para 10,000 permutaciones (Guo *et al.* 1992).

La estimación de la estructura genética se realizó por Análisis de Varianza Molecular-AMOVA ejecutando 10.000 permutaciones con el programa Arlequín versión 2005 (Excoffier *et al.* 2005). Con la información de la distancia genética

según Nei (1973), obtenida por el mismo paquete estadístico, se construyó un dendrograma por agrupamiento UPGMA modificado del método NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5 y empleando el programa POPGEN versión 1.32 (Yeh *et al.* 1999).

Basado en los genotipos de los 11 microsatélites, los individuos fueron agrupados en un determinado número de poblaciones y asignados probabilísticamente a grupos inferidos por la metodología Bayesiana implementada en el programa Structure v 2.23 (Falush *et al.* 2007). Los ensayos fueron realizados con base en el modelo de miscigenación (Admixture model) donde las frecuencias alélicas fueron correlacionadas. Para determinar el número apropiado de poblaciones, fueron realizados varios análisis con k (número de poblaciones inferidas) variando de 1 a 5 y 100,000 iteraciones con 10 repeticiones independientes para cada uno de los análisis. Los valores reales de K fueron obtenidos a partir de la magnitud de ΔK , valor en función de K según lo propuesto por Evanno *et al.* (2005) y obtenido en el programa Structure Harvester website (Earl *et al.* 2012). Finalmente, a partir del coeficiente Q , coeficiente de membresía, obtenido del método de agrupamiento del programa Structure v 2.2.3, se estimó el grado de absorción del núcleo criollo por la raza Holstein.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Marcadores microsatélites

La extracción de ADN genómico (*Salting Out*) permitió obtener concentraciones entre 30 y 1200 ng/ μ l. La extracción con el kit FTA resultó efectiva utilizando 1 μ l de este producto en el mix de PCR.

Los 11 microsatélites evaluados resultaron altamente polimórficos en la población bovina de estudio, de acuerdo con lo esperado (ISAG). Todos los loci analizados fueron informativos (PIC = 0,50) y por lo tanto útiles para detectar

variabilidad genética, tal como se indica en la Tabla 3. De estos, el locus TGLA227 fue el más polimórfico con un valor de 0,873, coincidente con los estudios reportados previamente por Alves (2007); Bejarano *et al.* (2012) y Boujenane y Ouragh (2010).

TABLA 3. Estadísticos descriptivos para 11 loci microsatélites en cinco razas bovinas.

Locus	Na	PIC	FIS
BM1824	7	0,77	-0,11
BM2113	11	0,79	0,04
ETH3	11	0,65	-0,05
ETH10	8	0,64	-0,05
ETH225	7	0,75	-0,05
INRA23	11	0,83	0,07
SPS115	6	0,61	0,08
TGLA53	11	0,79	0,43
TGLA122	12	0,72	-0,03
TGLA126	7	0,58	-0,16
TGLA227	19	0,87	-0,06
No, promedio de Alelos por locus (NPA)	10		

Número de alelos (Na), Contenido de información polimórfica (PIC) y estadístico F_{IS} de Wright.

Diversidad genética

El número efectivo de alelos (N_a) con un promedio por locus de 10 para el total de la población evaluada (Tabla 3) y valores promedio de heterocigosidad observada (H_o) superiores a 0,6 para cada raza en el total de loci (Tabla 4), reflejan una cantidad significativamente alta de diversidad genética en las poblaciones.

Los altos niveles de diversidad observados que apoyan investigaciones previas

realizadas para bovinos (Alves 2007; Ruiz 2010; Bejarano *et al.* 2012) podrían explicarse por la miscegenación de razas de orígenes geográficos distintos, y que se han adaptado a condiciones ambientales propias de un país tropical. En este estudio el análisis resultante de los loci BM2113, ETH3, ETH225, TGLA226 y TGLA227 evidenció mayor diversidad genética en la raza Criolla, estimada en mayores valores de alelos por locus y heterocigosidad observada (Tabla 4).

TABLA 4. Número de alelos y valores de heterocigosidad (observada y esperada) para los once loci microsatélites en las cinco razas de ganado bovino del Trópico Alto de Nariño: Criollo (CR), holstein (HL), Jersey (JR), normando (NM) y pardo suizo (PZ).

LOCUS	RZ	Na	Ho	He	LOCUS	RZ	Na	Ho	He
BM1824	CR	5	0,89	0,77	SPS115	CR	5	0,64	0,60
	HL	5	0,91	0,74		HL	4	0,57	0,54
	JR	5	0,71	0,74		JR	6	0,72	0,68
	NM	5	0,82	0,79		NM	2	0,25	0,47
	PZ	7	0,92	0,79		PZ	4	0,50	0,65
BM2113	CR	9	0,90	0,82	TGLA53	CR	8	0,42	0,70
	HL	6	0,83	0,75		HL	6	0,30	0,81
	JR	7	0,68	0,67		JR	8	0,62	0,77
	NM	8	0,60	0,84		NM	7	0,42	0,78
	PZ	7	0,68	0,76		PZ	5	0,33	0,64
ETH3	CR	9	0,92	0,77	TGLA122	CR	8	0,75	0,77
	HL	7	0,77	0,72		HL	8	0,83	0,78
	JR	5	0,52	0,54		JR	7	0,85	0,75
	NM	8	0,67	0,68		NM	8	0,77	0,80
	PZ	8	0,58	0,56		PZ	5	0,44	0,46
ETH10	CR	7	0,73	0,75	TGLA126	CR	6	0,81	0,67
	HL	6	1,0	0,73		HL	5	0,75	0,68
	JR	5	0,57	0,62		JR	3	0,63	0,53
	NM	4	0,71	0,62		NM	5	0,77	0,66
	PZ	5	0,50	0,62		PZ	5	0,65	0,58
ETH225	CR	7	0,86	0,75	TGLA227	CR	14	1,00	0,89
	HL	4	0,77	0,74		HL	7	0,83	0,79
	JR	6	0,69	0,72		JR	9	0,74	0,71
	NM	7	0,83	0,81		NM	12	0,85	0,83
	PZ	6	0,81	0,77		PZ	13	0,96	0,90
INRA23	CR	6	0,69	0,80	PROM	CR	8	0,78	0,75
	HL	5	0,62	0,69		HL	6	0,74	0,72
	JR	9	0,80	0,82		JR	6	0,69	0,69
	NM	5	0,33	0,53		NM	6	0,64	0,71
	PZ	6	0,88	0,76		PZ	6	0,66	0,68

Por lo tanto se esperaría que sea una raza donde se ejerce baja presión de selección como aislamiento geográfico y manipulación biológica (Barrera *et al.* 2006) con patrones de manejo tradicional, como lo observado para otras razas de bovinos en el departamento de Nariño (Solarte *et al.* 2011).

En las poblaciones de bovino Criollo se encontró además, el mayor número de alelos exclusivos y equivalente a 8, resultado que podría estar correlacionado con la antigüedad de la raza y su capacidad adaptativa por dispersión y colonización evidenciando la presencia de polimorfismos ancestrales, (Borgen 1997). Por su parte, la raza Normando, presentó el valor más bajo de diversidad genética (Tabla 4)

posiblemente relacionado con un proceso intensivo de mejora genética (Alves 2007).

Equilibrio Hardy – Weinberg

El análisis multilocus permitió detectar desviaciones al equilibrio Hardy-Weinberg para el locus TGLA53 en las cinco razas de estudio ($p < 0,05$) como se evidencia en la Tabla 5, esta ausencia de equilibrio puede ser explicada por la presencia de alelos nulos en este locus según el método descrito por Brookfield (1996) y por un exceso de homocigotos ($F_{IS} = 0,43$). En la especie *Bos indicus* resultados similares se atribuyen a la endogamia, efecto Wahlund y selección en contra de los heterocigotos (Escobar *et al.* 2009).

TABLA 5. Valores del estadístico F_{IS} y Equilibrio Hardy – Weinberg para los once loci microsatélites en las cinco razas de ganado bovino del Trópico Alto de Nariño: Criollo (CR), holstein (HL), Jersey (JR), normando (NM) y pardo suizo (PZ).

LOCUS	RZ	Fis	EHW	LOCUS	RZ	Fis	EHW (p-valor)
BM1824	CR	-0,13	0,73	SPS115	CR	-0,05	0,53
	HL	-0,18	0,85		HL	-0,02	0,44
	JR	0,06	0,54		JR	0,02	0,20
	NM	-0,007	0,23		NM	0,66	0,43
	PZ	-0,12	0,67		PZ	0,32	0,34
BM2113	CR	-0,07	0,22	TGLA53	CR	0,42	0,01
	HL	-0,07	0,96		HL	0,66	0,0004
	JR	0,005	0,15		JR	0,22	0,005
	NM	0,30	0,06		NM	0,48	0,00008
	PZ	0,16	0,04		PZ	0,51	0,02
ETH3	CR	-0,15	0,32	TGLA122	CR	0,06	0,44
	HL	-0,02	0,76		HL	-0,04	0,91
	JR	0,06	0,87		JR	-0,11	0,89
	NM	0,03	0,14		NM	0,07	0,43

LOCUS	RZ	Fis	EHW	LOCUS	RZ	Fis	EHW (p-valor)
ETH10	PZ	-0,02	0,89	TGLA126	PZ	0,08	0,58
	CR	0,06	0,26		CR	-0,18	0,72
	HL	-0,30	0,24		HL	-0,06	0,16
	JR	0,11	0,88		JR	-0,17	0,21
	NM	-0,07	1,0		NM	-0,14	0,85
ETH225	PZ	0,26	0,13	TGLA227	PZ	-0,10	0,58
	CR	-0,13	0,29		CR	-0,10	0,46
	HL	0,004	0,33		HL	-0,01	0,59
	JR	0,06	0,11		JR	-0,02	0,91
	NM	0,44	0,14		NM	-0,01	0,42
INRA23	PZ	-0,09	0,10	PROM	PZ	-0,04	0,56
	CR	0,17	0,06		CR	-0,01	
	HL	0,16	0,12		HL	0,01	
	JR	0,05	0,76		JR	0,03	
	NM	-0,05	0,03		NM	0,16	
	PZ	0,57	0,36		PZ	0,14	

La raza Pardo Suizo presentó una desviación al equilibrio en el locus BM2113, también por un exceso de homocigotos ($F_{IS} = 0,16$). Por su parte, para la raza Normando se encontró una desviación del equilibrio para el locus INRA23, por un moderado exceso de heterocigotos ($F_{IS} = -0,054$) y explicado además por posibles errores en la genotipificación, a la selección por sobredominancia o al cruzamiento entre las poblaciones (Egito *et al.* 2007).

El cálculo de F_{IS} , es un estadístico que toma valores entre -1 a 1; valores negativos evidencian exceso de heterocigotos y valores positivos un exceso de homocigotos. Además, valores entre 0 y 0,005 describen bajos niveles de endogamia; valores entre 0,006 y 0,15 moderados; entre 0,16 y 0,25 altos, y muy altos cuando

son mayores que 0,25 (Martinez 2008). En la Tabla 5, se observan los valores de la determinación del estadístico F_{IS} para medir endogamia en las razas. Se observa que las razas Criollo, Holstein, Jersey y Pardo Suizo presentan valores moderados de endogamia, resultado correspondiente al encontrado en estudios previos para el trópico alto de Nariño con bovinos lecheros principalmente Holstein, donde se encontró un porcentaje de endogamia más elevado que el recomendado (Solarte 2011). Por su parte, un nivel alto de endogamia se encontró en la raza Normando, hecho que puede reflejar un manejo reproductivo más intenso con el uso de un relativo número pequeño de toros de alto valor como donadores de semen en las prácticas de reproducción asistida (Escobar *et al.* 2009).

Diferenciación genética y relaciones entre razas

El análisis molecular de varianza (AMO-VA) reveló que el 5,26% de la variación

total está atribuido a diferencias entre poblaciones y el 94,7% a la diferenciación existente entre los individuos dentro de las razas (Tabla 6).

TABLA 6. Análisis de varianza molecular AMOVA.

Fuente de variación	Df	Sc	Estimativa de Varianza	%
Entre poblaciones	4	9,984	0,03936 Va	5,26
Dentro poblaciones	225	159,459	0,70871 Vb	94,74
Total	229	169,443	0,74807	

Grados de libertad (Df), Suma de cuadrados (Sc), porcentaje de variación (%)

El cálculo del índice de fijación F_{ST} , mostró una baja diferenciación genética entre razas y ausencia de estructura genética, equivalente a 6,63% ($F_{ST} = 0,06$) de variación (resultados significativos después de la corrección de Bonferroni $p < 0,05$). El índice R_{ST} como estimador específico para marcadores microsatélites fue menor que para F_{ST} ($R_{ST} = 0,057$), resultado que sugiere que la moderada diferenciación entre las razas involucra principalmente las frecuencias alélicas

más que las diferencias en el tamaño de los alelos debido al comportamiento mutacional de los microsatélites (Cervini *et al.* 2006).

Las distancias genéticas de Nei indicaron que la raza Criollo y la Holstein son las más cercanas genéticamente al presentar el menor valor de distancia y el mayor valor de identidad. Mientras que valores mayores de distancia y con la menor identidad fueron observados entre la raza Criolla y Normando (Tabla 7).

TABLA 7. Distancias genéticas entre pares de poblaciones, con los valores de identidad (arriba de la diagonal) y las distancias genéticas (debajo de la diagonal) según Nei (1973).

	Criollo	Holstein	Jersey	Normando	Pardo
Criollo	*	0,8797	0,7966	0,7238	0,8330
Holstein	0,1282	*	0,7957	0,7270	0,7994
Jersey	0,2274	0,2285	*	0,7242	0,8045
Normando	0,3233	0,3188	0,3226	*	0,7640
Pardo	0,1828	0,2239	0,2175	0,2692	*

En concordancia con estos resultados, la reconstrucción filogenética del dendrograma UPGMA basado en las distancias gené-

ticas, muestra a las razas Criolla y Holstein cercanamente relacionadas y separadas de otros clúster (Figura 1), lo que podría sugerir

un mayor indicio de introgresión de genes en estas dos razas, resultados similares a los encontrados en el departamento del Valle del Cauca (Escobar *et al.* 2009).

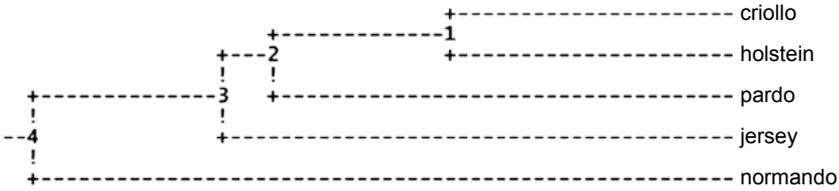


FIGURA 1. Reconstrucción del dendrograma por agrupamiento UPGMA modificado del método NEIGHBOR de PHYLIP v.3.5. indicando las relaciones filogenéticas entre las cinco razas de *Bos taurus*.

El análisis bayesiano soporta la presencia de dos poblaciones genéticas ($k = 2$, con un $\Delta K = 5,0$), que agrupan las cinco razas de estudio en dos clúster. El diagrama muestra que ha ocurrido mezcla, resultado semejante a la agrupación UPGMA para razas (Figura 2). Así mismo, los resultados de la asignación

de individuos a clúster indica una fuerte coincidencia genética entre los individuos de las razas Holstein y Criollo, con indicaciones de una introgresión de genes en ambas direcciones, mientras que los individuos de la raza Jersey presentan la menor coincidencia genética con respecto a al resto de razas.

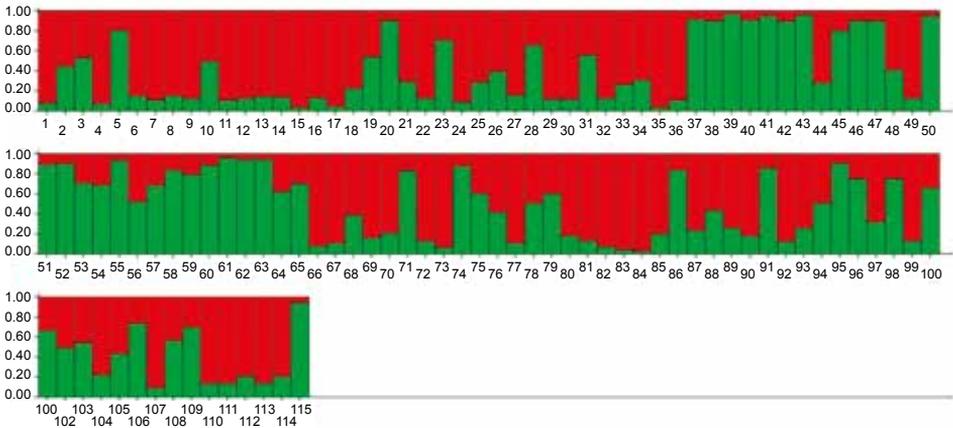


FIGURA 2. Agrupamiento de las cinco razas bovinas inferido por el método estadístico Bayesiano usando el programa Structure. Cada individuo está representado por una línea vertical dividida en segmentos en los cuales el tamaño y el color corresponden a la relativa proporción del genoma del animal correspondiente a un clúster particular, 1-24: Criollo; 25-37: Holstein; 38-64: Jersey; 65-102: Normando; 113-115: Pardo, (16 muestras no informativas).

De otra parte, existe un flujo genético entre las razas analizadas el cual se podría deber a los cruzamientos dirigidos para incrementar el volumen de leche/día, teniendo como base la Holstein. Resultados similares se explican en estudios previos realizados por el Programa de Mejoramiento Genético Animal (Solarte *et al.* 2009). Estas prácticas promueven el flujo genético entre regiones lo que resulta en una homogenización recurrente de las frecuencias alélicas por lo que también se evidencia una ausencia de sub-estructura genética para cada raza.

La raza Jersey por su parte, al presentar un menor grado de mezcla, refleja su introducción reciente en el trópico alto de Nariño y explica la presencia de un número mayor de hatos puros.

En cuanto a las razas Criollo y Holstein, su manejo dentro de los actuales sistemas de producción da cuenta del indicio de introgresión de genes en ambas razas

(Figura 3). El grado de absorción de 56% por parte de la raza especializada Holstein, afectaría la pureza existente de esta con una consecuente pérdida de combinaciones alélicas en diferentes loci (haplotipos) que suelen ser la base de las adaptaciones locales (Amador 2013) y de características como la alta calidad de la leche que se ha hecho evidente para hatos del trópico alto de Nariño (Solarte *et al.* 2009).

Estos análisis de agrupamiento implementados en el estudio indican la alta identidad genética entre las razas Criollo y Holstein, explicado posiblemente por un intenso flujo genético reciente o a un pasado común. Para el trópico alto de Nariño, la similitud entre estas dos razas se explica en gran medida por el uso de reproductores únicos en un tiempo reciente y porque la mayoría de los ejemplares de los hatos existentes en la región, e incluidos en este estudio, sean el resultado del cruce entre ellas.

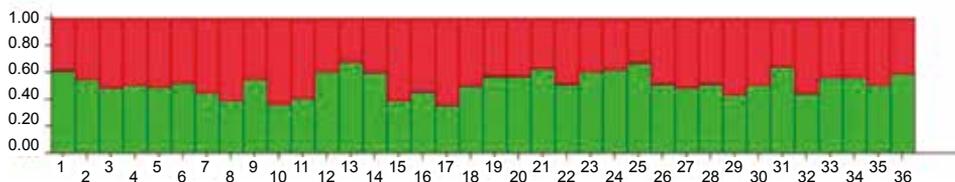


FIGURA 3. Asignación probabilística de individuos de la raza Holstein y Criollo a grupos, 1-24: Criollo, 25-36: Holstein. Color rojo, grupo 1, inferido para la raza Criolla y color verde, grupo 2, inferido para la raza Holstein.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se espera que a largo plazo el uso recurrente de cruces dirigidos al incremento de producción, influya en la pérdida de la adaptación resultado de la selección natural y la posibilidad de

desarrollar razas tropicales competitivas y eficientes (Bejarano *et al.* 2012; Lirón *et al.* 2002). Es por ello que algunos autores recomiendan la necesidad de restringir el uso de germoplasma importado (de razas especializadas como la Holstein) e iniciar

programas de selección en las poblaciones de razas criollas bovinas.

CONCLUSIONES

Los 11 microsatélites resultaron altamente informativos para evaluar estructura poblacional.

Los grados de heterocigosidad resultaron similares a otros hatos de América Latina.

Los F_{ST} son indicadores de intenso flujo genético.

Se aconseja la implementación de programas de conservación tendientes a mantener la variabilidad genética observada.

REFERENCIAS

- Alves A. 2007. Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microsatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação. [Tesis Doctoral]. [Brasilia (BR)]: Universidade de Brasília.
- Amador C. 2013. Estratégias de manejo poblacional para revertir introgresión de genes exógenos [tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid.
- Aquino YN, Veli EA, Rivas E, Rivas V, Estrada R. 2008. Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites. Arch. Zootec. [Internet]. [Citado 22 abr. 2015]; 57(219): 337-340. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/22_10_27_08NotaVariabilidadAdAquino.pdf.
- Barker JS. 2001. Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. Can. J. Forest. Res. 31(4): 588-595.
- Barrera GP, Martínez R, Pérez JE, Polanco N, Ariza F. 2006. Evaluación de la variabilidad genética en ganado criollo colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. Agri. [Internet]. [Citado 22 abr. 2015]; 38: 35-45. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0540t/a0540t03.pdf>.
- Bejarano D, Pedraza A, Rocha JFM, Martínez R. 2012. Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano. Revista Corpoica [Internet]. [Citado: 22 abr. 2015]; 13(1): 97-107. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/RevistaCientificaCorpoica-Capitulo12.pdf>.
- Borgen L. 1997. Genetic differentiation in endemic Lobularia (Brassicaceae) in the Canary Islands. Nord. J. Bot. 16(6): 487-503. Doi: 10.1111/j.1756-1051.1996.tb00263.x.
- Boujenane I, Ouragh L. 2010. Genetic Analysis of native Moroccan cattle. LRRD [Internet]. [Citado 9 nov. 2014]; 22 (8). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd22/8/bouj22154.htm>.
- Brookfield JFY. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Mol. Ecol. 5(3): 453-455. Doi: 10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x.
- Cervini M, Henrique F, Mortari N, Jr E. 2006. Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nelore cattle (*Bos indicus*). Genet. Mol. Biol. [Internet]. [Citado: 7 nov. 2014]; 29(3): 486-490. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000300015.
- Chakraborty R. 1992. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. Hum. Biol. 64(2): 141-159.
- Earl DA, VonHoldt BM. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method - Technical Note. Conservation Genet. Resour. 4(2): 359-361. Doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Egito AA, Paiva SR, Albuquerque M, Mariante AS, Almeida LD, Castro SR, Grattapaglia D. 2007. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. BMC genetics. 8(83): 1-14. Doi: 10.1186/1471-2156-8-83.
- Escobar C, Olivera M, Ostos H, Guerra T. 2009. Genetic variability of the zebu cattle breed (*Bos indicus*) in the department of Huila, Colombia using microsatellite molecular mark-

- ers. *Acta Biol. Colomb* [Internet]. [Citado 30 mar. 2015]; 14(3): 173-180. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2009000300013&script=sci_arttext.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14(8): 2611–2620. <http://research.amnh.org/~rfr/evanno05.pdf>.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.* 1: 47–50.
- Falush D, Pritchard J. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol.* 7(4): 574–578. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Ferreira AP. 2008. Caracterização genética de uma população do gado crioulo Pé – Duro do Piauí, através de marcadores microsatélites [tese de doutorado]. [Ribeirão Preto, Brasil]: Universidade de São Paulo.
- González EG. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia.* 59(2-3): 377–388.
- Goudet J. 2002. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2) [Internet]. Lausanne (SW): Department of Ecology & Evolution, UNIL; [Citado: 31 mar. 2015]. Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48(2): 361–372. Doi: 10.2307/2532296.
- Lirón J, Ripoli M, Luca J, Giovambattista G. 2002. Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genet Mol Biol.* 25(4): 413–419. Doi: 10.1590/S1415-47572002000400010.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE, Pemberton JM. 1988. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- Martínez DG. 2008. Diversidad genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación: ejemplos de aplicación en la raza de Lidia [tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid.
- Moreno F, Carvajal G, Bermúdez N, Derr J, Berdugo J, Barrera J, Scott D. 2001. Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. *Revista Corpoica* [Internet]. [Citado: 22 abr. 2015]; 3(2): 17–23. Disponible en: http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/3_Diversidadgeneticayrelacion.PDF.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(12): 3321–3323.
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills D, Shipley P. 2004. Program note. Microchecker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol* [Internet]. [Citado 22 abr. 2015]; 4: 535-538. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x/pdf>.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol.* 6(1): 288-295. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- Piñero D. 2008. El conocimiento de la variabilidad genética. En: *Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad.* Ciudad de México (MX): Conabio. p. 425–435. [Citado 22 abr. 2015]. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I14_Lavariabilidadgen.pdf.
- Pizarro G, Mujica F, Felmer R. 2009. Estructura poblacional y diversidad genética de rebaños bovinos de carne del sur de Chile. *AgroSur* 37(1): 60–83. Doi: 10.4206/agrosur.2009.v37n1-07.
- Quiroz J. 2007. Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas [tesis doctoral]. [Córdoba, España]: Universidad de Córdoba.
- Ruiz LM. 2010. Determinación de la variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de ganado criollo colombiano de raza Romosinuano mediante marcadores moleculares tipo microsatélite [tesis de Maestría]. [Bogotá, Colombia]: Pontificia Universidad Javeriana.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3.º ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press..

- Slatkin M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58(2): 167-175.
- Solarte CE, Rosero CY, Eraso YM, Zambrano GL, Barrera DC, Martínez OA, Guerrón ML, Chaves FP. 2011. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos Holstein del Trópico Alto de Nariño. LRRD [Internet]. [Citado 8 oct. 2014]; 23(6). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd23/6/sola23136.htm>.
- Solarte CE, Rosero CY, Eraso JM, Zambrano GL, Cárdenas H, Burgos WO. 2009. Frecuencias alélicas del gen Kappa caseína en la raza Holstein del trópico alto de Nariño – Colombia. LRRD [Internet]. [Citado 20 oct. 2014]; 21(1). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd21/1/sola21003.htm>.
- Yeh F, Yang R, Boyle T. 1999. Popgene version 1.31 Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Quick user guide [Internet]. [citado 20 abr. 2015] Disponible en: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>.
- Zamorano MJ, Género ER, Rodero A, Vega JL, Rumiano FJ. 1998. Caracterización genética de Ganado bovino criollo argentino utilizando microsatélites. *Arch. Zootec.* 47: 273-277.

Article citation:

Mejía LG, Hernández RA, Rosero CY, Solarte CE. 2015. Análisis de la diversidad genética de ganado bovino lechero del trópico alto de Nariño mediante marcadores moleculares heterólogos de tipo microsatélite [Analysis of genetic diversity of dairy cattle in the high tropic of Nariño by molecular heterologous microsatellite markers]. *Rev Med Vet Zoot.* 62(3): 18-33.
 Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v62n3.54938>.