

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano

Diego Bejarano G.¹, Andrés Pedraza L.², Juan Felipe M.-Rocha², Rodrigo Martínez S.²

Genetic variability in commercial subpopulations of creole colombian breed Romosinuano

ABSTRACT

Genetic variability is of great importance when analyzing the conservation of genetic resources and also constitutes the basis for the process of genetic selection and improvement. The main objective of this study was to determine the genetic variability of the Colombian breed Romosinuano through molecular techniques. This study used 12 microsatellite markers to determine the genetic diversity and population structure in a total of 119 individuals of the Romosinuano breed and 42 of the Zebu breed, distributed in different geographical areas of the country. The highest average number of alleles (ANA) was in the subpopulation Universidad del Tolima (UT: 7.92) and the lowest value was in the subpopulation Bonanza (BO: 4.08). The polymorphic information content (PIC) for all studied markers was informative, finding ranges between 0.47 (BM 1818) and 0.71 (BM 2113), with an average in population of 0.64. The fixation indices F_{IS} (-0.20), F_{IT} (0.37) and F_{ST} (0.14) showed a deficit of heterozygotes. A phylogenetic tree was made using the Nei method, the lowest genetic distance was between subpopulations Guillermo Soto (GS) and Edem (ED), while the highest occurred between subpopulations El Brillante (BR), Universidad del Tolima (UT) and Fabio Torres (FT). There is high genetic variability among the populations, but moderate values of homozygosity within them, so it is necessary to give more importance to the management of this gene flow to reduce inbreeding. These results are an important basis for defining new plans for assisted selection and breeding.

Keywords: genetic variability, microsatellite, PIC, NPA

RESUMEN

La variabilidad genética es de gran importancia cuando se analiza la conservación de los recursos genéticos, además se constituye en la base para los procesos de selección y mejoramiento genético. El objetivo principal de este estudio fue determinar la variabilidad genética de la raza Romosinuano existente en Colombia por medio de técnicas moleculares. En este estudio se utilizaron 12 marcadores tipo microsatélites para determinar la diversidad genética y estructura poblacional en un total de 119 individuos de la raza Romosinuano y 42 de la raza Cebú, distribuidos en diferentes zonas geográficas del país. El valor más alto del número promedio de alelos (NPA) fue para la subpoblación de Universidad del Tolima (UT: 7,92) y el menor valor en la subpoblación Bonanza (BO: 4,08). El contenido de información polimórfica (PIC), para todos los marcadores estudiados fueron informativos, encontrándose rangos entre 0,47 (BM 1818) y 0,71 (BM 2113), con un promedio en la población de 0,64. Los índices de fijación F_{IS} (-0,20), F_{IT} (0,37) y F_{ST} (0,14), indicaron un déficit de heterocigotos. Se construyó el árbol filogenético, empleando la metodología de Nei, la menor distancia genética se presentó entre las subpoblaciones de Guillermo Soto (GS) y el Edem (ED), mientras que la mayor medida se presentó entre las subpoblaciones de El Brillante (BR), universidad del Tolima (UT) y Fabio Torres (FT). Existe una alta variabilidad genética entre las poblaciones, pero valores moderados de homocigosidad dentro de ellas, por lo que es necesario dar más relevancia al manejo de este flujo genético para reducir la consanguinidad. Estos resultados son una base importante para definir nuevos planes de apareamiento y selección asistida.

Palabras clave: variabilidad genética, microsatélite, PIC, NPA

INTRODUCCIÓN

El mérito genético que se puede estimar en un individuo depende de la proporción de combinaciones de alelos favorables con efectos aditivos, y su cálculo nos permiten categorizar los toros por su habilidad para transmitir diferencias por encima o por debajo del promedio de una población, y de esta forma tener la posibilidad de una se-

Fecha de recepción: 10/11/2011
Fecha de aceptación: 30/01/2012

¹ Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia).

² Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Mosquera (Colombia). ramartinez@corpoica.org.co

lección más exacta a favor de obtener un mayor número de hijos de aquellos animales que tengan una categoría productiva superior, esta información, junto con las medidas de distancias genéticas entre poblaciones proveen una perspectiva acerca de la variabilidad genética presente entre y dentro de poblaciones, así como también dan una idea de las relaciones genéticas existentes entre razas o líneas, ayudando a seleccionar y priorizar aquellas a ser conservadas. Los primeros estudios de variabilidad genética se concentraron en detectar variaciones cuantificables como: el color, variaciones morfológicas, aberraciones cromosómicas y tipos de grupo sanguíneos (Hedrick, 2005).

Actualmente, se desarrollan investigaciones usando herramientas de biotecnología para la preservación, caracterización genética y utilización del germoplasma de razas criollas colombianas, muchos de estos estudios de caracterización se basan en los análisis genéticos, a través del uso de marcadores moleculares, entre ellos los microsatélites o "short tandem repeat" (str), estos marcadores tipo microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng H. and Crittenden, L.B. 1994), ya que: son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son confiables, repetitivos, automatizables, fáciles de medir y analizar. Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, además debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Hedrick, 2005).

Varios loci microsatélites han sido identificados en varias especies de animales domésticos, y algunos nuevos han sido encontrados continuamente, más de 120 han sido mapeados en bovinos y más del doble de estos son conocidos; cerca de 70 están disponibles para ovejas, y alrededor de 190 microsatélites han sido descritos para cerdos. De otra parte, una proporción significativa de los microsatélites bovinos han sido identificados por ser polimórficos en búfalos y cabras (Zhang, 2004).

La FAO ha propuesto una estrategia para la caracterización de los recursos genéticos de animales domésticos usando dicha metodología, recomendando el análisis de 50 individuos no emparentados por raza (25 machos y 25 hembras) y un mínimo de 25 microsatélites (Barker *et al.*,

1993). Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que con un buen número de loci investigados y si estos presentan apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una muy buena aproximación de la filogenia (Takezaki y Nei, 1996). Probablemente este es el campo en el cual han sido más extensamente utilizados, mientras que su otro gran campo de acción ha sido para la construcción de mapas genéticos. En los estudios de genética poblacional, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales, el cálculo de las frecuencias alélicas, y a partir de estas; estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock *et al.*, 1994).

Por medio de estudios desarrollados con estos marcadores tipo microsatélites, se ha reportado una gran variedad genética en el ganado Romosinuano y BON en trabajos recientes (Barrera *et al.*, 2006a), El objetivo principal de este trabajo fue determinar la variabilidad genética de subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano, por medio de marcadores microsatélites, con el fin de conocer el estado genético de los núcleos comerciales de esta raza existentes en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron para este estudio 8 subpoblaciones comerciales de la raza bovina criolla Romosinuano mediante los resultados del análisis de 12 microsatélites en una muestra de 170 animales de la raza Romosinuano, provenientes de los departamentos de Bolívar, hacienda Bonanza (BO), Sucre, Guillermo Soto (GS), Santander, haciendas El Eden (ED) y hacienda El Brillante (BR), del Meta, la hacienda Fabio Torres (FT), del departamento de Antioquia la hacienda El Espejo (EP), departamento de Córdoba, Corpoica (BG) y del departamento del Tolima Universidad del Tolima (UT), y 42 animales pertenecientes a la raza Cebú (C) utilizados como control, provenientes de diferentes regiones del país (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación de las subpoblaciones de animales de la raza Romosinuano

Finca	Ubicación	Número de animales
BO	Bolívar	4
FT	Meta	14
GS	Sucre	8
EP	Antioquia	16
ED	Santander	15
UT	Tolima	15
BG	Córdoba	17
EB	Santander	12
C	Cundinamarca	42

Identificación de genotipos

Se utilizaron 12 marcadores tipo microsatélite tomados del grupo de sistemas genéticos recomendados por la FAO para estudios de variabilidad genética (ETH 10, ETH 3, ETH 225, BM 1818, BM 1824, INRA023, BM 2113, TGLA 227, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 53, SPS 115).

Las condiciones generales de amplificación incluyeron 50 ng de ADN genómico bovino, 200 μ M de dNTP (PharmaciaBiotech®, USA), 0,05 μ M de cada uno de los iniciadores directo y reverso para cada marcador, 2,25 mM de $MgCl_2$ (Promega®, USA) y 2 U de Taq ADN polimerasa (Promega®) para un volumen total de 25 μ l de reacción. Los 12 marcadores fueron amplificados en reacciones de multiplex bajo las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C por 3 min y 10 ciclos programados así: denaturación a 92°C por 30 s, anillaje por 1 min con disminución de 1°C en cada ciclo, y 19 ciclos con denaturación a 92°C, anillaje por 40 s, con adición de 1 s en cada ciclo. La amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 (MJ Research®, Inc.). Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). En la preparación de las muestras de ADN, para su posterior amplificación se realizó un múltiplex de marcadores microsatélites.

Luego de la amplificación por PCR se preparó la muestra para analizarla en el secuenciador, agregando HI-DI™ formamida y marcador de peso LIZ 500® (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Para la determinación del tamaño de los alelos se utilizó el programa Genemapper® de Applied biosystems.

Análisis de la información

En el análisis de la información se utilizó el programa GenePop® versión 3.3 (Laboratoire du Genetique et Environnement, Montpellier, France), el cual permitió calcular los valores de H_o y H_e (heterocigocidad observada y esperada, respectivamente), el índice de endogamia (F_{IS}), el equilibrio de Hardy-Weimberg (H-W), el desequilibrio gamético y el cálculo de las frecuencias alélicas. Para el análisis de correspondencia se utilizó el programa Genetix® (LaboratoireGénome, Populations et Interactions, CNRS-UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France) (Belkhir *et al.*, 2003). Las distancias genéticas se calcularon mediante el módulo Gendist del programa Phylip® (Felsenstein, 2003), con un proceso previo de bootstrapping de 10.000 remuestreros. Se calculó la Distancia Genética Estándar (Ds) de Nei (1972) y se comparó con la metodología de Cavalli-Sforza *et al.* (1969), ambas indicadas para poblaciones

con tiempos cortos de divergencia. La reconstrucción de los árboles filogenéticos se realizó por medio de la metodología Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) incluida en el mismo programa.

Para estimar la pureza racial de las poblaciones se utilizó un modelo (Q, coeficiente de membresía) basado en un método de agrupamiento que permite inferir la estructura de la población usando datos de genotipos a partir de marcadores no ligados (Pritchard *et al.*, 2000). Esta metodología asigna individuos a poblaciones e identifica migrantes e individuos mezclados. Se asume un modelo en el cual hay k poblaciones cada una de las cuales se caracteriza por un perfil de frecuencias de alelos en cada locus, cada individuo se asigna con una probabilidad a una población o conjuntamente a dos o más poblaciones si su genotipo indica que es un individuo mezclado. Este modelo asume que los loci están en equilibrio de Hardy-Weimberg dentro de las poblaciones, así como en equilibrio de ligamiento.

RESULTADOS

En los doce microsatélites evaluados en las poblaciones estudiadas, se detectaron en total 171 variantes alélicas, con una media de 14,2 alelos por locus. El número de alelos por locus (N_a) cambió significativamente siendo el microsatélite TGLA 227 el que presentó mayor número de alelos (22), el menor número de alelos se encontró para el microsatélite SPS 115 con 9 alelos. Con valores intermedios se encontraron los marcadores ETH3, TGLA126, que presentaron cada uno 17 y 16 alelos respectivamente, para los marcadores TGLA122 e INRA023, se presentaron en promedio 15 alelos y con menor número se presentaron los marcadores BM2113 con 13 alelos, y los marcadores BM1824 y ETH10 quienes presentaron 12 alelos, mientras que para los marcadores ETH225 y BM1818 presentaron 10 alelos.

Número promedio de alelos por marcador (NPA) para las subpoblaciones

El NPA encontrado en este estudio; se tuvo en cuenta para observar cuál de las 9 subpoblaciones contribuía en un mayor grado a la diversidad de la población. Se evidenció que la subpoblación UT, fue la que presentó un mayor NPA (7.92), en comparación con las otras fincas analizadas, así mismo la subpoblación BO fue la que mostró un menor en el NPA (4,08) Tabla 2.

Heterocigocidad por población

La heterocigocidad esperada (H_e), para los 12 marcadores, tuvo un valor promedio para todas las subpoblaciones

de 0,73, variando entre 0,60 para la subpoblación EP, y el valor más alto se encontró en la subpoblación de UT ($He = 0,80$).

En cuanto al análisis realizado en las subpoblaciones, se pudo observar que la finca BO presentó un valor de F_{IS} negativo, pero muy cercano a cero, inclusive más cercano que otras subpoblaciones, lo que se debe principalmente a que el número de individuos es muy reducido (4 animales), además la mayoría de los animales analizados fueron heterocigotos, lo que se refleja en el valor obtenido de la heterocigosidad observada que fue mayor al valor de la heterocigosidad esperada, al igual que lo encontrado en la población FT, la cual presenta un tamaño poblacional superior. Por otra parte, los valores de F_{IS} obtenidos para la subpoblación EP (0,10) y BR (0,16) fueron similares, lo que indica que existe una importante fijación de alelos dentro de todas las subpoblaciones de animales de la raza Romosinuano (Tabla 2). En este estudio los tres locus que presentaron mayor valor de F_{IS} fueron (BM1824 = 0,29, ETH10 = 0,30 e INRA063 = 0,29).

Tabla 2. Número promedio de alelos, Heterocigosidad esperada, Heterocigosidad observada y coeficiente de endogamia (F_{IS}) en subpoblaciones comerciales de la raza criolla Colombiana Romosinuano y animales de la raza Cebú.

Subpoblación	NPA	He	Ho	Fis
BG	5,330	0,783	0,608	0,080
BO	4,080	0,718	0,724	-0,006
BR	5,000	0,739	0,628	0,168
C	5,580	0,721	0,719	0,000
ED	5,920	0,710	0,671	0,058
EP	4,670	0,609	0,548	0,106
FT	7,670	0,801	0,869	-0,088
GS	5,080	0,733	0,696	0,056
UT	7,920	0,807	0,740	0,085
Promedio	5,694	0,736	0,689	0,051

El contenido de información polimórfica PIC de este estudio nos indica que todos los microsatélites utilizados fueron altamente informativos, encontrándose rangos variables entre 0,47 para el marcador BM1818 y 0,71 para el marcador BM2113, con un promedio en la población de 0,64. En síntesis; dos marcadores han resultado altamente informativos con valores mayores de 0,60 como es el caso de los marcadores BM1824 y BM2113 (Tabla 2).

En cuanto al PIC hallado en las subpoblaciones de acuerdo a los marcadores moleculares analizados en este estudio, se puede decir que, las subpoblaciones de animales de la raza Romosinuano fueron muy informativas con relación a los 12 microsatélites, ya que se obtuvieron valores mayores a 0,5 para todos los marcadores (Tabla 2).

Tabla 2. Número contenido de información polimórfica para cada marcador en poblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano y Cebú.

Marcador	PIC
BM 2113	0,7171
BM1818	0,4738
BM1824	0,7133
ETH10	0,6015
ETH225	0,6407
ETH3	0,6981
INRA23	0,6293
SPS115	0,6734
TGLA122	0,6560
TGLA126	0,7039
TGLA227	0,6777
TGLA53	0,6052

Medidas de diversidad genética

Para definir si una población muestra una desviación del equilibrio Hardy Weinberg (H-W), es importante analizar el valor de F_{IS} , cuando este tiende a 0 significa que la población está cerca del equilibrio de H-W, puesto que la heterocigosidad observada (Ho) es semejante a la heterocigosidad esperada (He) por individuo. Las desviaciones de 0 pueden ser positivas o negativas; un valor negativo significa un aumento en la heterocigosidad, mientras que un valor positivo indica una deficiencia significativa de heterocigotos (Moreno *et al.*, 2001).

Análisis de componentes principales

En el análisis de componentes principales con las 9 subpoblaciones como fuente de variación, el 71,45% de la varianza total acumulada es explicada por cuatro componentes, El primer componente es el responsable del 25,04% de la variación total, mientras que el segundo componente controla el 19,61% de la variación, y el componente número tres aporta un porcentaje de 14,21% (Figura 1). Cuando se analizó cada uno de los componentes por subpoblaciones, se encontró en primer lugar una clara separación entre la población de la raza Cebú y las demás poblaciones que se encontraron a la izquierda del centroide, diferenciándose claramente y evidenciando su diferenciación genética.

Distancias genéticas entre subpoblaciones de la raza Romosinuano

Se observa una clara diferenciación genética entre las poblaciones de la raza Romosinuano y la raza Cebú, los valores más altos de distancia genética se encontraron entre las subpoblaciones BG, BO, FT y UT. Entre las

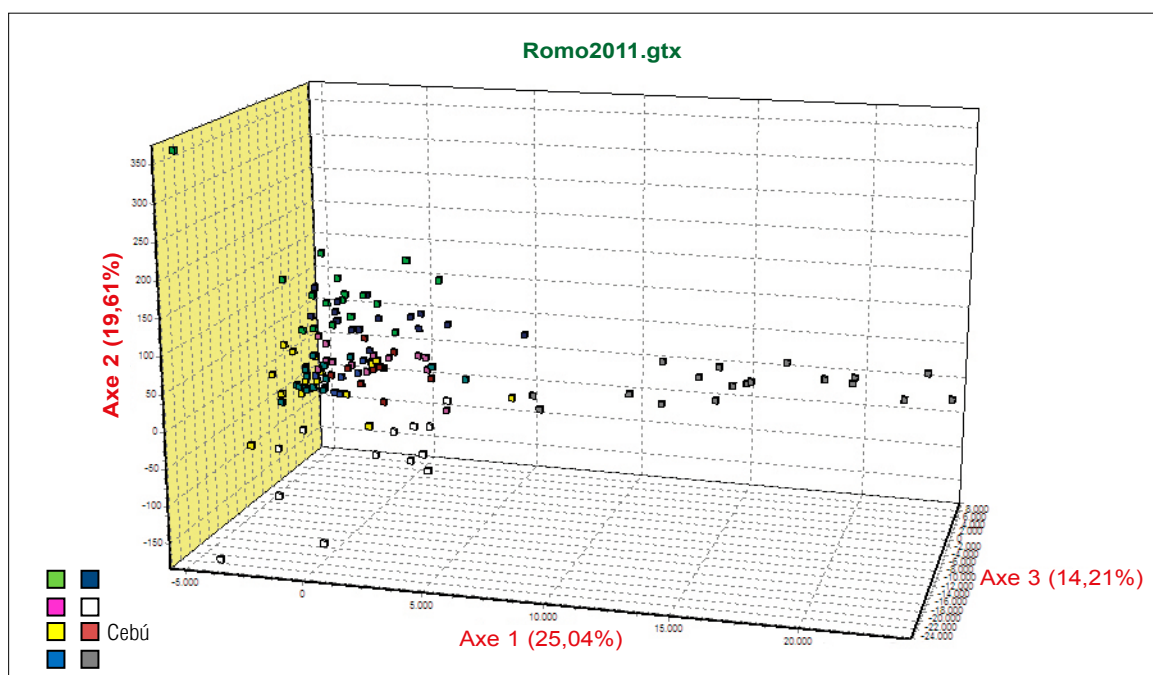


Gráfico 1. Análisis de componentes principales en poblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano y animales de la raza Cebú.

subpoblaciones de animales de la raza Romosinuano, la diferencia se da principalmente entre BR y FT, donde se encontraron los valores de distancia genética más altos ($D_A=1,00$), así como las poblaciones de BO y UT ($D_A=0,838$) este último, también presenta un alto valor de distancia genética con la población de BR (0,805) lo que indica que dichas poblaciones comparten pocos alelos y la frecuencia de los alelos compartidos entre ellas son muy diferentes por lo que están genéticamente distanciadas. Por el contrario, se observan los menores valores de distancia genética entre las poblaciones de EP y GS ($D_A=0,296$). Así mismo, la población de GS presentó valores de distancia muy bajos frente a toda la población ED ($D_A=0,16$).

En este caso, también la raza C presentó diferenciación clara de las demás poblaciones de Romosinuano, indicando pureza racial ó baja probabilidad de introgresión genética de las poblaciones con la subpoblación C. El menor valor de F_{ST} (0,01415) se presentó entre las subpoblaciones de GS y ED, además se encontró también un valor bajo (0,01581), entre las subpoblaciones BG y BO, indicando que los individuos de estas subpoblaciones comparten un mayor número de alelos, al igual que sus frecuencias alélicas, lo que las hace en cierta forma, muy cercanas genéticamente y esto se da a causa del mismo origen genético. Dentro de las poblaciones Romosinuano, el mayor valor obtenido de F_{ST} fue de 0,1592 entre las subpoblaciones EP y FT, sugiriendo esto que los individuos que componen estas

subpoblaciones, se encuentran distanciados genéticamente, debido a que no comparten muchos alelos en común.

En el análisis filogenético (Figura 2), el primer agrupamiento está formado por GS y el ED, los que presentan generalmente la menor medida de distancia, un segundo grupo está dado entre este primer grupo y la subpoblación EP, con una similaridad genética de la misma magnitud que el primer agrupamiento, que también presentan valores muy bajos en las medidas de distancia genética. En tercer lugar, otro grupo forma un agrupamiento que se da con la subpoblación BG, e indica que estas subpoblaciones serían las más cercanamente relacionadas, y posiblemente, a las que el banco de germoplasma ha contribuido más en su formación y desarrollo. Un grupo más lejano lo forman las subpoblaciones de BR y la subpoblación de FT junto con la subpoblación de BO y UT. Por último la subpoblación más alejada como era de esperarse es la población C, la cual parece tener frecuencias alélicas más disímiles en comparación con las demás subpoblaciones.

En cuanto al análisis realizado en este estudio, se pudo observar que para las subpoblaciones BO y BR, el 100% de las repeticiones proporcionaron una topología idéntica, mostrando que estas generan un grupo más alejado con relación a las otras subpoblaciones, lo que propone que los individuos que las conforman, están genéticamente distanciados a pesar de que comparten una proporción muy baja de alelos.

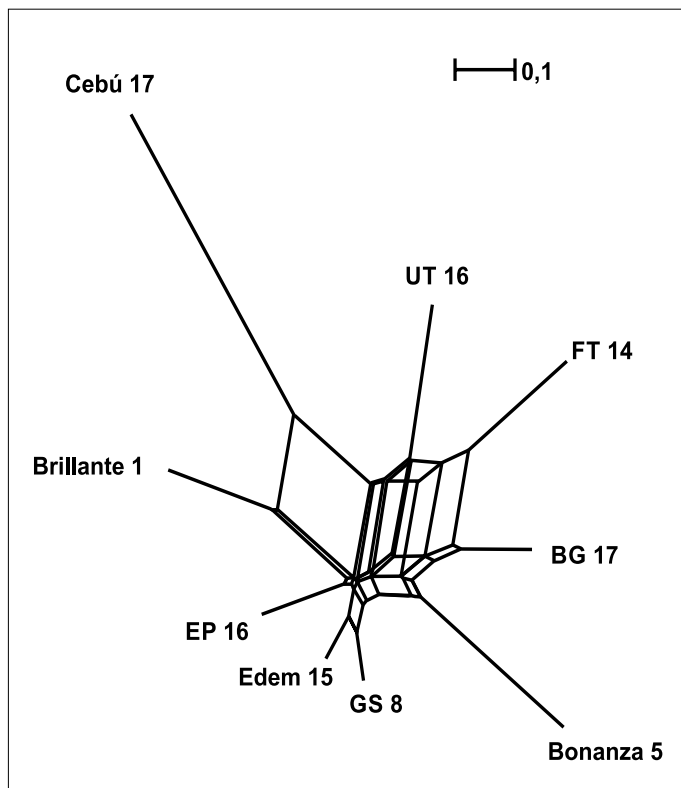


Figura 2. Árbol de relaciones filogenéticas entre 8 subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano comparadas con animales de la raza cebú, usando el algoritmo Neighbor-Joining. Bonanza (BO), Fabio Torres (FT), Guillermo Soto(GS), El Espejo (EP)El Edem (ED), Universidad Tolima (UT); Banco de Germoplasma (BG), Cebú (C)

Asignación de individuos

Mediante el programa Structure v. 2.1. (Pritchard *et al.*, 2000), utilizando un algoritmo bayesiano se ha determinado la distribución a posteriori de cada coeficiente de membresía de cada individuo (Q). La media de ésta distribución representa una estimación de la proporción del perfil genético de un individuo que pertenece a alguna de las posibles subpoblaciones que integran el grupo de análisis, suponiendo que estas están en equilibrio H-W. En otras palabras, este procedimiento realiza la asignación de

individuos a subpoblaciones (Clusters) en función de su parecido genético suponiendo que las frecuencias génicas están correlacionadas y que las poblaciones en estudio están mezcladas. Para cada valor de K (número de poblaciones) se realizaron 500 réplicas. Los resultados de cada corrida están basados en 10.000 iteraciones.

El resultado de este análisis para cada individuo puede observarse en la Figura 3, cada individuo está representado por una barra vertical dividida en K segmentos de diferente color, Cuando la barra vertical es de un solo color significa que el perfil genético de ese individuo se asigna con un 100 % de probabilidad a un solo Cluster (K), de acuerdo a los alelos presentes y sus frecuencias en un individuo dado, mientras que si tiene dos o más colores significa que se asigna a dos o más subpoblaciones lo que significaría que comparte cierta similitud con otras subpoblaciones (K).

Para el análisis de simulación (Figura 3), se asignaron a 9 grupos (K=9), en este caso siempre se diferenció claramente el grupo C asignándose con un 93% de probabilidad en la mayoría de los casos al grupo identificado con el color verde (k4), y para las subpoblaciones de la raza criolla colombiana Romosinuano el color azul y rojo.

Los valores de F_{ST} fueron recalculados, teniendo en cuenta las poblaciones a analizar (8 subpoblaciones de la raza Romosinuano y 1 de la raza cebú), y también de acuerdo a la simulación de tres agrupamientos (Q = 3).

DISCUSIÓN

La mayoría de los caracteres desde el punto de vista económico en los animales domésticos están determinados por múltiples genes y estos caracteres pueden ser medibles y sus componentes genéticos estimables a través de estrategias de genética cuantitativa. La variación que ocurre en un carácter de este tipo, es el material con el que trabaja la genética cuantitativa, esta variación es necesaria para procesos de mejoramiento, dado que todos los

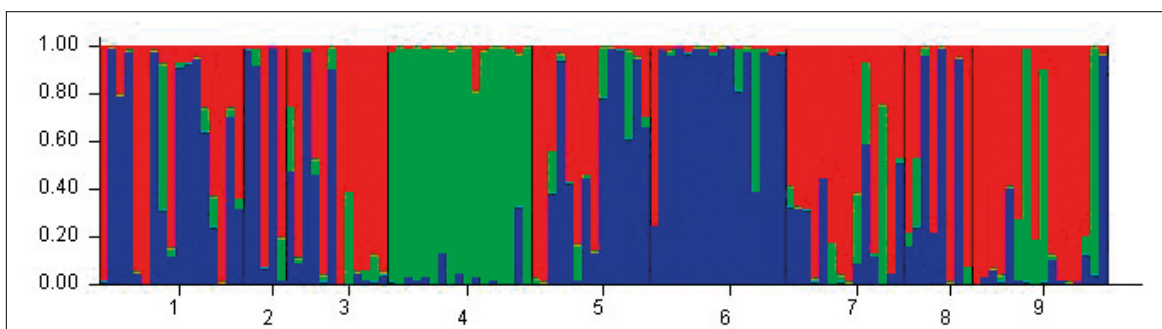


Figura 3. Estimaciones de coeficiente de membresía (Q) en bovinos de 7 subpoblaciones comerciales de la raza criolla Colombiana Romosinuano. Simulación realizada asumiendo 3 grupos.

caracteres están afectados por factores genéticos aditivos, no aditivos y ambientales, pero se ha encontrado que en poblaciones reducidas y con altas tasas de consanguinidad, los efectos genéticos tienden a disminuir y los ambientales y no aditivos tienden a aumentar, como resultado de deriva génica.

Los valores genéticos que se pueden estimar dependen de la proporción de estos efectos aditivos, y su cálculo nos permiten categorizar los toros por su habilidad para transmitir diferencias por encima o por debajo del promedio de una población, y de esta forma se puede tener la posibilidad de una selección más exacta a favor de obtener mayor número de descendientes de aquellos animales que tengan una categoría productiva superior. Para obtener un mejoramiento genético sostenido es importante garantizar que la población tiene una alta variación genética que soporte estos procesos de selección, por lo cual es importante cuantificar esta variabilidad.

Variabilidad genética

La variabilidad genética, desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). Para caracterizar la variabilidad en cuanto a recursos genéticos animales; se trabaja con dos tipos de componentes: la variabilidad fenotípica, que se observa fácilmente y se puede medir directamente sobre los individuos evaluados y la variabilidad genética, que se puede medir directamente en la secuencia de ADN, o utilizando diversos marcadores genéticos. Pero en ambos casos hay herramientas matemáticas que nos permiten caracterizar adecuadamente la variabilidad existente dentro y entre poblaciones y de esta forma pueden cuantificarse las diferencias entre y dentro de las poblaciones animales.

Desde un punto de vista práctico, favorecer la variabilidad dentro de razas es útil en procesos de selección y adaptación, mientras que dar más importancia a la variabilidad entre razas sería más razonable cuando lo que se pretende es explotar el resultado de cruzamientos (García y Cañón, 2007).

Al utilizar información molecular para determinar esta variabilidad, normalmente se utilizan algunos parámetros poblacionales, entre ellos el número promedio de alelos (NPA), los valores de heterocigosidad (H_e y H_o) y con ellos se determinan los índices de fijación (F_{st} y F_{is}) (Wright, 1969).

El NPA por locus hallado en este estudio (7,92) para la raza criolla colombiana Romosinuano (Tabla 2), se debe principalmente a que la subpoblaciones EP y UT presentaron un mayor número de individuos evaluados (16) y

en la subpoblación BO solamente se tuvieron en cuenta 5 individuos, lo que coincide con lo reportado por Zhang (2004), quien sugiere que a menor número de individuos estudiados, menor es el NPA.

Estos valores son similares a los reportados en razas francesas (NPA: 6,8) (Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997) italianas (NPA: 7,2) (Ciampolini *et al.*, 1995) y razas británicas (NPA: 3,6) (Machugh *et al.*, 1997), pero similar a los valores relativamente mayores encontrados en razas criollas africanas, cebuínas africanas, cebuínas asiáticas (NPA: 9,0) (Machugh *et al.*, 1994; Machugh *et al.*, 1997), razas bovinas españolas (NPA: 8,6) (Martín-Burriel *et al.*, 1999), (NPA: 10) (Arranz *et al.*, 1996), (NPA: 9,95) (Arranz *et al.*, 1998), citados por Carvajal y Bermúdez (1998).

A su vez el NPA se encontró próximo al descrito por Bedoya *et al.* (2001) (NPA:8,8) y Moreno *et al.* (2001) (NPA:8,9), para las mismas razas criollas colombianas, e inferiores a los valores reportados por Pizarro *et al.* (2009) quienes reportaron en rebaños de bovinos del Sur de Chile (NPA: 13,5) y a lo que Breneman *et al.* (2006) describieron en diversas razas bovinas (NPA: 12).

En estudios realizados por Martínez y Pérez (2006) en la raza criolla Casanareño, se encontró un NPA por locus de 5,56, además se encontró valores superiores en 22 individuos de la raza Cebú (7,13), los cuales se utilizaron como grupo de comparación. Sastre (2003) estimó un NPA de 8,54 para la raza criolla Casanareño. Moreno *et al.* (2001) reportaron un NPA de 8,9 para ganado criollo colombiano, Barrera *et al.* (2006a), determinaron un NPA de 9,21 para ganado Caqueteño; siendo estos valores inferiores al NPA hallado por Barrera *et al.* (2006b), en las razas criollas colombianas, que fue de 11,58 y al descrito en este estudio para la raza criolla colombiana Romosinuano que fue de 5,6.

Otros autores como, Sun *et al.* (2008) reportaron un NPA de 29,33, valor superior al encontrado en este estudio, estas diferencias pueden estar determinadas por el mayor número de individuos y marcadores utilizados por Sun *et al.* (2008). Por lo anterior se puede afirmar que, a mayor población estudiada, pueden ser detectados un mayor número de alelos con una frecuencia baja (Yan y Zhang, 2004).

Por otra parte, se ha determinado que los microsatélites usados para lograr una estimación confiable de las distancias genéticas, deben tener al menos 5 alelos diferentes por locus para reducir los errores estándar de estos parámetros de estimación (Barker, 1994; FAO, 2003). Es de importancia mencionar aquí, que los marcadores moleculares tipo microsatélites empleados en este estudio fueron adecuados para los análisis de diversidad genética

en poblaciones, debido a que presentan más de 5 alelos diferentes en toda la población bovina criolla estudiada.

Contenido de información polimórfica (PIC)

En comparación con otros estudios los valores del PIC obtenidos están dentro de los descritos por Arranz (1994) y Rodellar *et al.* (1996) para poblaciones bovinas españolas, siendo ETH225 altamente informativo al igual que en la Raza Rubia Gallega, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el marcador ETH225 fue el más informativo en la población. Por su parte, Zamorano *et al.* (1998), reportaron para los mismos marcadores valores de PIC menores a los obtenidos en este estudio, BM1818 (0,56); BM1824 (0,62); ETH10 (0,70); ETH225 (0,45); INRA063 (0,35), siendo influyente en este caso el tamaño de la población analizada, debido a que solamente se tuvieron en cuenta 119 animales a diferencia de la actual investigación en que se consideró 128 individuos. Así mismo, Aquino *et al.* (2008), encontraron valores de PIC inferiores para BM1818, BM1824 y ETH225 0,76; 0,721 y 0,76, respectivamente.

Otro parámetro importante en genética de poblaciones es la *He* y *Ho* que se puede obtener a partir la proporción de individuos que tienen en cada uno de los marcador genotipos heterocigotos, e indica desvío del equilibrio de Hardy Weimberg, situación que lleva a identificar disminución en la variabilidad genética cuando se encuentran poblaciones con déficit de heterocigotos, por efecto de apareamientos entre animales cercanamente emparentados o por el contrario cuando existe exceso de heterocigotos, que indicaría procesos recientes de cruzamiento entre razas.

En este estudio se pudo demostrar una desviación del equilibrio H-W, debido a que se presentó déficit de heterocigotos, quizás ocasionado por el efecto de la endogamia, lo que puede posiblemente verse reflejado en niveles de parentesco entre medios y altos (Bedoya *et al.*, 2001).

La heterocigosidad observada en este estudio, es más alta que la reportada para razas británicas (0,466) (Machugh *et al.*, 1994), criollo de Uruguay (0,487) (Postiglioni *et al.*, 1998), raza Blanca Cacereña (0,117) (Parejo *et al.*, 1998) y raza mexicana Charolais (0,5) (Sifuentes-Rincón *et al.*, 2007) y es menor al reportado para razas francesas (0,62) (Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997), cebuinas africanas (0,634) (Machugh *et al.*, 1994), cebuinas asiáticas (0,573) (Machugh *et al.*, 1994), criollo de Argentina (0,58) (Zamorano *et al.*, 1998), criollas españolas (0,74 y 0,72) (Arranz *et al.*, 1998), bovina canaria (0,74) (Zamora *et al.*, 2004), criollo de Brazil (0,79) (Egyto, 2007) y para razas de ganado chino (0,89) (Sun *et al.*, 2008). La variabilidad genética medida como

heterocigosidad tiende a ser mayor en las razas donde no se ha ejercido una selección artificial intensa.

Estudios realizados por Bedoya *et al.* (2001) en razas bovinas criollas colombianas, reportaron valores de heterocigosidad *He* (0,67) mayores a los encontrados en este estudio, estos valores concuerdan con un estudio realizado en la raza Casanareño, en el cual se obtuvo un valor de 0,63 (Martínez y Pérez, 2006), Barrera, *et al.* (2006a), utilizando 12 marcadores microsatélites en seis razas criollas colombianas obtuvieron un valor de heterocigosidad de 0,77, Barrera *et al.* (2003, 2006b) reportaron en la raza de ganado criollo Caqueteño una heterocigosidad de 0,67 y 0,77 respectivamente. Por otro lado, Moreno *et al.* (2001) reportaron una heterocigosidad de 0,33 en un estudio realizado en ganado Hartón del Valle, estos valores son inferiores a los reportados en el presente estudio. En este estudio se utilizó un bajo número de muestras en su mayoría individuos heterocigotos, dando una estimación sesgada de este parámetro poblacional, lo que también se pudo ver reflejado en el valor de *He*, que fue menor a la *Ho* en esta subpoblación de animales de la raza Romosinuano, mientras que en las otras fincas la heterocigosidad esperada fue mayor en todos los casos que el valor obtenido para la heterocigosidad observada.

Por otra parte, en un estudio de variabilidad genética de la raza Hartón del Valle, mediante la utilización de marcadores moleculares tipo RAM (*Random Amplified Microsatellites*), se alcanzó un valor de heterocigosidad de 0,26, que en comparación con los resultados del presente estudio son muy bajos, Es de aclarar que la mayoría de los reportes presentados anteriormente se basan en marcadores moleculares tipo microsatélites que son codominantes, mientras que los marcadores tipo RAM, al ser dominantes, detectan menor variabilidad en la población estudiada (Piedrahíta *et al.*, 2008).

Análisis de la estructura poblacional

Cuando un proceso de aislamiento genético persiste por varias generaciones, la consecuencia principal, desde el punto de vista de la genética de poblaciones, es la consanguinidad y la deriva génica (Falconer y Mackay, 1996).

Con relación al valor obtenido del F_{IS} en este estudio, se puede decir que, fue menor a lo descrito en estudios anteriores por Barrera *et al.* (2003) (0,095) en razas criollas colombianas, por Martínez y Pérez (2006) para la raza criolla Casanareño (0,08), por Moreno *et al.* (2001) (0,14) y Bedoya *et al.* (2001) (0,13) para razas criollas colombianas y por Barrera *et al.* (2006a) para ganado Caqueteño colombiano (0,14).

Cuando se analizó cada uno de los componentes principales por subpoblaciones, se encontró en primer lugar una clara separación entre la población de la raza Cebú y las demás poblaciones que se encontraron a la izquierda del centroide, diferenciándose claramente y evidenciando su diferenciación genética.

Por otra parte, las subpoblaciones pertenecientes a Banco germoplasma (11), Bonanza (22) y Brillante (33) se agruparon espacialmente cerca al centroide en el eje 1, al igual que las subpoblaciones del Edén (55) y Guillermo soto (88); mientras que la subpoblación El Espejo (77) y la Universidad del Tolima (99) se situaron en la parte superior del centroide en la segunda dimensión; en cuanto a este análisis de correspondencia con las subpoblaciones de animales de la raza Romosinuano, es importante mencionar que, se presentó un centroide bien definido (zona de inercia máxima), lo que puede atribuirse principalmente a una alta proximidad entre las subpoblaciones analizadas en el estudio. La subpoblación Brillante (33) presentó una mayor dispersión de su población en el segundo eje, lo que demuestra una mayor variación genética entre subpoblaciones (Figura 1). Por el contrario, la casi totalidad de animales de la población Cebú se separaron a la derecha del centroide en la primera dimensión, donde se presentó una clara división entre dos grupos, las subpoblaciones de animales de raza Romosinuano y de raza Cebú, este primer eje factorial es el que controla la mayor parte de la variación, pues explica el 25,04 % de la variación total. El segundo eje factorial que explica el 19,61% de la variación, muestra que los animales Romosinuano se agrupan de manera más homogénea, que los animales de las poblaciones de Cebú que muestran mayor dispersión.

La relación general existente entre estas dos subpoblaciones de la raza Romosinuano; se puede explicar debido al cercano origen genético de BH y la hacienda AZ, pues ambas subpoblaciones pertenecen a un mismo núcleo familiar.

En este trabajo, se ha podido comprobar la diferenciación genética existente entre subpoblaciones de la raza criolla Romosinuano de una población de referencia que en este caso fue la raza cebú. También los valores de las distancias genéticas coinciden en mostrar que la diferencia entre las poblaciones de Romosinuano, es similar a la existente

entre otras razas criollas, que son razas bien definidas y reconocidas desde hace mucho tiempo. Esta relación es lógica si tenemos en cuenta el proceso histórico, ya que, tienen prácticamente el mismo origen genético y han permanecido en condiciones climáticas similares durante más de 500 años.

Los resultados del presente trabajo indican que la variabilidad genética presente en las subpoblaciones de animales pertenecientes a la raza Romosinuano; es alta, es por esto que es necesario mantenerla como una población genealógicamente cerrada a efectos de no perder la combinación de genes que se ha logrado por medio de la selección realizada por los productores.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se emplearon 12 marcadores moleculares tipo microsatélites, recomendados por la FAO para determinar la variabilidad genética existente en 8 subpoblaciones bovinas criollas pertenecientes a la raza Romosinuano, presentándose en términos generales alto nivel de polimorfismo para todos los loci analizados, encontrándose que la subpoblación que contribuyó con un mayor número de alelos fue el Banco de Germoplasma, demostrando así variabilidad genética.

Los estudios de variabilidad genética en distintas poblaciones de ganado bovino criollo Romosinuano, suministran una idea clara del manejo a que han sido sometidos estos grupos raciales, lo cual permite abordar futuras actuaciones de conservación o mantenimiento de la diversidad genética, además favorece la iniciativa de programas de selección, mejoramiento y cruzamientos selectivos hacia la construcción de una ganadería auténticamente nacional.

El análisis de las relaciones filogenéticas en las ocho subpoblaciones de la raza Romosinuano estudiadas, permitió definir que la menor medida de distancia genética se encontró entre las subpoblaciones del GS y ED. Las poblaciones más alejadas genéticamente fueron BR, UT y FT, lo que indica que los individuos pertenecientes a estas fincas, constituyen un subgrupo con una estructura de población definida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino N, Veli EA, Rivas E, Rivas V, Estrada R. 2008. Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites. *Arch Zootec* 57(219):337-340.
- Arranz JJ. 1994. Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y de DNA (variaciones puntuales y microsatélites) [Tesis de doctorado] León, España: Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
- Arranz JJ, Bayon Y, San Primitivo. 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim Genet* 27:415-419.
- Arranz JJ, Coppieters W, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marq F, Moreau L, Mezer C, Riquet J, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M. 1998. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: A confirmation. *Anim Genet* 29:107-115.
- Barker JSF. 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. En: *Memorias V World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Guelph, Canada. pp. 501-508.
- Barker JSF, Bradley DG, Fries R, Hill WG, Nei M, Wayne RK. 1993. An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. Roma: FAO.
- Barrera GP, Martínez R, Ariza F. 2003. Caracterización genética molecular del ganado criollo colombiano utilizando marcadores moleculares tipo microsatélite y secuencia de ADN mitocondrial. En: VI Congreso Iberoamericano de Razas Criollas y Autóctonas y IV Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. Recife, Brasil.
- Barrera GP, Martínez R, Pérez JE, Polanco N, Ariza F. 2006a. Evaluación de la variabilidad genética en ganado criollo colombiano, mediante 12 marcadores microsatélites. *AGRI* 38:35-45.
- Barrera GP, Martínez R, Torrijos R, Ramón F. 2006b. Caracterización molecular de una población de ganado Caqueteño y su relación filogenética con razas bovinas criollas colombianas. *Rev Corpoica* 7(1):33-41.
- Bedoya G, Carvajal I, Bermúdez N, Moreno F, Márquez M, Davies S, Derr J, Ossa J, Ruiz A. 2001. Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). *Rev Colomb Cienc Pec* 14(2):107-118.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2003. GENETIX version 4.04, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Montpellier, France: Laboratoire Genome, Populations, Interactions; CNRS; UMR 5000, Université de Montpellier II.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-457.
- Brenneman RA, Chase Jr CC, Olson TA, Riley DG, Coleman SW. 2006. Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds. *Anim Genet* 38:50-53.
- Carvajal CLG, Bermúdez GN. 1998. Estimación de la diversidad genética intra e interespecífica de las razas bovinas criollas colombianas [Trabajo de grado]. Medellín, Colombia: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Cavalli-Sforza LL, Zonta LA, Nuzzo F, Bernini L, Dejong WWW, Khan PM, Ray AK, Went LN, Siniscal M, Nijenhui LE, et al. 1969. Studies on African Pygmies. I. A pilot investigation of Babinga Pygmies in Central African Republic (with an analysis of genetic distances). *Amer J Hum Genet* 21(3):252-274.
- Ciampolini R, Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, Dillmann C, Mazzanti E, Foulley J-L, Leveziel H, Cianci D. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J Anim Sci* 73:3259-3268.
- Crow JF, Kimura M. 1970. An Introduction to population genetics theory. New York, NY: Harper and Row Publishers.
- Cheng HH, Crittenden LB. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci* 73:539-546.
- Egyto AA, Paiva SR, Albuquerque MSM, Mariante AS, Almeida DL, Castro R, Grattapaglia D. 2007. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genet* 8:83-96.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. An introduction to quantitative genetics. 4a ed. Londres: Longman Pub.
- FAO. 2003. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers. Roma.
- Felsenstein J. 2003. Inferring phylogenies. 2a ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- García D, Cañón J. 2007. Diversidad de las especies de animales domésticos: Importancia y conservación de la variabilidad genética. *FEAGAS* 31:61-66.
- Hedrick PW. 2005. Genetic of populations. 3a ed. Boston, MA: Jones and Bartlett.
- Machugh DE, Loftus RT, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc R Soc Lond B* 256(1345):25-31.
- Machugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos Taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146:1071-1086.
- Martínez RA, Pérez JE. 2006. Parámetros y tendencias genéticas para características de crecimiento en el ganado criollo colombiano Romosinuano. *Rev Corpoica* 7(1):25-32.
- Moazami-Goudarzi K, Laloe D, Furet JP, Grosclaude F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim Genet* 28:338-345.
- Moreno F, Bedoya G, Derr JN, Carvajal LG, Bermúdez N, Ossa J, Estrada L, Scott D, Zuluaga FN, Berdugo J, et al. 2001. Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. *Rev Corpoica* 3(2):17-23.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. *Amer Natur* 106:283-292.
- Parejo J, Sansinforiano M, Rabasco A, Martínez-Trancon M, Fernández-García J, Padilla J. 1998. Utilización de la técnica RAPD para estudios poblacionales en la raza bovina Blanca Cacereña. *Arch Zootec* 47:279-286.
- Piedrahíta AM, Posso A, Muñoz JE, Álvarez LA. 2008. Variabilidad genética de Hartón del Valle mediante RAM. *Acta Agron* 57(1):71-76.
- Pizarro M, Mujica F, Felmer R. 2009. Estructura poblacional y diversidad genética de rebaños bovinos de carne del sur de Chile. *Agro Sur* 37(1):60-83.
- Postiglioni A, Rincón G, Kelly L, D'Angelo M, Gagliardi R, De Andrés Cara D. 1998. Caracterización genética de los bovinos criollos del Uruguay. II. Estudio de su variabilidad genética. *Arch Zootec* 47:225-231.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Rodellar C, Martin-Burriel Y, Cons C, Zarazaga I. 1996. Genetic structure and distances between three Spanish bovine breeds using INRA05, INRA063, ETH3, ETH10, ETH225 and LSTS005 microsatellites. En: Proceedings of XXV International Society for Animal Genetics. Tours, France.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sastre HJ. 2003. Descripción, situación actual y estrategias de conservación de la raza bovina colombiana criolla Casanare [Tesis de doctorado]. Andalucía, España: Universidad de Córdoba.
- Sifuentes-Rincón AM, Puentes-Montiel H, Parra-Bracamonte GM. 2007. Assesment of genetic structure in mexican charolais herds using microsatellite markers. *Electron J Biotechnol* 10(4):492-499.
- Sun W, Chen H, Lei X, Zhang Y. 2008. Genetic variation in eight Chinese cattle breeds based on the analysis of microsatellite markers. *Genetic Sel Evol* 40:681-692.
- Takezaki N, Nei M. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144:389-399.
- Wright S. 1969. Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Yan L, Zhang D. 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers. *Acta Zool Sinica* 2:279-290.
- Zamora M, Ginés R, Afonso JM, Reig M, García L, Zamorano MJ. 2004. Caracterización genética de la raza bovina Canaria utilizando microsatélites: estudio preliminar. *Arch Latinoam Prod Anim* 12(Supl. 1):12-15.
- Zamorano MJ, Ruiter J, Rodero A, Veja JL. 1998. Análisis genético de marcadores microsatélites en dos poblaciones de la raza bovina berrenda en negro. *Arch Zootec* 47:195-200.
- Zhang D-X. 2004. Lepidopteron microsatellite DNA: redundant but promising. *Trenes Ecol Evol* 19:507-509.