

Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites

G.P. Barrera, R. Martinez, J.E. Perez, N. Polanco & F. Ariza

CORPOICA, Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal,
Avda El Dorado 42-42, Bogotá, Colombia

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estimar la variabilidad y las relaciones filogenéticas entre 6 razas de ganado criollo colombiano, cebú Brahman y la española Pirenaica, mediante el uso de 12 marcadores moleculares tipo microsatélite. El número promedio de alelos fue de 11.58 con los valores más altos para los marcadores HEL 13 y ETH 10. La heterocigocidad promedio de todas las razas fue de 0.7 y el coeficiente de endogamia fue de 0.097, con los valores más altos para la raza Romosinuano. Los mayores valores de diversidad se presentaron en la raza Casanareño. La distancia genética entre las razas criollas colombianas y la raza española Pirenaica fue amplia (0.7-1.7) indicando posiblemente poca intervención de esta raza en el origen de las razas criollas. En general, las mayores distancias genéticas se presentaron entre las razas de origen *Bos taurus* (razas criollas colombianas y Pirenaica) con respecto a la *Bos indicus* (Brahman).

Summary

The present study was carried out with the aim of assessing the genetic diversity and estimating the phylogenetic relationships between six of the Creole Colombian cattle breeds and the Zebu Brahman breed, using a panel of 12 microsatellites and the sequencing of the D-Loop fragment from the mitochondrial DNA. The average allele

number was 11.58 with the highest values for the HEL13 and ETH10 microsatellites. The mean heterozygosity was 0.7 and the coefficient of inbreeding was 0.097, with the highest values for the Romosinuano breed. Similarly, the largest values for diversity appeared in the Casanareño breed, using the two approaches. The resulting haplotypes from the D-Loop fragment within the Creole breeds and in the Zebu Brahman were predominantly *Bos taurus* of European origin, which suggests a taurine maternal origin for these breeds.

Palabras clave: Diversidad genética, Ganado bovino, Microsatélites, Raza Casanareño, Raza Romosinuano, Raza Costeño con Cuernos, Raza Blanco Orejinegro, Raza San Martinero, Raza Hartón del Valle.

Introducción

Colombia posee 7 razas reconocidas de ganado criollo: Romosinuano (Romo) y Costeño con Cuernos (CCC) en la Costa Atlántica, Blanco Orejinegro (BON) y Chino Santandereano (Chino) en la zona montañosa, Hartón del Valle (Hartón) en el valle del río Cauca, Casanareño y San Martinero en la Orinoquía (Martínez, 2004). Estas razas son el producto de un largo proceso de selección natural de los primeros bovinos introducidos por Cristóbal Colón durante la conquista Española (Rouse, 1977). Los primeros bovinos que llegaron a América, arribaron a la isla denominada La Española (hoy Santo Domingo) y desde allí entraron a Colombia por Santa Marta

formando el primer núcleo ganadero del país. Posteriores ingresos se realizaron por oriente, con ganados importados desde Venezuela y por el sur desde Ecuador. (Pinzón 1984). Los descendientes de esas importaciones coloniales adquirieron características adaptativas de gran importancia, como tolerancia al calor y la humedad, resistencia a ciertas enfermedades infecciosas, alta eficiencia reproductiva y longevidad (Pinzón 1984, Carvajal Carmona, 2003), lo cual incrementó su valor como recurso genético. Algunas de las características externas comunes en las razas criollas colombianas son el pelaje de color amarillo, excepto en el BON, presencia de cuernos, excepto en el ROMO, orejas pequeñas, piel pigmentada y ombligo corto (Martínez, 2004). Dada la importancia del criollo y la disminución considerable de su población, el estado colombiano implementó políticas de conservación en donde se adelantan programas de caracterización morfológica, zootécnica y genética. Como aporte a esta caracterización, el presente

trabajo pretende estimar la variabilidad genética y relaciones filogenéticas de 6 razas criollas colombianas y la raza Brahman mediante la genotipificación con 12 marcadores tipo microsatélite.

Materiales y Métodos

Para la genotipificación con microsatélites, se analizaron 80 animales, no emparentados, representantes de 6 razas bovinas criollas colombianas: Romosinuano (10) (Figura 1), Costeño con Cuernos(10) (Figura 2), Blanco Orejinegro (10) (Figura 3) y San Martinero (10) (Figura 4), provenientes de núcleos de conservación del Ministerio de Agricultura (CORPOICA), Casanareño (10) (Figura 5) y Hartón del Valle (10) (Figura 6), provenientes de núcleos comerciales privados.

Adicionalmente, se incluyeron animales de la raza Cebú Brahman (10) y animales de la raza Española Pirenaica (10) como control externo. El ADN se obtuvo a partir de muestras de semen congelado o de sangre



Figura 1. Toro de raza Romosinuano.



Figura 2. Toro de raza Costeño con cuernos.

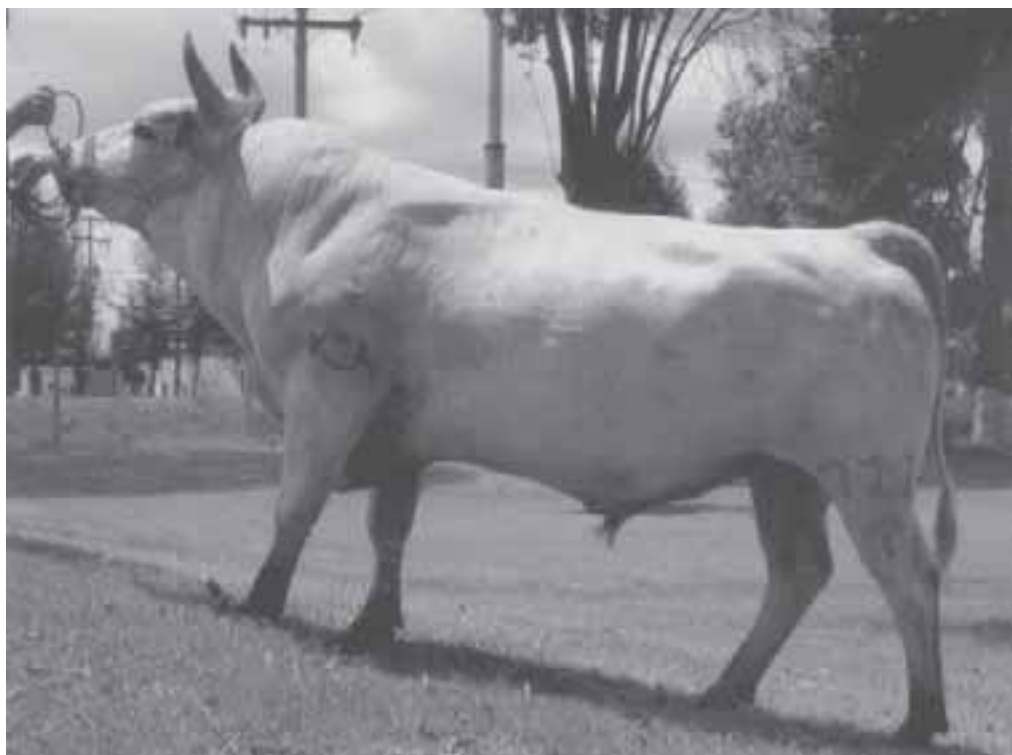


Figura 3. Toro de raza Blanco Orejinegro.

Tabla 1. Marcadores microsatélite y secuencias de los iniciadores utilizados en el presente estudio.

Marcador	Crom	Secuencia de iniciador
ETH 10	5	GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH 225	9	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
ETH 3	19	GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G
BM1818	23	AGC TGG GAA TAT AAC CAA AGG AGT GCT TTC AAG GTC CAT GC
BM1824	1	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
HEL 13	11	TAA GGA CTT GAG ATA AGG AG CCA TCT ACC TCC ATC TTA AC
HEL 5	21	GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC
HEL 1	15	CAA CAG CTA TTT AAC AAG GA AGG CTA CAG TCC ATG GGA TT
INRA 005	12	CAA TCT GCA TGA AGT ATA AAT AT CTT CAG GCA TAC CCT ACA CC
INRA 063	18	ATT TGC ACA AGC TAA ATC TAA CC AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G
ILSTS030	2	CTT AGA CAA CAG GGG TTT GG CTG CAG TTC TGC ATA TGT GG
BMC 1009	5	ACC GGC TAT TGT CCA TCT TG GCA CCA GCA GAG AGG ACA TT

según disponibilidad. El protocolo de extracción de ADN se desarrolló de acuerdo con los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, (1989).

Genotipificación

Se utilizaron 12 microsatélites, 10 de ellos tomados del grupo de sistemas genéticos

recomendados por la FAO para estudios de variabilidad genética (Tabla 1). La amplificación se realizó mediante PCR multiplex con 50 ng de ADN, 200 μ M de dNTP (Pharmacia Biotech, USA), 0.5 μ M de cada uno de los iniciadores directo y reverso, 2U de Taq ADN polimerasa (Promega, USA) y 2.25 mM de MgCl₂ (Promega, USA). El volumen total de la reacción fue de 25 μ l. La PCR se realizó en un termociclador PTC 100

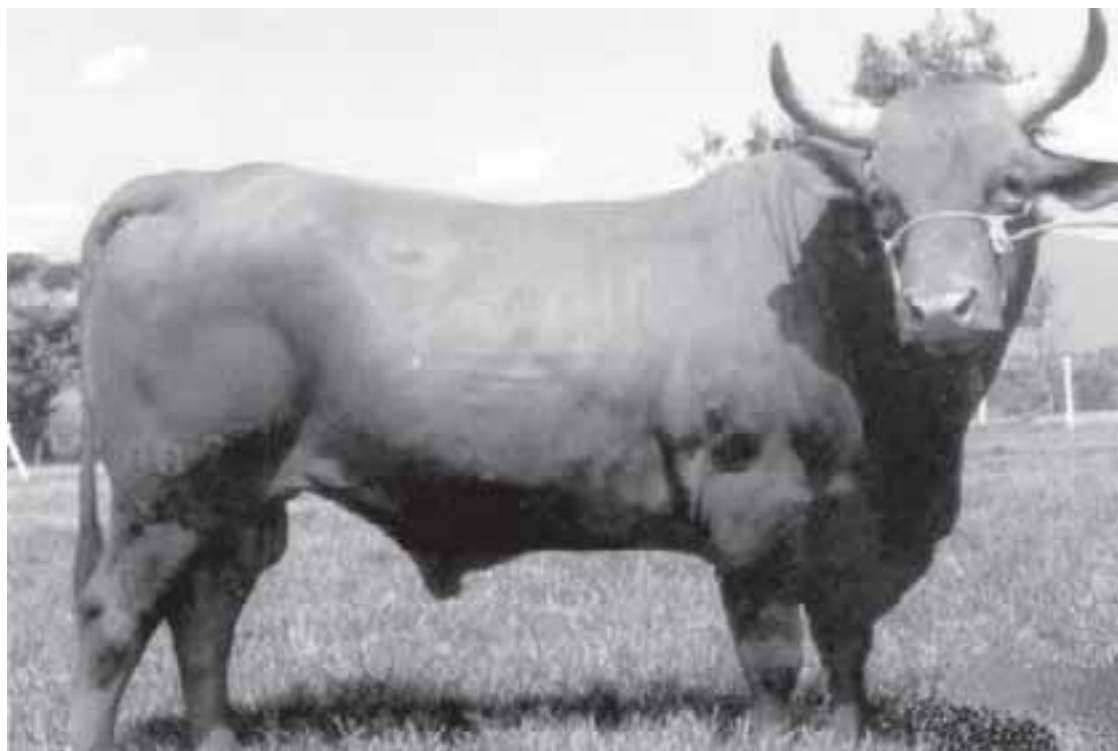


Figura 4. Toro de raza San Martinero.

(MJ Research, INC) programado con un ciclo de plataforma.

Los productos de amplificación junto con un marcador de peso molecular de 10 pb y 25 pb (Invitrogen, USA) fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% (59:1) en condiciones denaturantes (Urea 7M) a 1 800 voltios por 3 horas. Para la visualización de los fragmentos, los geles fueron teñidos con nitrato de plata y su tamaño se calculó por medio del programa GeneSnap de SYNGENE (Figura 7).

Análisis de la información

Para el análisis de la genética de poblaciones se utilizó el programa GENE POP versión 3.3

(Laboratoire du Genetique et Enviroment, Montpellier, France), y las distancias genéticas se calcularon mediante tres metodologías (Nei, Cavalli-Sforza y Reynolds) incluidas en el programa Phylip (Felsenstein, 1993). Para la construcción del árbol se utilizó la distancia de Nei y el algoritmo UPGMA incluido en el mismo programa.

Todas las pruebas y análisis se realizaron en el laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal de CORPOICA.

Resultados

Por medio de la genotipificación con 12 microsatélites, se identificaron un total de 139 alelos en 8 razas analizadas, con un promedio de 11.58 de alelos por marcador. El marcador ILST030 presentó el menor número de alelos, mientras que los marcadores HEL13 y ETH 10 fueron los más

Tabla 2. Alelos, heterocigocidad e índices Fis por raza.

Raza	Ap	He	Ho	Fis
BON	5.8	0.80	0.72	0.10
CAS	6.5	0.82	0.77	0.06
CCC	5.5	0.77	0.64	0.16
CEB	4.3	0.64	0.60	0.07
EPI	5.8	0.74	0.77	-0.05
HVA	5.9	0.81	0.76	0.06
ROM	5.5	0.78	0.59	0.25
SMA	5.0	0.83	0.78	0.08
Mean	5.5	0.77	0.70	0.095

Ap= Número Promedio Alelos.

He= Heterocigocidad esperada.

Ho= Heterocigocidad observada.

Fis= Coeficiente de consanguinidad.

polimórficos en la población (17 y 14 alelos respectivamente). El número promedio de alelos (NPA) por raza fue de 5.5, con el mayor valor en la raza Casanareña (6.5 alelos) y el menor en la raza Brahman (4.3 alelos) (Tabla 2).

La heterocigocidad promedio fue de 0.7, con los valores más bajos en las razas Romosinuano (0.59) y Brahman (0.6) y los más altos en las razas San Martinero (0.78) y Casanareño (0.7).

El valor del coeficiente de endogamia (Fis) para toda la población de estudio fue de 0.095. (Tabla 2) con valores altos en la raza Romosinuano (0.25) y los más bajos para las razas Casanareño y Hartón del Valle (0.06).

La raza española Pirenaica presentó un valor negativo debido a que el valor de heterocigocidad observado fue más alto que el esperado, mostrando un exceso de heterocigotos. Es importante anotar que la raza Brahman presentó valores de endogamia bajos, por debajo del promedio de la población de estudio.

Para el análisis de diversidad, mediante la metodología que presenta el programa Gene Pop, que computa la diversidad dentro de individuos (1-Quintra) y entre individuos dentro de poblaciones (1-Quinter), se encontró que la raza Brahman presentó los menores valores tanto dentro de individuos como entre individuos (0.59 y 0.65,

Tabla 3. Diversidad dentro de individuos ("1-Quintra") y entre individuos dentro de poblaciones ("1-quinter").

Raza	1-Quintra	1-Quinter	Fis-
BON	0.718182	0.805520	0.1084
CAS	0.780952	0.839341	0.0696
CCC	0.641304	0.767883	0.1648
CEB	0.598131	0.651035	0.0813
EPI	0.785047	0.734138	-0.0693
HVA	0.746988	0.816889	0.0856
ROM	0.595745	0.804420	0.2594
SMA	0.739131	0.806436	0.0835



Figura 5. Toro de raza Casanareño.



Figura 6. Raza Hartón del Valle.

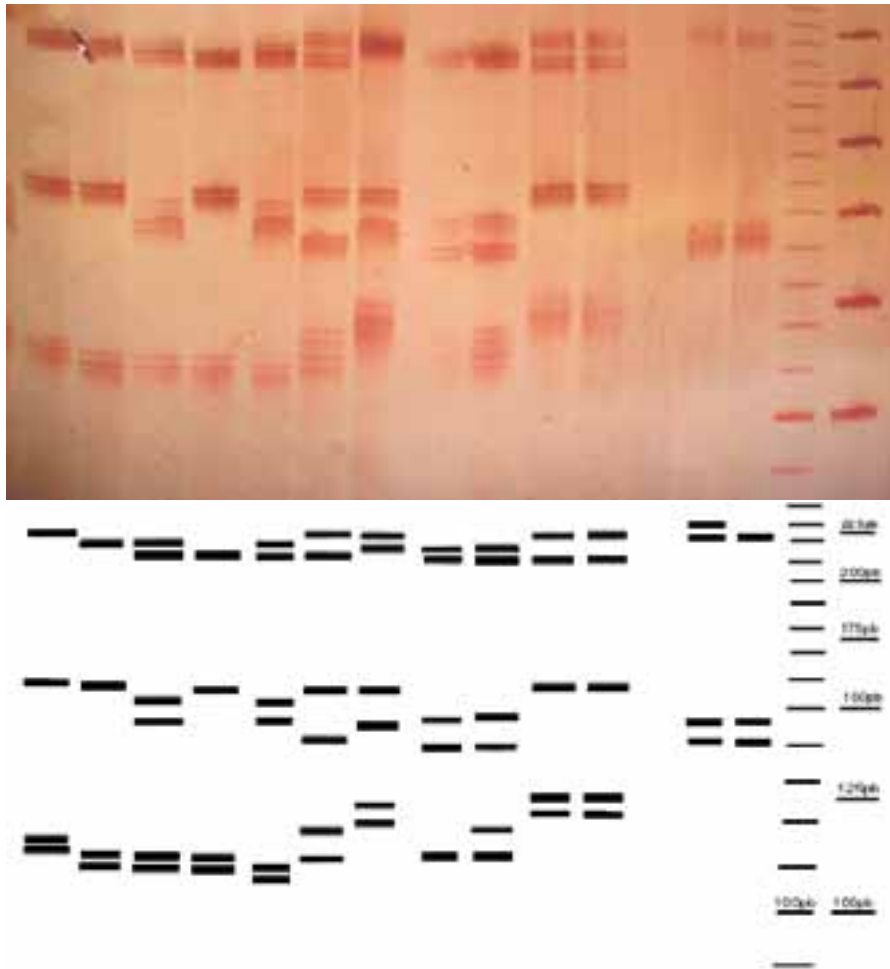


Figura 1. Productos de una PCR multiplex con 3 marcadores microsatélite (ETH10, ETH225 y ETH3). En la parte inferior, esquema del gel mostrando los diferentes alelos comparados con los marcadores de peso molecular 10 bp y 25 bp (Invitrogen, USA).

respectivamente) a pesar de su bajo coeficiente de endogamia. La raza Casanareña presentó los valores más altos de diversidad (0.78 y 0.83, respectivamente). (Tabla 3)

A partir del cálculo de las frecuencias alélicas se realizaron las medidas de distancias genéticas calculadas por tres diferentes metodologías, Nei, Cavalli-Sforza y la distancia de Reynolds, donde se presentaron valores y proporciones de distancia similares entre razas, así como en la topología del árbol (datos no mostrados). Se muestran los datos obtenidos con una de las medidas más comúnmente utilizadas, la distancia genética de Nei (1972), la cual

asume que todas las diferencias genéticas surgen a partir de deriva genética pura y tiene en cuenta un modelo de mutación de alelos infinitos (Tabla 4). En términos generales, la raza española Pirenaica presentó valores de distancia genética altos con respecto a las razas criollas, siendo la San Martinero la más cercana (0.77) y la Romosinuano la más lejana (1.1). Todas las razas de origen *Bos taurus* (criollas colombianas y española Pirenaica) presentaron las mayores distancias con respecto a la raza de origen *Bos indicus* (Brahman) con valores entre 0.71 para la raza Hartón del Valle y 1.75 para la raza española Pirenaica. Dentro de las razas criollas colombianas, las razas BON y

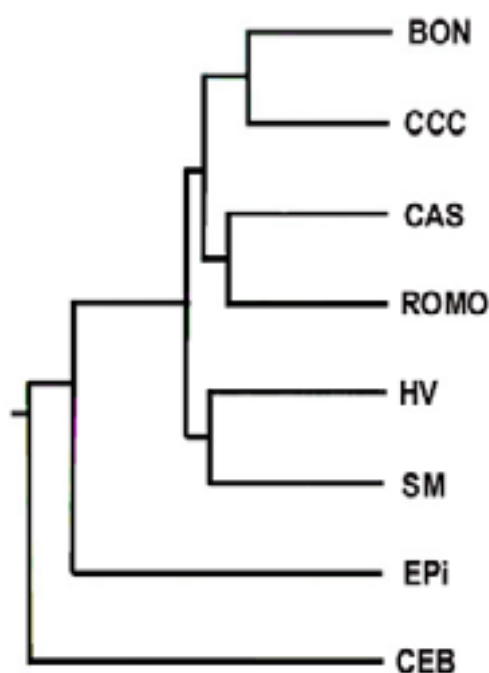


Figura 8. Arbol de relaciones filogenéticas entre seis razas criollas colombianas, una raza autóctona española y la raza Brahman, utilizando la D_s de Nei (1972) y el algoritmo UPGMA.

Costeño con Cuernos presentaron los menores valores de distancia genética entre ellas (0.34). La topología del árbol construido con el algoritmo muestra dos grupos separados para las razas *Bos taurus* y *Bos indicus* (Figura 8). La raza española Pirenaica se encuentra separada del grupo que conforman las razas criollas colombianas.

Tabla 4: Matriz de distancia genética estándar de Nei (1972) entre seis razas criollas colombianas, una raza autóctona española y la raza Brahman.

Raza	BON	CAS	CCC	CEBU	EPI	HVA	ROMO	SMA
BON	---	0.5074	0.3473	0.8161	0.9242	0.5663	0.5533	0.6334
CAS	0.5074	---	0.6803	0.8171	0.9210	0.6010	0.4593	0.7511
CCC	0.3473	0.6803	---	1.2403	0.8961	0.5759	0.4325	0.5086
CEB	0.8161	0.8171	1.2403	---	1.7529	0.7109	1.1891	0.9874
EPI	0.9242	0.9210	0.8961	1.7529	---	0.9377	1.1047	0.7756
HVA	0.5663	0.6010	0.5759	0.7109	0.9377	---	0.6579	0.4975
ROM	0.5533	0.4593	0.4325	1.1891	1.1047	0.6579	---	0.6126
SMA	0.6334	0.7511	0.5086	0.9874	0.7756	0.4975	0.6126	---

Discusión

En el presente trabajo, se analizaron 7 razas de origen *Bos taurus* (6 razas criollas colombianas y una española) y una raza de origen *Bos indicus* (Brahman), mediante la genotipificación con 12 marcadores tipo microsatélite. El número promedio de alelos (NPA) considerado como buen indicador de variabilidad genética debido a la diversidad alélica, se encontró dentro de los parámetros recomendados por la FAO (sugieren al menos 5 diferentes alelos por locus) para estimación de distancia genética. Un valor más bajo (8.8) reportó un trabajo previo realizado en razas criollas colombianas (Bedoya *et al.*, 2002), debido a la utilización de diferentes y menor número de marcadores. De igual manera, el número promedio de alelos (NPA) por raza encontrado en el presente trabajo (5.5) fue mayor al reporte de Bedoya (2002). Por otra parte, el NPA hallado en la raza española Pirenaica es similar al reportado por Cañón (2001) para esta misma raza.

La endogamia para toda la población (debida a cruces entre individuos cercanamente emparentados) estimada por el coeficiente F_{is} (0.095), y la heterocigocidad observada promedio (0.7), fueron similares a los datos reportados por Bedoya (2002) en razas criollas colombianas (0.13 y 0.67, respectivamente). Es importante anotar, que las heterocigocidades observadas en las razas criollas son altas debido a que estas razas no

han sufrido procesos de selección tales como aislamiento genético y manipulación biológica.

En general, dentro de las razas criollas, la raza Casanareño presentó la mayor variabilidad, representada en el mayor NPA, la mayor heterocigocidad y el menor coeficiente de consanguinidad. De igual manera, en los análisis de diversidad dentro de individuos y entre individuos, la raza Casanareña presenta los mayores valores. Este resultado no coincide con lo reportado por Bedoya (2002), sin embargo, sus datos se obtuvieron de 4 animales, el menor número de toda la población en su estudio. De manera contraria, en el presente trabajo, la raza Romosinuano presentó la menor variabilidad dentro de las razas criollas, su NPA fue el más bajo después de la raza Brahman y su Heterocigocidad observada fue la más baja de toda la población. Adicionalmente, la raza Romosinuano junto con la Costeño con cuernos presentaron los valores más elevados de coeficiente de endogamia lo que pone estas dos razas como las de menor variabilidad dentro de las razas criollas colombianas (Bedoya *et al.*, 2002). En un estudio de diversidad con ADN mitocondrial se ratifica que la raza Romosinuano presenta la menor diversidad dentro de las criollas colombianas (Carvajal-Carmona, 2003). Estos hallazgos se deben a que esta raza sufrió una disminución de población que se presentó desde el censo de 1986 (3 262 animales puros) hasta el censo de 1999 (2 014 animales puros) (Bejarano, 1986; Martínez, 1999).

La raza Brahman presentó los valores de NPA y de Heterocigocidad más bajos de toda la población de este estudio, lo cual demuestra la baja variabilidad de esta raza frente a las razas criollas. Además, en los análisis de diversidad presentó los valores más bajos, tanto dentro de individuos, como entre individuos. Estos resultados son producto de los procesos de selección externos a los que ha sido sometida esta raza.

Las amplias distancias genéticas observadas entre la raza Española Pirenaica y las razas criollas, podrían sugerir que la

Pirenaica no tuvo mayor influencia durante la conquista española para la formación de las razas criolla. Sin embargo, la raza San Martinero presentó la menor distancia con respecto a la Española, lo que ratifican los resultados de Carvajal-Carmona *et al.* (2003) por análisis del ADN, hallazgo que podría relacionarse con la similitud de las características externas de estas dos razas (Pinzon Martínez, 1984). Rouse (1977) indica que las razas españolas actuales que podrían ser descendientes de los mismos planteles de los cuales provienen los criollos, son la Retinta, la Berrenda, la Cacereña y la Andaluza negra.

En conclusión, se puede decir que las razas bovinas criollas colombianas inscritas en los programas de conservación, muestran un alto grado de variabilidad genética, con su mejor representante en la raza Casanareño, lo cual demuestra su gran valor como patrimonio genético de la nación.

Agradecimientos

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA y a COLCIENCIAS por su aporte económico para el desarrollo del presente trabajo.

Referencias

- Bedoya, G., L.G. Carvajal, N.R. Bermudez, F.L. Moreno, *et al.* 2002. Estructura Molecular y Poblacional del Ganado Criollo Colombiano (GCC). Rev. Col. Cienc. Pec. 14: 107-118.
- Bejarano, A., G. Hernandez & G.Y.G. Rico. 1986. Proyecto de desarrollo ganadero con base en el uso de las razas criollas y colombianas. Publ. Misc. no. 628-ISSN-534-5391, Ministerio de Agricultura, Bogota, Colombia, pp. 1-72.
- Cañon, J., Alexandrino P., I. Bessa, C. Carleos, Y. Carretero, S. Dunner, F. Nuno, D. Garcia, J. Jordana, D. Laloe,

- A. Pereira, A. Sanchez, K. Moazami-Goudarzi.** 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purpose. *Genetic. Sel. Evol.* 33: 311-332.
- Carvajal-Carmona, L., N. Bermúdez, M. Olivera-Angel, L. Estrada, J. Ossa, G. Bedoya & A. Ruiz-Linares.** 2003. Abundant mtDNA Diversity and Ancestral Admixture in Colombian criollo Cattle (*Bos taurus*). *Genetics.* 165: 1457-1463.
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) University of Washington, Seattle. WA.
- Martinez, G.** 2004. Razas Bovinas Criollas y Colombianas. *Boletín Divulgativo* No. 13. Meta, Colombia, pp. 20.
- Martinez, G.** 1999. Censo y caracterización de los sistemas de producción de ganado criollo colombiano, Fondo Nacional Del Ganado, ICA, Pronatta, Asobón.
- Nei, M.** 1972. Genetic Distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Pinzon, E.** 1984. Historia de la Ganadería Bovina en Colombia. *Suplemento Ganadero* 4, 208.
- Rouse, J.E.** 1977. The criollo, Spanish cattle in the Americas. University of Oklahoma. Press: Norman, pp. 303.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 917.

