

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Rodrigo Alfredo Martínez¹, Gloria Patricia Barrera¹ y Héctor Julio Sastre²

ABSTRACT

Variability and genetic status of seven subpopulations of the native Colombian breed Casanareño

To determine the genetic status of the Casanareño, a bovine Colombian native breed, the variability and racial purity of individuals of seven subpopulation was determined. The mean number of alleles per locus (5.56) was inferior to that of Zebu breeds used as control (7.13), which indicates a moderate genetic variability in the subpopulations analyzed. Mean observed heterozygosity of all populations was 0.63. Population structure consisted of two groups. For conservation effects, 51% belongs to group 2, with a genetic profile characteristic of *Bos taurus* and does not include animals of the Zebu breed, a population with a low level of genetic introgression. This group includes 100% of the individuals of the 'Cumay' subpopulation, 76% 'Bubuy' subpopulation and 50% of 'Albania'. A wide percentage of sampled population belongs to individuals with a high degree of *Bos taurus* characters, while the remaining animals showed variable degrees of genetic introgression as evidenced by individual and subpopulation genetic distance values and the population structure.

Key words: animal genetic resources, creole cattle, conservation, variability, mean allele number, heterozygosity, microsatellites, phylogeny.

Recibido: marzo 8 de 2006.
Aceptado: diciembre 4 de 2006.

1. Investigadores master asistente, grupo de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, Centro de Investigación Tibaitatá, CORPOICA. e-mails: gbarrera@corpoica.org.co, ramartinez@corpoica.org.co
2. Docente, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Los Llanos, Villavicencio, Meta.

Variabilidad y estado genético de siete subpoblaciones de la raza criolla colombiana Casanareño

RESUMEN

A fin de conocer su estado genético se estimó la variabilidad y grado de pureza racial de individuos pertenecientes a siete subpoblaciones de la raza bovina criolla colombiana Casanareño. Se encontró un número promedio de alelos por locus de 5,56, inferior al valor hallado en la raza Cebú usada como control (7,13), lo que indica una variabilidad genética moderada en las subpoblaciones analizadas. La heterocigosidad observada promedio en todas las subpoblaciones de la raza fue de 0,63. La estructura de las poblaciones mostró dos agrupaciones; a efectos de conservación, la más importante consolida el 51% de la población en el grupo 2 que presenta un perfil genético típico de *Bos taurus* y no incluye ningún animal de la raza Cebú, lo que permite afirmar que se trata de una población con un nivel bajo de introgresión genética. Este grupo incluye el 100% de los individuos de la subpoblación 'Cumay', el 76% en la subpoblación 'Bubuy' y el 50% de 'Albania'. Se concluye que un amplio porcentaje de la población muestreada corresponde a individuos con alto grado de características taurinas o criollas, mientras los restantes animales presentan grados variables de introgresión genética, evidentes en los valores de distancias genéticas subpoblacionales e individuales y en la estructura de la población.

Palabras clave: recursos genéticos animales, ganado criollo, conservación, variabilidad, número promedio de alelos, heterocigosidad, microsatélites, filogenia.

INTRODUCCIÓN

EN LAS LLANURAS INUNDABLES del Departamento de Casanare (Colombia) surgió la raza bovina criolla Casanareño; ésta fue caracterizada mediante marcadores moleculares y se probó que representa una entidad genética particular endémica de dichas sabanas y que forma parte, por su cercanía genética, de las siete razas criollas descendientes de ganados españoles que Colombia aún posee (Sastre, 2003).

No obstante la importancia de este recurso genético animal, la raza Casanareño cuenta con muy pocos individuos efectivos y una base poblacional escasa, a tal punto que se encuentra en extremo peligro de extinción (Sastre, 2003); esta situación se deriva de los sistemas productivos tradicionales que se desarrollan en esa región desde tiempos de la colonia, además de la influencia creciente de razas cebuinas que se introducen en la progenie Casanareño sin control alguno, lo que ha limitado su multiplicación en estado de pureza.

A fin de fundamentar procesos de conservación encaminados a aumentar el número efectivo de animales Casana-

reño con características de pureza racial, se deben identificar los núcleos existentes y evaluar el grado de cruzamiento con otras razas; por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente a un grupo de animales pertenecientes a siete subpoblaciones de Casanareño, con el objeto de identificar individuos según su pureza racial para dar inicio a un programa de conservación y multiplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población muestral

Para este trabajo fueron analizados individuos procedentes de siete ganaderías del departamento de Casanare en las que se tomaron muestras de sangre a 92 animales de la raza criolla Casanareño (CAS) con diferentes grados de pureza (Tabla 1). Las muestras fueron genotipadas usando 14 marcadores tipo microsatélite y los resultados fueron comparados con información genotípica previamente disponible de 126 animales no emparentados pertenecientes a cinco razas criollas colombianas: Romosinuano (Romo), Costeño con cuernos (CCC), Blanco Orejinegro (BON), Sanmartinero (SM) y Hartón del Valle (HV). Adicionalmente, los datos se compararon con

genotipos de 22 individuos *Bos indicus* no emparentados de la raza Cebú Brahman colombiana (CEBÚ).

A los animales se les tomó una muestra de sangre periférica en tubos con EDTA. Posteriormente, los eritrocitos se lisaron mediante adición de sucrosatriton 2X para la obtención de células nucleadas. La extracción del ADN se llevó a cabo de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

Identificación de genotipos

Los 14 marcadores moleculares tipo microsatélite fueron tomados del grupo de sistemas genéticos recomendados por la FAO (2003) y recopilados por Bradley (1996) para estudios de variabilidad genética en bovinos de conservación (Tabla 2). Las características de estos marcadores incluyen: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo (más de cuatro alelos por

locus), técnica para el análisis de los marcadores rápida y práctica, existencia de datos en estudios previos, posibilidad de realización en multiplex y utilidad en diferentes especies.

Las condiciones generales de amplificación incluyeron 50 ng de ADN genómico bovino, 200 μ M de dNTP (Pharmacia Biotech® 27-1850, 1860, 1870, 1880), 0,5 μ M de cada uno de los iniciadores (directo y reverso) de cada marcador, 2,25 mM de MgCl₂ (Promega®), se agregaron 2U de Taq ADN polimerasa (Promega® M1665) para completar un volumen total de 25 μ l de reacción. Algunos marcadores (ETH10 y ETH 225; BM1818 y BM1824; INRA005 e INRA063; HEL13, HEL5 y HEL1) fueron amplificados en reacciones de PCR multiplex. Se usó un termociclador PTC 100 (MJ Research®, Inc.) programado con un ciclo de *touchdown*, para iniciar la denaturación bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 min

durante 10 ciclos programados así: denaturación a 92°C por 30 seg, anillaje por 1 min con reducción de 1°C en cada ciclo; adicionalmente, denaturación a 92°C con anillaje durante 40 seg según grupo de marcadores y adición de 1 seg en cada ciclo. Las condiciones de PCR fueron las mismas de los marcadores anteriores, con temperaturas de anillaje de 68°C en los primeros 10 ciclos y 53°C en los últimos 19 ciclos.

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml; se cuantificaron para concentración con el espectrofotómetro a $\lambda = 260$ nm. Posteriormente, fueron separados y visualizados en geles de poliacrilamida al 6% (59:1) en condiciones denaturantes (úrea 7M) para compararse con marcadores de peso molecular 10 pb y 25 pb (INVITROGEN® Cat. 10821-015). Las condiciones de corrido incluyeron 1.800 voltios por 3 horas. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Para la captura de las imágenes se utilizó el programa GeneSnap® de SYNGENE y para la determinación del tamaño de los alelos se utilizó el programa GeneTools® de la misma casa comercial.

Análisis de la información

Para el análisis de genética de poblaciones se utilizó el programa GenePop® versión 3.3 (*Laboratoire du Genetique et Environnement*, Montpellier, France), software que permitió el cálculo de los valores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), el índice de fijación (F_{is}), el equilibrio de Hardy-Weimberg (H&W), el desequilibrio gamético y las frecuencias alélicas. Para el análisis de correspondencia se utilizó el programa Genetix® (*Laboratoire Génome, Populations et Interactions*, CNRS-UMR 5000, Université de Montpellier II).

Las distancias genéticas se calcularon en el programa Phylip® versión 3.5 (Felsenstein, 1993), usando el procedimiento Gendist y efectuando previamente una rutina de *bootstrapping* de 10.000 remuestras. Se calculó la distancia genética estándar (Ds) de Nei (1972) y se comparó con la metodología de Cavalli-Sforza (1969), ambas indicadas para poblaciones con tiempos cortos de divergencia; las dos asumen que las diferencias halladas se deben a efectos de deriva genética. La reconstrucción de los árboles filogenéticos se realizó por medio de la

Tabla 1. Distribución de animales en las siete subpoblaciones de la raza bovina criolla Casanareño muestreadas.

| | Ganadería | Municipio de Casanare | No. animales |
|---|-------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | Albania (A) | San Luis de Palenque | 15 |
| 2 | El Bubuy (BY) | Aguazul | 13 |
| 3 | Cumay (C) | Nunchía | 18 |
| 4 | El Mastranto (HB) | Aguazul | 11 |
| 5 | Canaguay (JV) | Maní | 14 |
| 6 | California (LP) | Paz de Ariporo | 14 |
| 7 | El Recreo (RC) | Orocué | 7 |

Tabla 2. Marcadores microsatélites recomendados para estudios de variabilidad en razas bovinas criollas.

| | Nombre del marcador | Cromosomas | Rango de tamaño (pb) | | Referencia |
|----|---------------------|------------|----------------------|------|------------------------------------|
| | | | min. | max. | |
| 1 | ETH 10 | 5 | 206 | 228 | Solinas-Toldo <i>et al.</i> (1993) |
| 2 | ETH 225 | 9 | 138 | 160 | Steffen <i>et al.</i> (1993) |
| 3 | BM1818 | 23 | 208 | 272 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 4 | BM1824 | 1 | 178 | 192 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 5 | HEL 13 | 11 | 184 | 194 | Kaukinen y Varvio (1993) |
| 6 | HEL 5 | 21 | 148 | 166 | Kaukinen y Varvio (1993) |
| 7 | HEL 1 | 15 | 102 | 114 | Kaukinen y Varvio (1993) |
| 8 | INRA 005 | 12 | 136 | 142 | Vaiman <i>et al.</i> (1992) |
| 9 | INRA 063 | 18 | 178 | 188 | Vaiman <i>et al.</i> (1994) |
| 10 | BM 757 | 9 | 178 | 208 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 11 | BM 1314 | 26 | 140 | 168 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 12 | BM 827 | 11 | 202 | 210 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 13 | BM 8125 | 17 | 106 | 124 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |
| 14 | BM 6526 | 27 | 146 | 176 | Bishop <i>et al.</i> (1994) |

metodología Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) incluida en el mismo programa; para la definición de la mejor reconstrucción filogenética se utilizó el módulo Consense. Estos análisis se realizaron con la población Casanareño (CAS), asumida como un conjunto de subpoblaciones, y se compararon con las demás razas en estudio con el objetivo de determinar cuáles podrían estar más cercanamente relacionadas con otras razas como la Cebú.

Así mismo, se realizaron análisis de estructura de la población utilizando un modelo basado en un método de agrupamiento que permite inferir estructura de población usando datos de genotipos a partir de marcadores no ligados descrito por 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. El modelo asume que los loci se hallan en equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones, así como en equilibrio de ligamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de la variabilidad

El número promedio de alelos observado en cada locus se considera como un buen indicador de la variabilidad genética derivada de la diversidad alélica, teniendo en cuenta que la población está en equilibrio mutación-deriva y que el tamaño de la muestra es más o menos el mismo en cada población. Así, se encontró un número promedio de alelos (NPA) por locus de 5,56; los menores valores de NPA se encontraron en la subpoblación 'El Recreo' (RC) y los mayores en la subpoblación 'Albania' (A). En términos generales, se notan valores inferiores a la raza Cebú (7,13) y una variabilidad genética moderada en las subpoblaciones de la raza Casanareño situación que contrasta con lo reportado por Sastre (2003), quien estima un NPA de 8,54 para la raza criolla Casanareño (Tabla 3). Este valor es inferior al número promedio de alelos hallado por Barrera *et al.* (2003) en las razas criollas colombianas, que fue

Tabla 3. Número más probable de alelos (NPA), heterocigocidades esperada (He) y observada (Ho) y coeficientes de consanguinidad (F_{is}) por cada subpoblación de la raza Casanareño y la raza Cebú.

| Subpoblación | NPA | He | Ho | F_{is} |
|--------------|------|------|------|----------|
| A | 6,19 | 0,70 | 0,59 | 0,15 |
| BY | 5,31 | 0,64 | 0,60 | 0,07 |
| C | 5,69 | 0,68 | 0,62 | 0,08 |
| HB | 5,75 | 0,70 | 0,65 | 0,05 |
| JV | 5,5 | 0,68 | 0,65 | 0,05 |
| LP | 5,94 | 0,71 | 0,63 | 0,11 |
| RC | 4,56 | 0,65 | 0,71 | 0,08 |
| Promedio | 5,56 | 0,68 | 0,63 | 0,08 |
| Cebú | 7,13 | 0,70 | 0,55 | 0,20 |

de 11,58, pero se encuentra dentro de los parámetros recomendados por la FAO, que sugiere al menos cinco diferentes alelos por locus para lograr una estimación confiable de la distancia genética (FAO, 2003).

Moreno *et al.* (2001), en un trabajo realizado en razas criollas colombianas, reportan un NPA de 8,9, mientras Bedoya *et al.* (2001) informan de un NPA de 8,8 para las mismas progenies. Por su parte, un estudio realizado en seis razas bovinas españolas en el que se utilizaron 24 marcadores —nueve de los cuales fueron analizados en el presente trabajo—, muestra un número promedio de alelos de 8,6 (Martín-Burriel *et al.*, 1999), mientras que Arranz *et al.* (1996), también en razas españolas, reportan un NPA de 10 alelos.

La heterocigidad promedio observada (Ho) para todas las subpoblaciones de la raza fue de 0,63, valor que supera al encontrado en la población de la raza Cebú estudiada. En este caso, la subpoblación RC fue la que presentó los mayores valores de Ho, mientras la población A presentó los menores, en un nivel comparable con el de la raza Cebú (Tabla 3) Barrera *et al.* (2003) reportan valores superiores de Ho (0,7) también para razas criollas colombianas, lo cual concuerda con lo reportado (Ho= 0,67) por Bedoya *et al.* (2001) y con los valores citados por Moreno *et al.* (2001).

La endogamia o consanguinidad, evaluada mediante el coeficiente de consanguinidad (F_{is}), fue de 0,08 para toda la población CAS en estudio, lo que indica que ésta no tiene problemas de consanguinidad. No obstante, dado su bajo NPA por locus (5,56), se puede concluir

que la población ha pasado por un fenómeno conocido como 'efecto fundador' o 'cuello de botella' que ha reducido el número de alelos presentes y, así mismo, la variabilidad genética general, lo cual aparentemente se contradice con el bajo coeficiente F_{is} , pero puede ser explicado por el cruzamiento de poblaciones pequeñas y endogámicas con animales Cebú, situación que aumenta la heterocigidad y disminuye dicho coeficiente. Ello es particularmente evidente en la subpoblación RC (Tabla 3). El valor F_{is} encontrado para toda la población en estudio fue inferior a lo reportado previamente por Barrera *et al.* (2003) (0,095), mientras que en otros estudios para razas colombianas se reportan valores superiores (0,14, Moreno *et al.*, 2001; 0,13, Bedoya *et al.*, 2001). Si se tiene en cuenta que el valor de F_{is} varía entre 0 y 1, siendo 0 el nivel de endogamia mínimo y 1 el máximo, se puede considerar el valor de 0,08 hallado en este estudio relativamente bajo.

Análisis multivariado de las subpoblaciones

En el análisis de correspondencia, cuando se incluyeron las otras razas criollas dentro de la fuente de variación, cada uno de los tres ejes contribuyeron proporcionalmente con 24, 13 y 11% de la inercia total³ (Figura 1). La raza Cebú (44) se ubicó cerca del centroide en la dimensión uno, más cerca de las poblaciones CAS que de las otras razas criollas (9, 10, 11, 12 y 13). En este mismo eje fue donde las poblaciones CAS tuvieron mayor efecto sobre la inercia total y muy bajo efecto en las

³ En genética, la inercia mide la dispersión de la información; así, en las Figuras 1 y 2 la zona de inercia máxima será aquella en la que los puntos se hallan más agrupados.

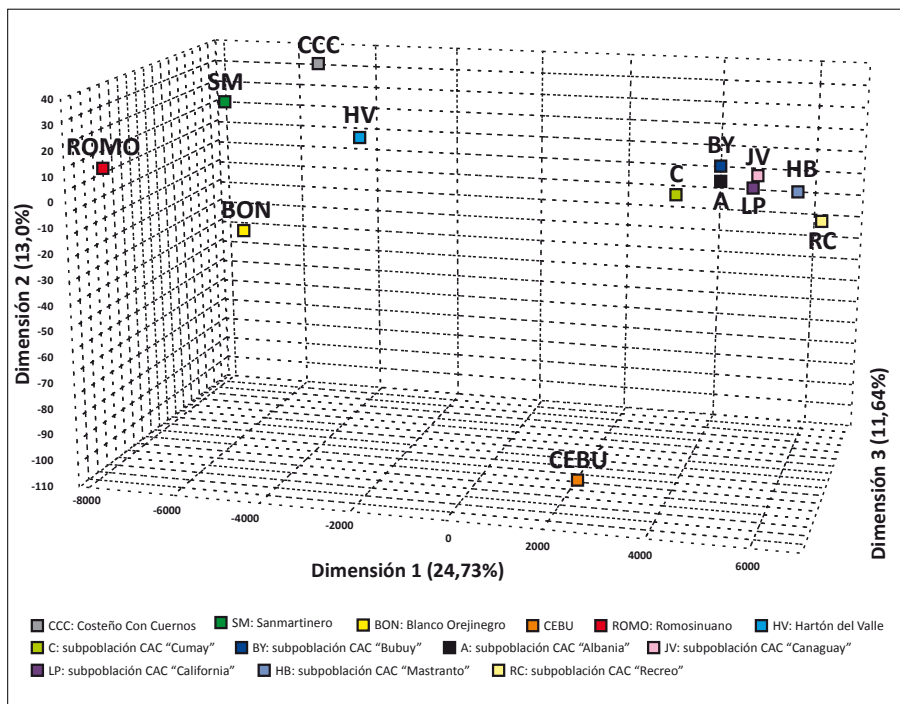


Figura 1. Análisis de componentes principales por razas de las subpoblaciones Casanareño (CAC), la raza Cebú y cinco razas criollas colombianas. ROMO: Romosinuano; SM: Sanmartinero; BON: Blanco Orejinegro; CCC: Costeño con Cuernos; HV: Hartón del Valle; C: subpoblación CAC 'Cumay'; BY: subpoblación CAC 'Bubuy'; A: subpoblación CAC 'Albania'; JV: subpoblación CAC 'Canaguay'; LP: subpoblación CAC 'California'; HB: subpoblación CAC 'Mastranto'; RC: subpoblación CAC 'Recreo'.

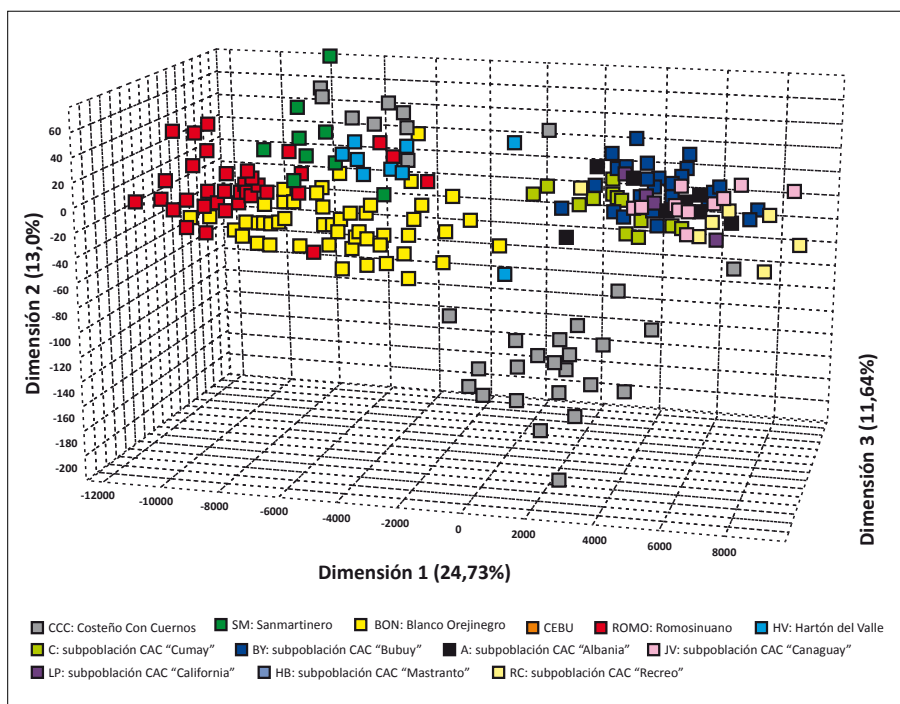


Figura 2. Análisis de componentes principales por individuos de cada subpoblación, incluyendo Casanareño (CAC), Cebú y cinco razas criollas colombianas. ROMO: Romosinuano; SM: Sanmartinero; BON: Blanco Orejinegro; CCC: Costeño con Cuernos; HV: Hartón del Valle; C: subpoblación CAC 'Cumay'; BY: subpoblación CAC 'Bubuy'; A: subpoblación CAC 'Albania'; JV: subpoblación CAC 'Canaguay'; LP: subpoblación CAC 'California'; HB: subpoblación CAC 'Mastranto'; RC: subpoblación CAC 'Recreo'.

otras dos dimensiones, similar a lo ocurrido con la raza Cebú (Figura 1). Lo anterior hace evidente una mayor proximidad entre las poblaciones CAS y la Cebú, dado que pueden compartir alguna proporción baja de alelos debido al mestizaje. Es evidente la baja variabilidad de las subpoblaciones si se compara la dispersión del análisis de componentes principales de cada individuo, en comparación con las demás poblaciones criollas, lo cual puede ser debido a un 'efecto fundador' o a una disminución dramática del tamaño efectivo de las subpoblaciones en el pasado (Figura 2).

Análisis filogenético

A partir del cálculo de las frecuencias alélicas se estimaron las distancias genéticas estándar (Ds), utilizando el módulo Gendist del programa Phylip® (Felsenstein, 1993) con el que se calcularon las fórmulas de distancia genéticas según las metodologías de Nei (1972) y de Cavalli-Sforza (1969). Según Nei (1972), estas medidas de distancia son más eficientes en encontrar la verdadera topología de un árbol evolutivo cuando se calculan a partir de datos de frecuencias genéticas. Los árboles filogenéticos fueron construidos usando el método de Neighbor-Joining y para encontrar la mejor organización topológica se realizó un proceso de *bootstrapping* con 10.000 repeticiones.

La menor medida de distancia genética calculada por el método de Nei (1972) se encuentra entre las subpoblaciones A y HB, y entre las subpoblaciones C y BY dentro de la raza CAS. Con respecto a la raza Cebú, las poblaciones HB y RC son las que presentan las menores distancias, lo que sugiere que en esas poblaciones hay mayor proporción de individuos CAS que comparten alelos con Cebú, posiblemente debido a mestizaje. Como se puede ver las razas criollas siempre presentan valores altos de divergencia con relación a la raza Cebú, valores que varían entre 0,62 y 1,6 (Tabla 4).

El análisis filogenético de las matrices de distancia obtenidas por las metodologías de Nei (1972) y Cavalli Sforza (1969), arrojaron topología muy similar (Figura 3); en todos los casos el primer grupo lo forman las razas criollas, en las cuales el 70 % de las repeticiones se da en el mismo orden topológico; así

Tabla 4. Matriz de distancia genética estándar de Nei (1972) entre siete subpoblaciones de la raza criolla Casanareño, la raza Cebú y cinco razas criollas colombianas.

| | A | BY | C | Cebú | HB | JV | LP | RC | Romo | SM | HV | CCC | BON |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0,000 | 0,379 | 0,345 | 0,600 | 0,219 | 0,391 | 0,279 | 0,367 | 0,425 | 0,831 | 0,639 | 0,593 | 0,321 |
| BY | 0,379 | 0,000 | 0,251 | 0,878 | 0,454 | 0,445 | 0,446 | 0,648 | 0,457 | 0,923 | 0,427 | 0,484 | 0,471 |
| C | 0,345 | 0,251 | 0,000 | 0,752 | 0,447 | 0,559 | 0,423 | 0,523 | 0,403 | 0,672 | 0,297 | 0,491 | 0,259 |
| Cebú | 0,600 | 0,878 | 0,752 | 0,000 | 0,404 | 0,732 | 0,585 | 0,465 | 0,875 | 1,687 | 0,902 | 1,379 | 0,620 |
| HB | 0,219 | 0,454 | 0,447 | 0,404 | 0,000 | 0,433 | 0,307 | 0,271 | 0,604 | 1,041 | 0,662 | 0,706 | 0,413 |
| JV | 0,391 | 0,445 | 0,559 | 0,732 | 0,433 | 0,000 | 0,443 | 0,764 | 0,660 | 1,153 | 0,537 | 0,861 | 0,645 |
| LP | 0,279 | 0,446 | 0,423 | 0,585 | 0,307 | 0,443 | 0,000 | 0,295 | 0,710 | 0,888 | 0,633 | 0,802 | 0,480 |
| RC | 0,367 | 0,648 | 0,523 | 0,465 | 0,271 | 0,764 | 0,295 | 0,000 | 0,968 | 1,411 | 0,820 | 1,302 | 0,529 |
| Romo | 0,425 | 0,457 | 0,403 | 0,875 | 0,604 | 0,660 | 0,710 | 0,968 | 0,000 | 0,596 | 0,451 | 0,408 | 0,250 |
| SM | 0,831 | 0,923 | 0,672 | 1,687 | 1,041 | 1,153 | 0,888 | 1,411 | 0,596 | 0,000 | 0,371 | 0,449 | 0,738 |
| HV | 0,639 | 0,427 | 0,297 | 0,902 | 0,662 | 0,537 | 0,633 | 0,820 | 0,451 | 0,371 | 0,000 | 0,535 | 0,408 |
| CCC | 0,593 | 0,484 | 0,491 | 1,379 | 0,706 | 0,861 | 0,802 | 1,302 | 0,408 | 0,449 | 0,535 | 0,000 | 0,674 |
| BON | 0,321 | 0,471 | 0,259 | 0,620 | 0,413 | 0,645 | 0,480 | 0,529 | 0,250 | 0,738 | 0,408 | 0,674 | 0,000 |

A: subpoblación CAS 'Albania'; BY: subpoblación CAS 'Bubuy'; C: subpoblación CAS 'Cumay'; Cebú; HB: subpoblación CAS 'Mastranto'; JV: subpoblación CAS 'Canaguay'; LP: subpoblación CAS 'California'; RC: subpoblación CAS 'Recreo'; ROMO: Romosinuano; SM: Sanmartinero; CCC: Costeño con Cuernos; HV: Hartón del Valle; BON: Blanco Orejinegro.

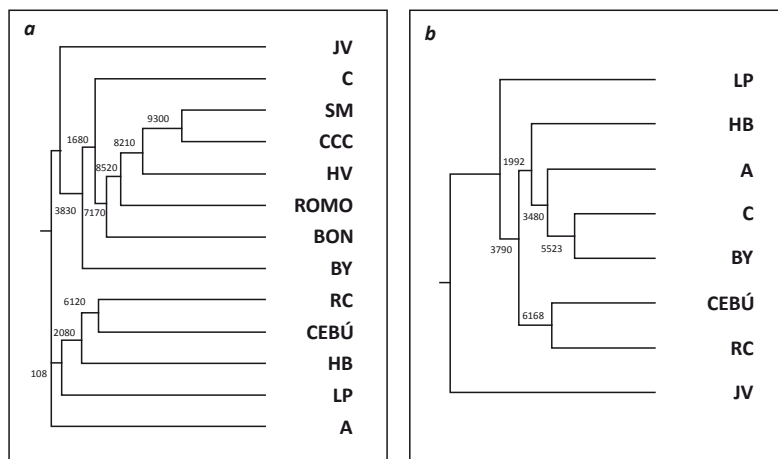


Figura 3. Árbol de relaciones filogenéticas entre siete subpoblaciones de la raza Casanareño, la raza Cebú y cinco razas criollas colombianas usando la distancia genética estándar (Ds): a) según la metodología de Nei (1972) y b) según la metodología de Cavalli-Sforza (1969); ambas con el uso del algoritmo Neighbor-Joining del programa Phylip® con *bootstrapping* de 10.000 réplicas. A: subpoblación 'Albania'; BY: subpoblación 'Bubuy'; C: subpoblación 'Cumay'; Cebú; HB: subpoblación 'Mastranto'; JV: subpoblación 'Canaguay'; LP: subpoblación 'California'; RC: subpoblación 'Recreo'; Romo: Romosinuano; SM: Sanmartinero; CCC: Costeño con Cuernos; HV: Hartón del Valle; BON: Blanco Orejinegro.

Tabla 5. Matriz de distancia genética estándar de Nei entre siete subpoblaciones de la raza Casanareño y la raza Cebú (Nei, 1972).

| | A | BY | C | Cebú | HB | JV | LP | RC |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0,000 | 0,403 | 0,298 | 0,374 | 0,240 | 0,525 | 0,320 | 0,287 |
| BY | 0,403 | 0,000 | 0,247 | 0,766 | 0,548 | 0,478 | 0,378 | 0,579 |
| C | 0,298 | 0,247 | 0,000 | 0,614 | 0,433 | 0,484 | 0,437 | 0,459 |
| Cebú | 0,374 | 0,766 | 0,614 | 0,000 | 0,513 | 0,657 | 0,475 | 0,339 |
| HB | 0,240 | 0,548 | 0,433 | 0,513 | 0,000 | 0,407 | 0,327 | 0,200 |
| JV | 0,525 | 0,478 | 0,484 | 0,657 | 0,407 | 0,000 | 0,337 | 0,598 |
| LP | 0,320 | 0,378 | 0,437 | 0,475 | 0,327 | 0,337 | 0,000 | 0,372 |
| RC | 0,287 | 0,579 | 0,459 | 0,339 | 0,200 | 0,598 | 0,372 | 0,000 |

A: subpoblación CAS 'Albania'; BY: subpoblación CAS 'Bubuy'; C: subpoblación CAS 'Cumay'; Cebú; HB: subpoblación CAS 'Mastranto'; JV: subpoblación CAS 'Canaguay'; LP: subpoblación CAS 'California'; RC: subpoblación CAS 'Recreo'.

mismo, el *cluster* formado entre Cebú y la subpoblación RC, que en 61% de las veces da el mismo orden, lo que indicaría que esta es la subpoblación donde puede haber la mayor proporción de individuos que comparten alelos con la raza Cebú y, por tanto, mayor nivel de introgresión genética.

Otras subpoblaciones como HB, LP y A forman un grupo más alejado del Cebú, pero aún más de las demás razas criollas. Solamente las subpoblaciones JV, BY y C se incluyen en el mismo grupo de las razas criollas; en el árbol de la Figura 3a, esta parte del arreglo topológico no presenta suficiente robustez, dado que en la mayoría de ocasiones dicha organización no se da en más del 40% de las repeticiones, por lo que, para el grupo que incluye la raza Cebú puede tener cualquier otra organización con similar probabilidad, pero siempre dentro del mismo grupo.

Cuando se analiza la matriz de distancias incluyendo solamente las subpoblaciones de raza Casanareño y la raza Cebú (Figura 3b y Tabla 5), se confirma el menor valor de distancia genética (Ds) que existe entre la raza Cebú y la subpoblación RC, y el más alejado con las subpoblaciones BY, C y JV, que confirman el resultado anterior y mostrarían que son los núcleos de raza Casanareño, que presentan menor proporción de alelos compartidos con Cebú, posiblemente debido a su mayor pureza racial. Entre las subpoblaciones, las más cercanamente relacionadas son HB y RC (0,20), HB y A (0,24), y C y BY (0,247), las

que podrían tener algún origen común, por lo que sería recomendable revisar su genealogía (Tabla 5).

La cercana relación entre Cebú y algunas subpoblaciones Casanareño es evidente en la ordenación que muestra el dendrograma 3b; éste posee una robustez baja, pues solamente el grupo formado por Cebú y RC se repite el 61% de las veces y el grupo C y BY se da el 55% de las veces, mientras los restantes arreglos pueden tener cualquier otro orden con una probabilidad similar. Queda claro que la subpoblación Casanareño JV es la que presenta mayor distancia frente a las demás subpoblaciones, además de ser una de las más distantes de la raza Cebú (0,65), lo que indicaría un origen diferente de las demás poblaciones o un alto grado de mestizaje con poblaciones CAS de diferente origen (Figura 3b).

Adicionalmente se realizó un análisis tomando como unidades taxonómicas operacionales a los individuos, utilizando la medida de distancia de Nei (1972) y el algoritmo de Neighbor-Joining. En el extremo superior de la Figura 4 se señala un *cluster* que agrupa alrededor de 30 individuos dentro de los cuales se encuentran el 70% de los individuos de la subpoblación C, el 40% de individuos de las subpoblaciones BY, A y LP; solamente se insertan dos individuos de la raza Cebú. En el extremo inferior del dendrograma se indica otro agrupamiento en el que se encuentra el 66% de los individuos de la raza Cebú; los restantes ocho individuos se distribuyen entre la población. Lo anterior muestra un claro agrupamiento de la población Cebú y de una de las subpoblaciones CAS; no obstante, subpoblaciones como RC y JV no constituyen un agrupamiento entre los individuos que la conforman, sino que se distribuyen entre diferentes grupos a lo largo del dendrograma (Figura 4).

Análisis de la estructura de la población

La Figura 5 ilustra una representación de las estimaciones de Q (coeficiente de membresía) para cada individuo analizado el que, a su vez, se agrupa en un *cluster* (subpoblación o raza); cada individuo se representa como una pequeña columna vertical dividida en *k* segmentos coloreados con longitudes proporcionales a cada uno de los *cluster* inferidos a los que puede pertenecer. En la parte inferior se muestran los individuos y

la raza a la cual previamente se indicó que pertenecía. El orden representado es: A, subpoblación 'Albania'; BY: subpoblación 'Bubuy'; C: subpoblación 'Cumay'; HB: subpoblación 'Mastranto'; JV: subpoblación 'Canaguay'; LP: subpoblación 'California'; RC: subpoblación 'Recreo' y la raza Cebú.

Se puede ver que los individuos de la raza Cebú presentan valores de membresía que los agrupa principalmente en el *cluster* rojo (20/24 animales con valor de membresía mayores de 0,65); no obstante, se nota que tres individuos de esta raza, obtenidos de muestras de ganado Cebú del Casanare, presentan un valor de membresía (>0,80) que los sitúa en el *cluster* azul, lo que indica que la mayoría de individuos de la raza Cebú tienen combinaciones y frecuencias alélicas que los diferencian ampliamente de los individuos que se obtuvieron de poblaciones Cebú del departamento del Casanare (Figura 5).

En las subpoblaciones de la raza Casanareño se encontraron dos agrupaciones; la primera sitúa el 51% de la población en el *cluster* verde, con valores de membresía superiores a 0,60 y no incluye ningún animal de la raza Cebú, por lo que se puede deducir que es una población con bajo nivel de introgresión genética. En este grupo se incluye el 100% de los individuos de la subpoblación C, el 76% de los individuos de la subpoblación BY

y el 50% de los individuos de la población A. En el análisis filogenético estas subpoblaciones se agruparon juntas y mostraron mayores valores de distancias genéticas con respecto a la raza Cebú, con lo que se confirma una baja probabilidad de que se trate de poblaciones mestizas. Por su parte, en las poblaciones de RC y JV, entre 90 y 100% de los individuos tuvieron valores de membresía que los incluyó en el *cluster* verde, del cual hacen parte los tres animales de la raza Cebú obtenidos de poblaciones ubicadas en el Casanare, con valores de membresía superiores a 0,9. Por esta razón, y debido a que estas poblaciones en el análisis filogenético siempre se presentaron cercanas al Cebú o agrupadas en su mismo *cluster*, se puede decir que las subpoblaciones RC y JV presentan un mayor grado de introgresión genética y que no podrían considerarse como poblaciones Casanareño puras (Figura 5).

La subpoblación HB presenta un 42% de individuos agrupados en el *cluster* verde que podrían ser catalogados como puros, un 35% de individuos en el *cluster* azul y un grupo de animales con valores intermedios en los tres *cluster*, lo que indicaría animales mestizos que no se pueden incluir en ninguno de los agrupamientos.

Es importante tener en cuenta que al analizar los cálculos del índice F_{IS} , se indica que la población Cebú tiene

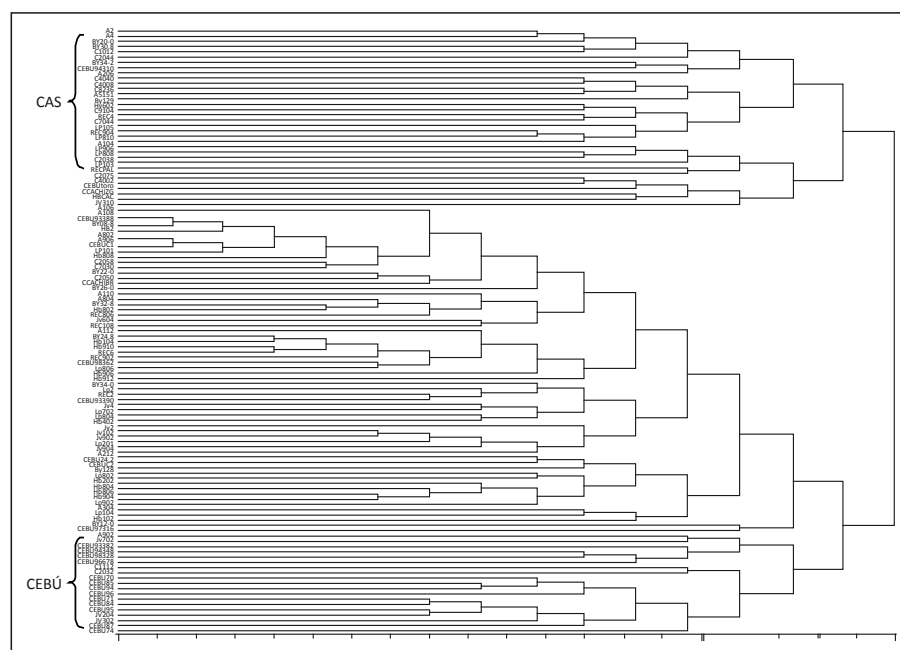


Figura 4. Dendrograma de relaciones genéticas construido con las distancias genéticas entre parejas de individuos perteneciente a subpoblaciones de la raza Casanareño y la raza Cebú.

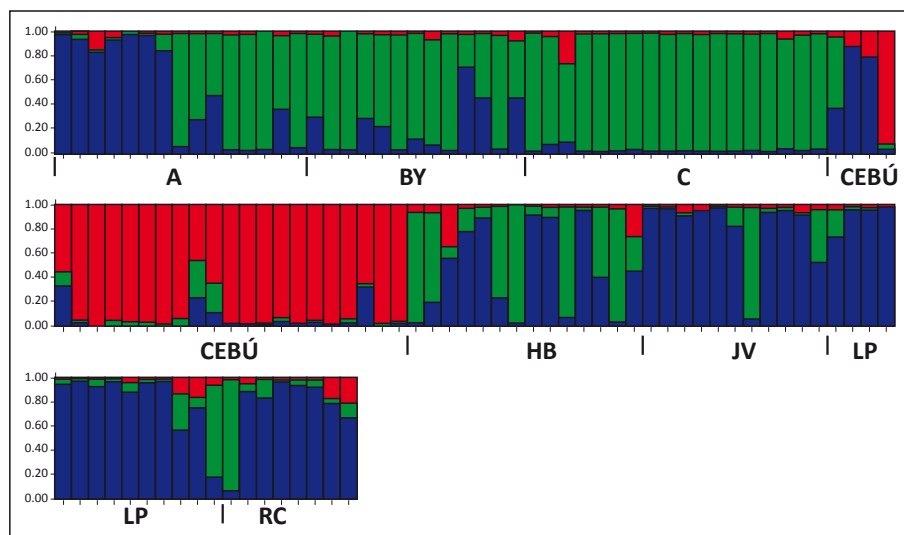


Figura 5. Estimaciones de Q (coeficiente de membresía para cada individuo en cada *cluster*) en bovinos de siete subpoblaciones de la raza Casanareño y la raza Cebú.

el valor más alto (0,14), como era de esperarse, ya que al incluir todos los animales de esta raza como se muestra en la Tabla 3, un valor de 0,2. Por su parte, dentro de la raza Casanareño las subpoblaciones A, C y BY presentaron los valores más altos (0,08 a 0,15) y las subpoblaciones RC, JV y HB presentan valores más bajos (0,04 a 0,08); en la Figura 5, el *cluster* azul, que incluye estas poblaciones, también presenta menores valores (0,04) que el *cluster* verde (0,08), lo que puede indicar que se trata de animales cruzados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de la población criolla muestreada para este estudio, más de la mitad de los bovinos Casanareño analizados corresponde a individuos con un alto grado de características taurinas o criollas, mientras los restantes animales presentan diversos grados de introgresión genética, como es evidente en los valores de distancias genéticas subpoblacionales e individuales y en los estudios de estructura de la población.

A efectos de seleccionar aquellos animales con una mayor proporción de sangre Casanareño destinados a un programa de conservación, se puede recurrir a los individuos y ganaderías que conformaban el *cluster* verde, los cuales presentaron los valores de membresía más altos. En general, se recomienda desarrollar una estrategia de conservación tanto *in situ* como *in vitro*, atendiendo a la multiplicación de estas poblaciones con

el fin de no perder definitivamente este germoplasma. Incluso aquellos animales que presentan algún grado de introgresión pueden servir para aumentar los censos si se les permite reproducirse en línea de pureza y lograr animales 'puros por absorción', metodología válida en la recuperación de razas en peligro de extinción.

Se sabe que una población genéticamente estrecha que se mantiene en estado de pureza en núcleos poblacionales de pequeño número, normalmente muestra valores de endogamia altos. En el presente estudio se hallaron subpoblaciones de ganado criollo Casanareño que aparentemente se encontraban en estas condiciones; no obstante, registran valores de endogamia muy bajos, lo que puede indicar que son poblaciones recientemente cruzadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los productores ganaderos que aportaron las subpoblaciones de ganado, a la Gobernación de Casanare y a la Fundación Amanecer, por la financiación del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Arranz, J.J., Y. Baon y F. San Primitivo. 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim. Gen.* 27: 415-419.
- Barrera, G.P., R. Martínez y F. Ariza. 2003. Caracterización genética molecular del ganado

criollo colombiano utilizando marcadores moleculares tipo microsatélite y secuencia de ADN mitocondrial. Sexto Congreso Iberoamericano de Razas Criollas y Autóctonas & Cuarto Simposio Iberoamericano Sobre Conservación Y Utilización De Recursos Zoogenéticos, 1-14 de diciembre, Recife (Brasil), ISBN 84-9306-83.

Bedoya, G., L.G. Carvajal, N.R. Bermúdez y F.L. Moreno. 2001. Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14(2): 107-118.

Bradley, D.G., D. Machugh, E. Cunningham y R.T. Loftus. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5131-5135.

Cavalli-Sforza, L.L. 1969. Human diversity. *Proc. 12th Intl. Cong. Genet.* 3: 405-16.

FAO. 2003. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers. 24 p.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). University of Washington, Seattle. WA (USA).

Martín-Burriel, I., E. García y P. Zaragoza. 1999. Genetics diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Anim. Gen.* 30: 177-182.

Moreno, F., G. Bedoya, J. Derr, L. Carvajal, N. Bermúdez, F. Zuluaga, J. Ossa, J. Berdugo, L. Estrada, J. Barrera, D. Scott y A. Linares. 2001. Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. *Rev. Corpoica* 3(2): 17-23.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.

Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 917 p.

Sastre, H.J. 2003. Descripción, situación actual y estrategias de conservación de la raza bovina colombiana criolla Casanare. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Andalucía, España.